



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Químicas

Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Departamento de Análisis Clínicos

**“Efecto de la administración crónica de zinc  
sobre receptores de quimiocinas  
(CCR1, CCR2, CCR8 y CXCR4) tras un  
Proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata”**

Tesis para obtener el título de  
Licenciado en Químico Farmacobiólogo

**Presenta:**

Wendy García Falfán

**Directora de tesis**

D.C. Bertha Alicia León Chávez

Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas

Septiembre 2015

# Índice

---

Lista de abreviaciones.....	3
Lista de imágenes.....	5
Resumen.....	6
Marco teórico.....	8
Justificación.....	23
Hipótesis.....	24
Objetivos: General y Específicos.....	25
Diseño de la investigación.....	26
Diagrama de trabajo.....	28
Metodología.....	29
Control de calidad.....	34
Medidas de seguridad.....	35
Resultados.....	36
Discusión.....	45
Conclusión.....	49
Perspectivas.....	50
Bibliografía.....	51
Apéndices.....	55

## Lista de abreviaciones

ABTS	Ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzil-tiaxolina-6-sulfónico
AND	Acido Desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de Varianza
ARNm	Ácido Ribonucleico (mensajero)
ATP	Adenosin trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
BUAP	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
CA1	capa 1
CA3	capa 3
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
DRY	aspartato arginina, tirosina
DTM	Dominio Transmembrana
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Inmunoensayo enzimático)
FSC	Flujo Sanguíneo Cerebral
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GD	Giro Dentado
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
H&E	Hematoxilina y Eosina
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogeno
HCl	Ácido Clorhídrico
i.p	Intraperitoneal
KCl	Cloruro de Potasio
kDa	kiloDalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato ácido de potasio

---

LIQC	Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas
MCP-1	Proteína Quimioatrayente de Monocitos - 1
MIP-1 $\alpha$	Proteína Inflamatoria de Macrófagos -1 alfa
MIP-1 $\beta$	Proteína Inflamatoria de Macrófagos-1 beta
MT's	Metalotioneínas
NaCl	Cloruro de Sodio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato disódico
NaOH	Hidróxido de sodio
NF-Kappa B	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B
NK	Natural Killer
NMDA	N-metil-D-aspartato
N-terminal	Amino terminal
O <sub>2</sub>	Oxígeno
OACP	Obliteración de la Arteria Carotida Primitiva
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
pH	Potencial de Hidrogeno
SDF-1	Factor Derivado de células Estromales-1
SEM	Error Estándar de la Media
SNC	Sistema Nervioso Central
Zip	Zinc importador
Zn	Zinc
ZnCl <sub>2</sub>	Cloruro de zinc
ZnT	Zinc Transportador

## Lista de imágenes

---

**Figura 1.** Clasificación de las quimiocinas de acuerdo a su estructura.

**Figura 2.** Estructura de los receptores de quimiocinas.

**Figura 3.** Efecto de la administración crónica de Zinc sobre los niveles proteicos del receptor CCR1 tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.

**Figura 4.** Efecto de la administración crónica de Zinc sobre los niveles proteicos del receptor CCR8 tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.

**Figura 5.** Efecto de la administración crónica de Zinc sobre los niveles proteicos del receptor CCR2 tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.

**Figura 6.** Efecto de la administración crónica de Zinc sobre los niveles proteicos del receptor CXCR4 tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.

**Figura 7.** Tinción de hematoxilina-eosina en giro dentado de ratas control, con administración crónica de zinc, con OACP y con administración crónica de zinc previa a la OACP.

**Figura 8.** Tinción de hematoxilina-eosina en donde se observa la zona CA1 del giro dentado de ratas control, con administración crónica de zinc, con OACP y con administración crónica de zinc previa a la OACP.

**Figura 9.** Tinción de hematoxilina-eosina en donde se observa la zona CA3 del giro dentado de ratas control, con administración crónica de zinc, con OACP y con administración crónica de zinc previa a la OACP.

## Resumen

---

Los accidentes cerebro vasculares representan un grave problema de salud pública a nivel mundial esto se debe a las secuelas incapacitantes que producen y a su importante letalidad. Durante la isquemia hay una disminución de oxígeno y glucosa, llevando al daño y muerte neuronal. Por otro lado, estudios previos han demostrado que la administración subaguda de zinc tiene un efecto neuroprotector tras un proceso hipóxico-isquémico, disminuyendo el volumen de infarto, la lipoperoxidación, la respuesta inmunológica e inhibiendo la activación de las caspasas, que promueven la muerte celular por apoptosis.

Sin embargo, la acumulación de zinc ejerce un papel dual, por lo que se debe estudiar si una administración crónica de zinc mantiene el efecto protector ante un daño isquémico, disminuyendo los niveles proteicos de receptores de quimiocinas y con esto disminuyendo el proceso inflamatorio.

Es por ello que para determinar si la administración crónica de zinc de manera profiláctica ejerce un efecto protector en el cerebro, tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral se siguió el siguiente protocolo de trabajo: Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 180-210g de peso corporal, las cuales se dividieron en 4 grupos experimentales: 1) Grupo control sin tratamiento, 2) Grupo control con tratamiento de zinc; administración crónica de  $ZnCl_2$  a una dosis de 0.5mg/Kg de peso corporal durante 14 días cada 24 h vía intraperitoneal, 3) Administración crónica de zinc más la OACP durante 10 minutos, 4) Grupo Isquemia (OACP).

Los resultados muestran que la administración crónica de zinc previno el incremento en los niveles proteicos de los receptores de quimiocinas pro-inflamatorias (CCR1, CCR8 y CCR2) disminuyendo con esto el proceso inflamatorio ocasionado por la infiltración leucocitaria, llevando a una consiguiente disminución de la muerte neuronal. También se observó que la administración crónica de zinc mostro un aumento en los

niveles proteicos de CXCR4 que junto a su quimiocina CXCL12 participan en la regeneración y supervivencia neuronal.

La administración crónica profiláctica de zinc disminuye el proceso inflamatorio causado por la OACP permitiendo la regeneración y supervivencia neuronal.

## Marco teórico

---

Los accidentes cerebro-vasculares son un problema de salud a nivel mundial, según la OMS las enfermedades cardiovasculares, como el infarto al miocardio y el accidente cerebrovascular, cobran 17.5 millones de vidas al año en el mundo, ocupando el segundo lugar en mortalidad a nivel mundial, además de ser la causa más frecuente de discapacidad motora en adultos, en México en el año 2013 se presentaron 40,719 defunciones a causa de los accidentes cerebrovasculares, causando discapacidad en pacientes que sufren este tipo de eventos en un 31% (INEGI 2013)

Ahora bien los accidentes cerebro-vasculares se clasifican en base a su origen, el cual es de dos naturalezas, el isquémico (80% de recurrencia) y el hemorrágico (15-20% de recurrencia) (Martínez y cols 2011). Los accidentes cerebro-vasculares isquémicos son debidos principalmente a la obstrucción arterioesclerótica por un émbolo, las principales causas son el tabaquismo, la hipertensión o la diabetes. Las causas más comunes en este tipo de accidentes son la formación de coágulos de sangre en alguna de las arterias que irrigan el cerebro, la estenosis arterial o el embolismo. El tratamiento debe de darse lo más pronto posible cuando la obstrucción se lleva a cabo en arterias que desembocan en órganos muy irrigados, como el cerebro, lo cual de no ser así promueve que se desencadenen mecanismos o vías que llevan a la célula a su sobrevivencia o muerte ya que cuando el aporte sanguíneo al tejido u órgano cesa o disminuye, lo hace de igual forma el O<sub>2</sub>(Wooddruff y cols 2011).

El accidente cerebrovascular, también conocido como ictus, es un episodio agudo caracterizado por la disminución brusca del aporte sanguíneo a un área del cerebro que da lugar a una pérdida de la función neurológica (Donnan y cols 2008).

Las causas del accidente cerebrovascular pueden ser muy diversas, pero las más frecuentes son el estrechamiento gradual (ateroesclerosis), la oclusión súbita (trombosis), la microembolía en vasos de pequeño calibre o la hipertensión intracraneal (Hossmann 1982).



En muchos casos, la causa es la formación de placas trombóticas sobre lesiones arterioscleróticas preexistentes (aterotrombosis) en las grandes arterias cervicales o intracraneales (Hossmann 1994).

La isquemia cerebral se define como la reducción del flujo sanguíneo cerebral (FSC) desde niveles fisiológicos (50-55 ml/min/100 g de tejido), hasta niveles que son insuficientes para mantener en condiciones normales el metabolismo y funcionamiento de las células cerebrales. Cuando la reducción del flujo sanguíneo se produce en un área cerebral limitada, irrigada por una determinada arteria cerebral, se define como isquemia cerebral focal (Brouns y De Deyn 2009).

En la isquemia cerebral focal se produce una zona hipoperfundida que queda dañada rápida e irreversiblemente (núcleo isquémico), en la que el FSC disminuye a 10 mL/min/100 g de tejido, y una zona circundante, denominada zona de penumbra isquémica, en la que el daño neuronal es en muchos casos reversible ya que, a pesar de la reducción del FSC (10-25 ml/min/100 g de tejido), éste aún es suficiente para el mantenimiento funcional de las neuronas (Markus y cols 2004).

La isquemia cerebral focal suficiente para causar signos o síntomas clínicos es de 15 a 30 minutos de duración, provocando una lesión irreversible en neuronas específicas, muy vulnerables. Sí la isquemia dura una hora o más, es inevitable el infarto en parte o la totalidad del territorio vascular afectado (Doussoulin 2011)

La isquemia cerebral se inicia con un descenso o pérdida repentina del riego sanguíneo en un área del cerebro, provocando una disfunción neurológica de la misma (Donnan y cols 2008). Tras el restablecimiento del riego sanguíneo (reperusión), el daño cerebral continúa durante horas, o incluso días, debido a la aparición de alteraciones bioquímicas y fisiopatológicas importantes que dependen en gran medida de la intensidad y de la duración del daño producido. Aunque la restauración del riego sanguíneo en el tejido isquémico es crítica para que este pueda seguir funcionando, también se produce un daño secundario debido a esta reperusión (Brouns y De Deyn 2009).

El cerebro requiere el aporte constante de glucosa y oxígeno a través del torrente sanguíneo para obtener la energía necesaria para su normal funcionamiento y en condiciones de isquemia cerebral, las células de la región cerebral afectada utilizan rápidamente sus mínimas reservas de glucógeno y aumentan la producción de lactato mediante glucólisis anaerobia, lo cual contribuye a la acidificación del tejido. Estas alteraciones se acompañan de una reducción de la concentración de ATP que anula la actividad eléctrica de la región cerebral afectada. La producción de ATP cerebral es dependiente de la perfusión continuada, de manera que alcanza valores mínimos en aproximadamente 5 min después de una isquemia completa con lo que desaparece el gradiente iónico transmembranal. Así se pierde la homeostasis iónica que conduce a un aumento intracelular de iones de sodio y calcio, y una liberación de potasio como consecuencia de ello se produce una entrada masiva de iones de calcio en las células, que puede tener un efecto neurotóxico y contribuir al desarrollo de la patología isquémica. Por otro lado , la isquemia cerebral también induce la acumulación de glutamato extracelular, que proviene de la liberación dependiente de calcio de este neurotransmisor de las vesículas presinápticas y esta constante liberación de glutamato podría provocar la muerte neuronal (Planas 1997).

El glutamato es el más potente predictor bioquímico del infarto cerebral progresivo ya que niveles plasmáticos incrementados en las primeras 24h desde el inicio de la sintomatología, predicen el deterioro neurológico con una probabilidad del 92%. Durante la isquemia cerebral se produce un aumento de la síntesis de GABA, alcanzando niveles 250 veces más elevados que en situaciones fisiológicas, esto provoca una sobre estimulación de las neuronas vulnerables por el glutamato, facilitando la muerte neuronal (Doussoulin 2011).

En experimentos in vitro se ha demostrado la neurotoxicidad del glutamato donde la exposición de cultivos celulares de neuronas a altas concentraciones de glutamato resulta neurotóxica (Planas 1997).

Posterior a una isquemia focal se lleva a cabo el proceso de reperfusión, en el cual se produce una disgregación de ribosomas y una inhibición del proceso de síntesis proteica lo que sugiere es un factor implicado en la muerte neuronal (Planas 1997).

El daño cerebral por isquemia, se limita a poblaciones específicas de neuronas más vulnerables y propensas a muerte por ejemplo, las neuronas piramidales CA1 del hipocampo, las cerebelosas de Purkinje y las piramidales en las capas neocorticales 3, 5 y 6 (Doussoulin 2011)

El sistema nervioso central (SNC) se consideraba como un órgano privilegiado ausente de una respuesta inmune, quizás debido a la existencia de la barrera hematoencefálica (BHE) que regula el paso de células inflamatorias y mediadores del torrente sanguíneo al parénquima cerebral, es por ello que la pérdida de la barrera hematoencefálica facilita la migración de células inflamatorias que promueven la respuesta inflamatoria post-isquémica (Perry 1998)

El SNC dispone de células inmunológicas innatas, como la microglía y los macrófagos, las cuales poseen una función importante en la recepción y propagación de señales inflamatorias, además de células neuronales como los astrocitos y neuronas los cuales son capaces de expresar mediadores inmunológicos tales como citocinas y quimiocinas, mostrando un papel importante en la respuesta celular y neurológica en el cerebro (Cuenca y cols 2010)

### Microglía

La microglía es una población celular altamente receptiva con un importante papel de “vigilancia inmunológica” del sistema nervioso, esta constituye el 5-15% de la población celular cerebral total y forma una red diseminada en el SNC capaz de detectar y reaccionar ante las modificaciones del ambiente, se encuentra primordialmente involucrada en la vigilancia inmunológica ya que cuando se activa, posee funciones de macrófagos como la fagocitosis, producción de quimiocinas inflamatorias y presentación de antígenos. En el caso de la isquemia cerebral o un estímulo inmunológico, la microglía se activa pocos

minutos después y produce la liberación de mediadores inflamatorios que exacerban el daño tisular pudiendo llegar a la apoptosis (Cuenca y cols 2010).

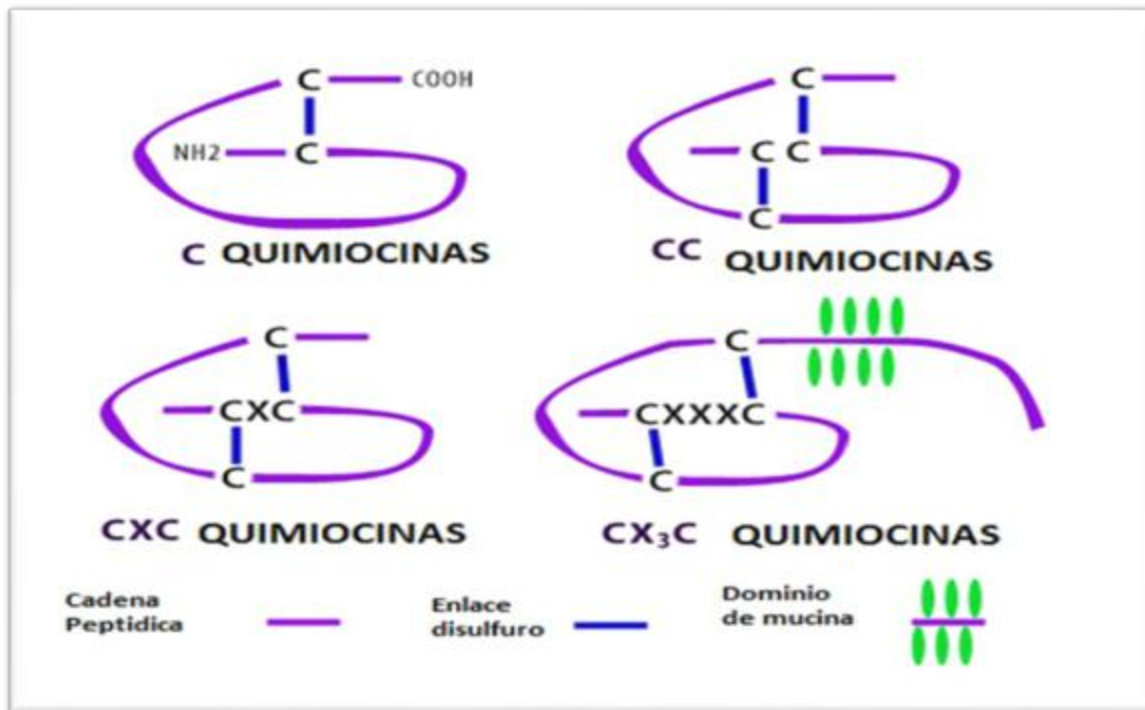
Además de la microglía, otras células como los astrocitos también expresan mediadores inflamatorios; después de la isquemia, las células gliales que sobreviven al episodio isquémico sufren un proceso de hipertrofia y proliferación, fundamentalmente de astrocitos los cuales se activan, incrementándose la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la llamada “gliosis reactiva”, que implica una serie de cambios funcionales y estructurales que se ha puesto en relación con mecanismos de neuroprotección y reparación de la lesión isquémica (Castillo 2001).

Los astrocitos participan en el proceso inflamatorio, expresando moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y moléculas estimuladoras, con lo que se desarrolla una respuesta inmunológica ya que los astrocitos son capaces de secretar moléculas inflamatorias, como citocinas y quimiocinas (Che y cols 2001).

#### Quimiocinas

Las quimiocinas son una subclase de citocinas, generalmente de bajo peso molecular (8-12 kDa) a las cuales se les describe como quimioatrayentes, esto debido a la inducción de la quimiotaxis de leucocitos que llevan a cabo, por lo que desempeñan un papel importante en los procesos de inflamación del SNC, en la comunicación celular y en el reclutamiento de células inflamatorias. Se cuenta con cuatro subfamilias que han sido clasificadas en C, CC, CXC, y CX3C quimiocinas (Figura. 1). En base a sus funciones, las quimiocinas han sido también definidas como quimiocinas homeostáticas (que son secretadas constitutivamente y participan en la vigilancia inmunológica y el tráfico de linfocitos) y quimiocinas inflamatorias (que median señales pro-inflamatorias e inducen el reclutamiento de leucocitos al tejido dañado o infectado). Recientemente, se sabe que las quimiocinas influyen también en la angiogénesis y la diferenciación celular. Las quimiocinas ejercen sus actividades a través de la unión a los receptores con siete dominios transmembranales y la activación de vías de señalización intracelular (Mirabelli y cols 2011).

Además, se ha propuesto que las quimiocinas pueden tener un papel importante en el reclutamiento de células a las regiones dañadas y en la migración de células estromáticas de la médula al tejido cerebral isquémico. Por otro lado, algunas quimiocinas actúan también como moléculas señal que regulan la actividad de la microglía (Cuenca y cols 2010).

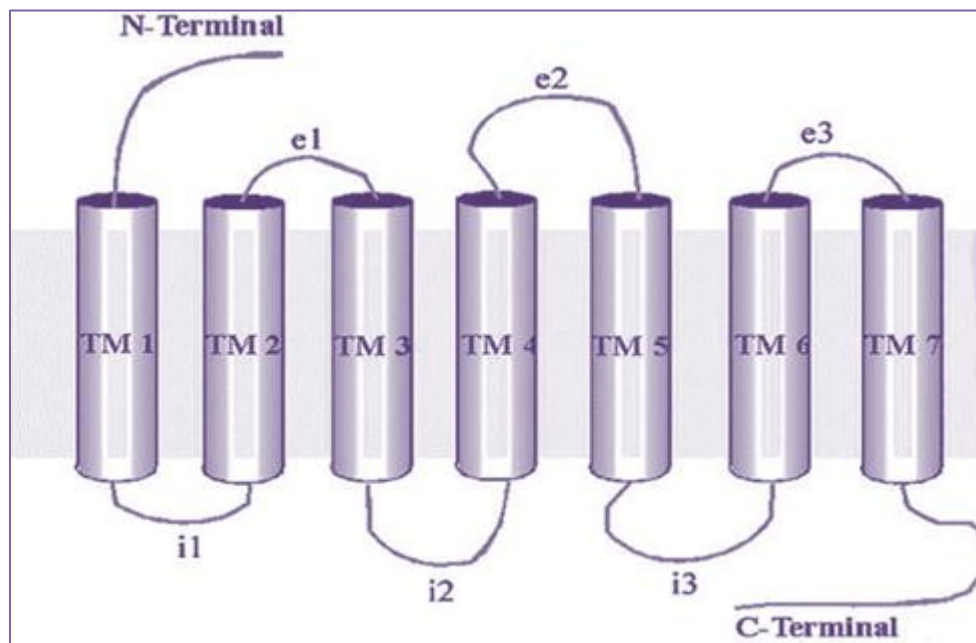


**Figura 1. Clasificación de las quimiocinas de acuerdo a su estructura.**

### Receptores de Quimiocinas.

Los receptores de las quimiocinas pertenecen a la familia de los receptores con 7 DTM (Dominios Transmembrana), la mayoría de ellos acoplados a proteína G, con tres asas intracelulares y tres extracelulares. Todos presentan un extremo N-terminal extracelular y un C-terminal intracelular. La porción intracelular carboxiterminal contiene residuos serina y treonina, los cuales son fosforilados y participan en la transducción de

señales. Todos tienen dos cisteínas conservadas, una en el dominio N-terminal y otra en la tercera asa extracelular, que se asume son encargadas de formar un puente disulfuro que es importante en la formación de un surco de unión con el ligando ya que la interacción entre la quimiocina y el receptor ocurre en el extremo amino terminal y una de las asas extracelulares (Fanory y Montoya 2001)



**Figura 2. Estructura de los Receptores de quimiocinas**

Dominios transmembranales (TM), asas internas (i), asas externas (e) y Segmentos terminales

En general existe un alto grado de promiscuidad en la unión de las quimiocinas a su receptor, de modo que un mismo receptor se puede unir a diferentes quimiocinas con similar afinidad y un mismo ligando puede unirse a diferentes receptores (Pello y cols 2006).

La proteína G que está acoplada a dicho receptor es heterotrimérica (cadenas  $\alpha$   $\beta$  y  $\gamma$ ) y se encuentra unida a la segunda asa intracelular que contiene el motivo DRY (aspartato

arginina, tirosina); dicho motivo ha sido implicado en la transducción de señales (Barrett 1997).

Quimiotaxis de leucocitos.

En el proceso de extravasación suceden ordenadamente una serie de pasos secuenciales: En primer lugar se producen interacciones entre el leucocito y el endotelio vascular que permiten a estos disminuir su velocidad y facilitar que puedan establecerse contactos más estables. Posteriormente, el leucocito comienza a rodar por la superficie del endotelio donde las moléculas de adhesión que juegan un papel importante en este momento son las selectinas. Las células endoteliales expresan selectinas tipo E y tipo P y los leucocitos selectinas-L. Posteriormente para llevar a cabo la adhesión, las células endoteliales expresan ligandos para las selectinas presentes en los leucocitos. Recíprocamente, los leucocitos expresan en su membrana los ligandos correspondientes para las E-selectinas y las P-selectinas. La adhesión firme de los leucocitos a la superficie del endotelio, es un proceso marcado por la interacción entre moléculas de adhesión y sus receptores mejor conocidos como integrinas (Pello y cols 2006).

En este punto juegan un papel importante las quimiocinas, que son liberadas al torrente circulatorio y una vez en la luz del vaso son retenidas por glicosaminoglicanos en la superficie endotelial, de este modo son accesibles para interactuar con sus receptores en los leucocitos y posibilitan la activación de las integrinas. Las integrinas son activadas tras la unión de su ligando, y ello promueve un cambio conformacional del heterodímero, iniciándose así la correspondiente señalización intracelular que incluye activación de tirosinas cinasas y reorganización del citoesqueleto de actina. De manera general la extravasación de la célula se realiza finalmente siguiendo un gradiente quimioatrayente el cual es generado por las quimiocinas. El gradiente quimioatrayente y la participación de proteasas hace que los leucocitos atraviesen el endotelio y se dirijan al sitio de inflamación o al lugar que deben ocupar en órganos linfoides (Pello y cols 2006).

### CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ).

Es una quimiocina de la subfamilia de las CC quimiocinas, también llamada Proteína Inflamatoria de Macrófagos-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), es un mediador activo en la inflamación cerebral post-isquémica. Esta quimiocina se ha demostrado que ejercen su actividad proinflamatoria a través de la unión de receptores de quimiocinas CC transmembranales en la superficie de las células inflamatorias, tal es el caso de CCR1. CCL3 se considera como un quimioatrayente de monocitos dentro de los sitios inflamatorios, por otra parte CCL3 recientemente se ha mostrado como un quimioatrayente de neutrófilos potente en ratones y los seres humanos; en particular CCL3 induce la adhesión de macrófagos y su trans migración a través de la liberación de mediadores inflamatorios (Mirabelli y cols 2011).

En el SNC la expresión de CCL3 parece estar limitada a los astrocitos, mientras que la expresión de su receptor CCR1 está regulada en respuesta a la inflamación y se expresa en microglía, astrocitos y oligodendrocitos. CCL3 también está involucrada en la quimiotaxis de neutrófilos después de un proceso inflamatorio (Stuart y Baune 2014).

### CCL4 (MIP-1 $\beta$ ).

Es una quimiocina de la subfamilia de las CC quimiocinas, también llamada Proteína Inflamatoria de Macrófagos -1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), CCL4 ejerce sus actividades mediante la unión selectiva del receptor transmembranal CCR8, su actividad se ha descrito en la inducción de reclutamiento de monocitos en sitios inflamatorios. Estudios han mostrado el papel potencial de CCL4 en pacientes hipertensos, ya que los niveles séricos elevados de CCL4 mostraron predecir accidentes cerebrovasculares y eventos cardiovasculares, es por ello que se debe tomar como un posible factor potencial para el desarrollo de estos accidentes (Mirabelli y cols 2011).



## CCL2 (MCP-1).

Es una quimiocina del tipo CC quimiocina, conocida también como Proteína Quimioatrayente de Monocitos -1 por sus siglas en inglés (MCP-1), se ha mostrado como un mediador crucial de monocitos al sitio de inflamación, además CCL2 tiene un papel activo en la vulnerabilidad de las placas ateroscleróticas y el reclutamiento de macrófagos, se sabe que esto lo lleva a cabo a través de la unión con el receptor CCR2. CCL2 también desempeña un papel fundamental en la activación de la microglía posterior a la isquemia y se ha demostrado que se libera en el cerebro isquémico después de la isquemia focal transitoria. (Mirabelli y cols 2011).

Un incremento significativo de los niveles de MCP-1 en el SNC aparece en pacientes con infarto cerebral isquémico agudo. Además de sus propiedades quimiotácticas, se ha observado que las quimiocinas afectan a la permeabilidad de la BHE y, de esta manera, la presencia de MCP-1 aumenta 17 veces la permeabilidad de la barrera en un modelo in vitro, lo que sugiere su implicación en la apertura de la BHE en la isquemia cerebral. MCP-1 es, hasta la fecha, el más potente quimioatrayente de monocitos y es también quimioatrayente de células T activadas (Cuenca y cols 2010).

La MCP-1 induce la expresión de las integrinas requeridas para la quimiotaxis; tiene acción sobre los monocitos, linfocitos T de memoria, basófilos y células NK; induce la liberación de gránulos por las células NK además de ser potente inductora de la liberación de histamina por los basófilos (Fanory y Montoya 2001).

En el SNC CCL2 se expresa en las neuronas, astrocitos y células endoteliales microvasculares. Sin embargo, estudios recientes han demostrado un papel para CCL2 en condiciones homeostáticas y sugieren que la expresión de ambos CCL2 y CCR2 es necesaria para el reclutamiento de macrófagos (Williams y cols 2014).

Cabe mencionar la expresión neuronal de CCR2 en la corteza cerebral, la formación del hipocampo, los núcleos hipotalámicos, en el tronco encefálico y el cerebelo (Mirabelli y cols 2011).

Las células astrogiales son las células más abundantes en el cerebro y sirven como una fuente importante de mediadores inflamatorios durante el curso de la neuroinflamación. Los astrocitos sometidos a un proceso hipóxico-isquémico *in vitro* producen una gran cantidad de MCP-1 (Mojsilovic y cols 2007).

Tanto MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y MCP-1 son especialmente quimioatrayentes de monocitos y linfocitos T, basófilos, células dendríticas, linfocitos B y NK (Natural Killer) (Fanory y Montoya 2001).

#### CXCL12.

Es una quimiocina que forma parte del grupo de las quimiocinas CXC, también conocida como Factor Derivado de Células Estromales (SDF-1) y su receptor CXCR4 que induce la actividad anti-aterosclerótica, concepto que fue apoyado por el papel benéfico de CXCL12 en la reparación del tejido a través del reclutamiento de células madre mesenquimales. CXCL12 puede comportarse de manera pro-inflamatoria y anti-inflamatoria en el cerebro posterior a un evento isquémico; en particular CXCL12 induce el reclutamiento de monocitos, progenitores de protección de células endoteliales y neuroblastos al cerebro. El reclutamiento de estas células es principalmente mediada a través de la unión a su receptor CXCR4 (Mirabelli y cols 2011)

Las fuentes celulares de CXCR4 son muy diversas e incluyen: monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, astrocitos, linfocitos T, B, NK (Natural Killer), endotelio y células epiteliales. Entre los efectos biológicos de CXCR4 encontramos la quimiotaxis de diferentes células (neutrófilos, linfocitos T, monocitos, basófilos); activación y proliferación celular; regulación de la angiogénesis; modulación de la hematopoyesis; además de inducir la liberación de histamina y la síntesis de glicosaminoglicanos y colágeno por parte de los fibroblastos (Fanory y Montoya 2001).

Dentro de las funciones homeostáticas que tiene CXCR4 unido a su ligando CXCL12 (SDF-1) se encuentra la migración celular neuronal y el desarrollo del cerebro especialmente en el giro dentado (GD) del hipocampo. Durante el desarrollo del cerebro CXCR4 se expresa en zonas ventriculares, estos son sitios de proliferación de células madre y en las últimas etapas embrionarias, CXCR4 se expresa en el hipocampo y el cerebelo. (Huang y cols 2014).

CXCR4 y CXCL12 tienen un papel importante en la morfogénesis del giro dentado del hipocampo esto debido a que CXCR4 como CXCL12 (SDF-1) son expresados en el giro dentado de adultos, lo que sugiere un papel continuo en la morfogénesis del GD. CXCR4 también se expresa en la zona intermedia hipocámpal y neocortical con una mayor afinidad por la zona CA3 del GD del hipocampo, implicándose en la migración neuronal de la corteza cerebral y el hipocampo. La morfología del giro dentado del hipocampo se ve alterada en ratones modificados que carecen del receptor CXCR4, ya que en ausencia de CXCR4, el número de células que se dividen para la migración hacia el giro dentado se reduce y las neuronas se diferencian prematuramente (Lu y cols 2002).

Posterior a un accidente cerebrovascular es necesario brindar una oportuna y rápida terapéutica para disminuir las consecuencias propias de estos accidentes, tales como el daño cerebral, disminución o pérdida unilateral de la visión, déficit cognitivo, discapacidad motora etc. Sin embargo la terapéutica para estos eventos cerebrovasculares como es la isquemia, no ha resultado ser un tratamiento totalmente eficaz, podemos mencionar la disminución de la temperatura (hipotermia) al paciente, los quelantes de calcio y los anti-inflamatorios, que pueden desencadenar otros efectos secundarios; es por ello de gran importancia contar con nuevas alternativas preventivas para pacientes con riesgo a padecer un accidente cerebrovascular.

Los micronutrientes o también llamados oligoelementos son de gran importancia en la salud, uno de los oligoelementos más importantes en el organismo es el Zinc, el cual se encuentra en todos los tejidos del cuerpo y secreciones en concentraciones relativamente altas, con un 85% en los músculos y huesos, 11% en la piel y el hígado, y el restante en los demás tejidos, teniendo las concentraciones más altas en la próstata y parte del ojo. La

cantidad promedio de Zn en el cuerpo adulto es aproximadamente 1.4 a 2.3 g de Zn; es el segundo ion de metal de transición más abundante en la vida, el zinc es el único metal que es cofactor para más de 300 enzimas y su función principal es la estabilización de la estructura de un gran número de proteínas, incluyendo enzimas de señalización en todos los niveles de la transducción de señales y factores de transcripción (Chasapis y cols 2012).

De manera general el zinc tiene tres importantes funciones biológicas en el organismo, la catalítica, la estructural y la regulatoria.

- Catalizador: El zinc está involucrado en catálisis, por medio de las enzimas que controlan muchos procesos celulares, incluyendo la síntesis de ADN, el normal crecimiento, el desarrollo del cerebro, reproducción, el desarrollo fetal, la estabilidad de la membrana, la formación de hueso, y la cicatrización de heridas.
- Estructural: Desempeña funciones estructurales y funcionales en varias proteínas implicadas en la replicación del ADN (proteínas dedos de zinc) y la transcripción inversa y es fundamental para la función de un número importante de metaloproteínas.
- Regulador: El Zinc regula tanto la actividad enzimática y la estabilidad de las proteínas como un activador o como un inhibidor, también modula procesos de transducción de señal celular e incluso tiene una función de modulador en la neurotransmisión sináptica (Chasapis y cols 2012).

En el nivel celular, del 30-40% de zinc se localiza en el núcleo, 50% en el citosol y la parte restante se asocia con membranas, el zinc celular tiene un control homeostático eficiente que evita la acumulación de zinc en exceso. La homeostasis celular de zinc está mediada por dos familias de proteínas; el zinc importador (Zip) una familia de 14 proteínas para el transporte de zinc en el citosol, y los transportadores de zinc (ZnT) que comprenden 10 proteínas transportadoras de zinc fuera del citosol. Las mismas familias transportadoras también regulan la distribución intracelular de zinc en el retículo endoplásmico, la mitocondria, y aparato de Golgi. Finalmente, las metalotioneínas (MTs) desempeñan un papel importante en la homeostasis de zinc formando complejos de hasta

un 20% de zinc intracelular, ya que las MTs se pueden unir hasta con siete iones de zinc (Plum 2010).

Zinc en SNC.

El zinc es abundante en determinadas regiones del sistema nervioso central, especialmente en las fibras musgosas del hipocampo, en estas grandes terminales nerviosas, el zinc es concentrado en las vesículas sinápticas y liberado tras una neuroexcitación (Bancila y cols 2004).

El 10% de zinc no está ligado y es por tanto caracterizado como "libre" o zinc "quelable" en el cerebro. En las neuronas, el zinc libre se localiza en gran parte en las vesículas presinápticas de las neuronas glutamatérgicas. Las regiones ricas en zinc incluyen vesículas de las fibras musgosas del hipocampo, la amígdala, y el bulbo olfatorio. La función primaria del zinc en las vesículas sinápticas parece ser la modulación de una variedad de receptores postsinápticos. Tras la excitación neuronal, el zinc se libera en la hendidura sináptica donde se une a sitios específicos de zinc sobre estos receptores. Por ejemplo, el zinc inhibe los receptores GABA, reduciendo su acción inhibitoria. El efecto del zinc sobre receptores excitadores del glutamato es más complejo, ya que el zinc actúa como un inhibidor neuromodulador de la liberación de glutamato (Gower y Levenson 2012).

Un factor de transcripción que se encuentra relacionado con el zinc es NF-kappa B, el cual está implicado en el desarrollo del sistema nervioso, regulación de la proliferación neuronal, migración, diferenciación, supervivencia y las interacciones celulares. Las subunidades de NF-kB se expresan selectivamente en la zona subventricular y en la corriente migratoria durante el desarrollo postnatal temprano y también en el cerebro adulto. Esto sugiere su implicación en la regulación de la generación y la migración de nuevas neuronas, la deficiencia de zinc afecta a la cascada de señalización NF-kB en las células neuronales y en el desarrollo del sistema nervioso (Adamo y Oteiza 2010).

La respuesta de fase aguda al estrés incluye una disminución transitoria y rápida en la concentración de zinc en plasma como resultado de la redistribución de zinc en el

compartimiento celular. La redistribución del zinc en condiciones inflamatorias parece estar mediada al menos parcialmente por quimiocinas (Foster y Samman 2012).

#### Deficiencia de zinc

Las manifestaciones de la deficiencia de zinc severa en los seres humanos incluyen la dermatitis pustulosa bullosa, alopecia, diarrea, desorden emocional, pérdida de peso, infecciones debido a disfunciones inmunológicas mediadas por células, hipogonadismo en varones, trastornos neurosensoriales y problemas con curación de las úlceras. Si esta condición no se reconoce y no se trata, se convierte en fatal. Es por lo tanto, que una leve deficiencia de zinc en los seres humanos afecta negativamente funciones bioquímicas e inmunológicas. Por ello se tomó la decisión de establecer la ingesta diaria recomendada de zinc para los seres humanos (15 mg de zinc diariamente para hombres y mujeres adultos) (Prasad 2008).

#### Efecto del Zinc sobre la inflamación.

Estudios han dado a conocer que el zinc mejora la regulación positiva del ARNm y ADN específico vinculante para A20, un factor que inhibe la activación de NF-kB. Estos resultados sugieren que los suplementos de zinc puede conducir a regulación negativa de las citocinas inflamatorias a través de la regulación positiva de la A20 para inhibir la activación de NF-kB y mostrar que el zinc tiene efectos tanto antiinflamatorios como antioxidantes (Prasad 2007).

Funcionalmente, el zinc tiene un efecto inhibitorio sobre los receptores NMDA y por otra parte, se sabe que el zinc puede inhibir la actividad endonucleasa de la Ca<sup>2+</sup>q-Mg<sup>2+</sup>q in vitro, lo que sugiere que el zinc inhibe la fragmentación de ADN, una característica importante de la apoptosis y con esto existe una mayor supervivencia celular (Matsushita y cols 1996).

## Justificación

---

Las enfermedades cerebrovasculares son una de las principales causas de incapacidad y muerte en la población económicamente activa. Estudios han demostrado que el zinc tiene un efecto protector y profiláctico en el incremento de receptores de quimiocinas disminuyendo la respuesta inflamatoria tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en un modelo animal de experimentación como es la rata. Este trabajo contribuirá en el conocimiento de las quimiocinas después de un proceso isquémico cerebral y los posibles mecanismos de estrategia experimental que ayuden a disminuir el daño cerebral en pacientes con infarto cerebral.

## Hipótesis

---

La administración crónica de zinc previene el incremento de receptores de quimiocinas, disminuyendo la quimiotaxis de leucocitos durante un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.



## Objetivos

---

### Objetivo General

Evaluar el efecto de la administración crónica de zinc sobre los receptores de quimiocinas durante un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.

### Objetivos Específicos

1. Evaluar los niveles proteicos de CCR1, CCR2, CCR8 y CXCR4 en la corteza cerebral después de un evento hipóxico-isquémico cerebral en rata.
2. Evaluar el efecto de la administración crónica de zinc sobre los niveles proteicos de CCR1, CCR2, CCR8 y CXCR4 en la corteza cerebral después de un proceso hipóxico- isquémico cerebral en rata.
3. Evaluar el daño cerebral después de un evento hipóxico-isquémico cerebral en rata.
4. Evaluar el efecto de la administración crónica de zinc sobre el daño cerebral después de un evento hipóxico-isquémico cerebral en rata.

## Diseño de la investigación

---

### **Tipo de estudio**

- Investigación aplicada, longitudinal y observacional.

### **Definición del universo**

- Ratas macho cepa Wistar obtenidas del bioterio del CINVESTAV.

### **Tipo de muestreo**

- Aleatorio. Todos los elementos de la población tienen la misma posibilidad de ser escogidos.

### **Tamaño de la muestra**

- Para cada grupo se tendrá una  $n=3$  ratas evaluando las muestras por triplicado.

### **Diseño y tipo de muestreo**

- Probabilístico. Todos los elementos de la población tienen la misma posibilidad de ser escogidos.

### **Criterios de selección de las unidades de muestreo**

#### **Criterios de inclusión**

- Ratas de la cepa Wistar
- Ratas machos
- Peso de 180-200g

#### **Criterios de exclusión**

- Ratas de otra cepa
- Ratas hembra
- Ratas que muestren un cuadro clínico de enfermedad o algún daño no asociado con el proceso hipóxico-isquémico cerebral.

### **Criterios de eliminación**

- Ratas que muestren un cuadro clínico de enfermedad o algún daño no asociado con el proceso hipóxico-isquémico cerebral.

### **Definición del grupo control.**

- Ratas Wistar con ausencia de daño.

### **Definición de las variables y escalas de medición**

- Variable independiente: tiempo y dosis.
- Variable dependiente: determinaciones (ELISA): receptores de quimiocinas.

### **Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas**

Los valores serán la media  $\pm$  SEM de determinaciones realizadas por triplicado. Las pruebas estadísticas serán de tipo paramétricas, los datos serán analizados con una ANOVA de una vía seguida con una post-prueba Dunnet, que compara los grupos experimentales contra el control, y una *t* de Student no apareada que compara dos grupos experimentales en un tiempo determinado.

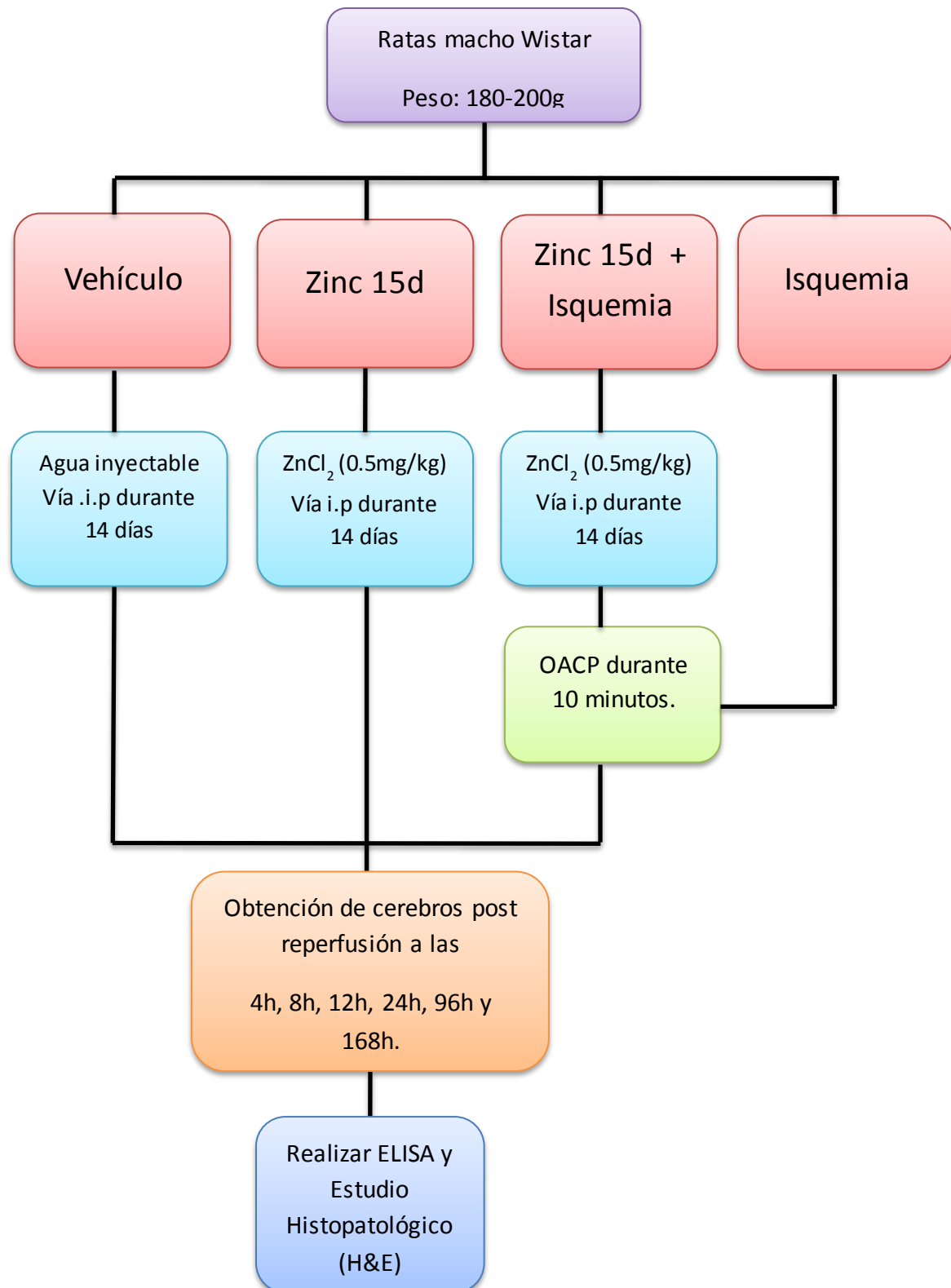
### **ASPECTOS BIOÉTICOS**

Todos los procedimientos 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. Todos los esfuerzos fueron realizados para minimizar el sufrimiento de los animales.

### **RIESGOS DE LA INVESTIGACIÓN**

- No existen riesgos en esta investigación.

## Diagrama de trabajo



# Metodología

---

## 1.-Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (180 -210g de peso corporal) obtenidas del bioterio del CINVESTAV. Los ratas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ( $23 \pm 1$  °C) y humedad ( $45 \pm 2\%$ ), ciclos de luz- oscuridad de 12 h. Alimento y agua se proporcionan ad libitum. Todos los procedimientos siguieron las normas de 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 (protocolo#109-02). Todos los esfuerzos fueron realizados para minimizar el sufrimiento de los animales. Los animales fueron sacrificados a distintas horas después del tratamiento con Cloruro de Zinc y después de haber realizado la cirugía de obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP), se utilizaron como controles ratas sometidas al estrés de la cirugía y disección de la arteria carótida primitiva, pero sin realizar su obliteración.

## 2.- Administración de zinc

Se utilizó la administración de Zn crónica intraperitoneal i.p. en una dosis de (0.5mg/kg de peso corporal, cada 24h durante 14 días.

Posteriormente las ratas se dividieron en 4 grupos diferentes para el tratamiento crónico: al primer grupo se le dio un tratamiento durante 14 días con  $ZnCl_2$  y posterior al tratamiento se extrajo la corteza temporo- parietal e hipocampo a diferentes tiempos (4h, 8h, 12h, 24h, 96h y 168h post-reperusión). El siguiente grupo recibió la misma administración de  $ZnCl_2$  durante 14 días; 24 horas después se realizó la OACP durante 10 minutos, terminada la cirugía se dejó en recuperación a los animales hasta cumplir el tiempo de extracción de cerebros a las (4h, 8h, 12h, 24h, 96h y 168h post-reperusión). El tercer grupo recibió durante 14 días una administración vía intraperitoneal de agua inyectable (vehículo) y se obtuvieron los cerebros a las horas antes mencionadas.

Finalmente, el último grupo únicamente recibió la OACP y se extrajeron las cortezas cerebrales a las mismas horas.

### **3.-Cirugía**

Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral vía i.p. (350mg/kg de peso corporal), se disectó la arteria carótida primitiva izquierda y se presionó con el fin de obstruir el flujo sanguíneo (obliteración) durante 10 minutos con ayuda de una pinza de presión para vasos sanguíneos de tipo bulldog (clamp arterial). Al término del tiempo de obliteración, se retiró la pinza y se verificó visualmente la restauración del flujo sanguíneo en la arteria (reperusión). Posteriormente, la herida se suturó y las ratas se mantuvieron bajo una fuente de calor hasta recuperarse del efecto anestésico. Los animales serán sacrificados en el tiempo post reperusión correspondiente, por dislocación cervical, para poder obtener la región temporo-parietal de la corteza cerebral y el hipocampo. Los tejidos fueron homogenizados con PBS 1X. Posteriormente, se utilizaron los homogenizados de las muestras para la evaluación bioquímica (ELISA) mencionada a continuación.

### **4.-Ensayo Inmunoenzimático ELISA**

- Cinco µg del homogenizado de las muestras se completan a un volumen final de 100 µL con buffer de carbonato para sensibilizar las placas de ELISA, y se colocan en cada pozo de la placa durante 24 horas a 4 °C.
- Posteriormente, los pozos se lavaron con PBS-Tween 0.1%, los sitios inespecíficos se bloquearon con albúmina de suero bovino 0.5% durante 20 min. Inmediatamente se lava con PBS-Tween 0.1%, y se adiciona el primer anticuerpo para cada receptor de quimiocina durante dos horas a temperatura ambiente.
- Se lava y se adiciona el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (1:1000), posteriormente se lavó con PBS-Tween y se le agrega el sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbencil-tiazolina-6-sulfónico).
- Finalmente la placa se lee en un lector de ELISA (Bio-Rad Benchmark) a 415 nm.

Los valores obtenidos fueron normalizados con respecto de su grupo control sin tratamiento.

## **5.- Estudio Histológico**

El daño celular se analizó por tinción hematoxilina- eosina en cortes coronales de cerebro de ratas en los diferentes grupos en cada uno de los tiempos del curso temporal (0h, 24h y 168h)

Se anestesió a las ratas con hidrato de cloral y se perfunden por vía intraventricular al corazón con 100 mL de PBS, seguido de 150 mL de paraformaldehído al 4% en PBS, para finalmente extraer y mantener los cerebros en fijador (paraformaldehído 4%) a 4°C.

Los cerebros fueron procesados en el equipo de inclusión en parafina ( Histoquinette Leica Microsystems, Walldorf, Germany).

Los pasos del procesamiento de tejido son:

- Fijación (formaldehído al 4%),
- Deshidratación con alcoholes (80%, 96% y 100%): Este es el proceso que tiene por finalidad la eliminación completa del agua en el espécimen tanto intracelular como extracelular, esto se lleva a cabo mediante el uso de alcohol al 80%, alcohol 96%, alcohol absoluto (100%).
- Aclaramiento (xilol absoluto) y parafina a 56 °C: Es un proceso que permite que el alcohol de los tejidos (agente deshidratante) sea reemplazado por una sustancia miscible con el medio de inclusión que se va a utilizar (parafina) ya que lo que se pretende es que el tejido se encuentre embebido con un agente químico líquido, el cual pueda disolverse en el medio de inclusión y así penetrar en el tejido. En este caso se utilizara xilol.
- Inclusión: en este caso se procede a realizar los bloques de parafina y se utilizara una parafina semidura, su punto de fusión es de 54 °C - 58 °C. Es la parafina que se emplea con mayor frecuencia en los laboratorios donde se realiza técnica histológica. De acuerdo a la

temperatura del medio, se recomienda su uso pues se pueden obtener secciones de 5 a 7  $\mu\text{m}$ .

- Posteriormente, se trasladan los bloques a una plancha de enfriamiento esto con el fin de obtener bloques más rígidos y con esto obtener mejores cortes.

- Los cortes histológicos que se realizan son de 3 micras de grosor en un micrótopo rotatorio tipo Minot (Leica RM 2135, Nussloch, Germany); estos cortes se preparan en portaobjetos con poli-L-lisina y finalmente son fijados con calor (plancha con termostato a 56-58 °C).

- Se realiza el desparafinado de los cortes histológicos en horno a 60 °C durante 30 minutos, después se va colocando la laminilla de la siguiente forma en el tren de tinción:

- Xilol 1 ---20min

- Xilol 2 ---5 min

- Alcohol-Xilol 50 % --- 10 baños

- Alcohol absoluto 1 ---10 baños

- Alcohol absoluto 2 ---10 baños

- Alcohol 96% 1 ---10 baños

- Alcohol 96% 2 ---10 baños

- Agua ---10 baños

- Hematoxilina ---10 min

- Agua ---1 min

- Alcohol ácido ---1 baño (rápido)

- Agua --- 1 min (enjuagar rápido)

- Carbonato de Litio --- 10 baños (hasta virar a azul)



-Agua --- 1 min

Dar un baño con alcohol 96% para dar la condición alcohólica al tejido

-Eosina ---15 baños

-Alcohol 96% ---10 baños

-Alcohol 96% ---10 baños

-Alcohol absoluto --- 10 baños

-Alcohol absoluto --- 10 baños

-Alcohol-xilol 50% ---10 baños

-Xilol 1 ---5 min

-Xilol 2 ---20 min

●Posteriormente se coloca el cubreobjetos para poder observar al microscopio.

## Control de calidad

---

El control de calidad metodológico y experimental se llevó a cabo mediante monitoreos previos a la realización del experimento de cuantificación, esto fue verificado con ayuda de la preparación de curvas de estándares (proteínas totales, albumina de bovino), las cuales se dieron por aceptadas cuando el coeficiente de correlación fue de 0.999, constatando de esta manera exactitud y precisión al momento de pipetear en el experimento; por otra parte se verifico la viabilidad de los reactivos a usar en cada una de las técnicas cuidando que mantuvieran valores de pH, temperatura o concentración según lo requerido, esto fue controlado preparando los reactivos horas antes de ser usados, del mismo modo se procuraron pasos metódicos para que todas las muestras tuvieran una manipulación similar y así poder evitar alteraciones al momento de obtener los resultados. Otro aspecto en el cual se tuvo cuidado fue en asegurar que todo material de laboratorio a utilizar estuviera perfectamente limpio, libre de cualquier tipo de contaminante que ocasionara interferencias en los resultados. Al momento del experimento, en la fase de la cuantificación de proteínas totales, se correlacionaron los resultados comprobando con medición de estándares que la curva de medición de proteínas no se saliera del rango establecido. En el ELISA las muestras fueron procesadas al mismo tiempo en la misma placa de estudio, quedando las muestras de un grupo experimental en la misma placa. Los controles negativos se introdujeron en un pozo con muestra, sin anticuerpo primario pero sí con anticuerpo secundario, ABTS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## Medidas de seguridad

---

En la realización de este trabajo se llevaron a cabo todas las medidas de seguridad establecidas por el LIQC.

### **Recursos humanos**

En este trabajo se formó una alumna capaz de responder a las demandas del sector salud y de investigación.

### **Recursos materiales**

El Laboratorio de Investigación Químico Clínico aportó los equipos y reactivos para su elaboración.

### **Recursos financieros**

El proyecto contó con financiamiento por VIEP, BUAP.

## Resultados

---

Dentro de los objetivos de este trabajo se tuvo el conocer el efecto de la administración crónica de zinc sobre los niveles proteicos de los receptores a quimiocinas CCR1, CCR8, CCR2 y CXCR4.

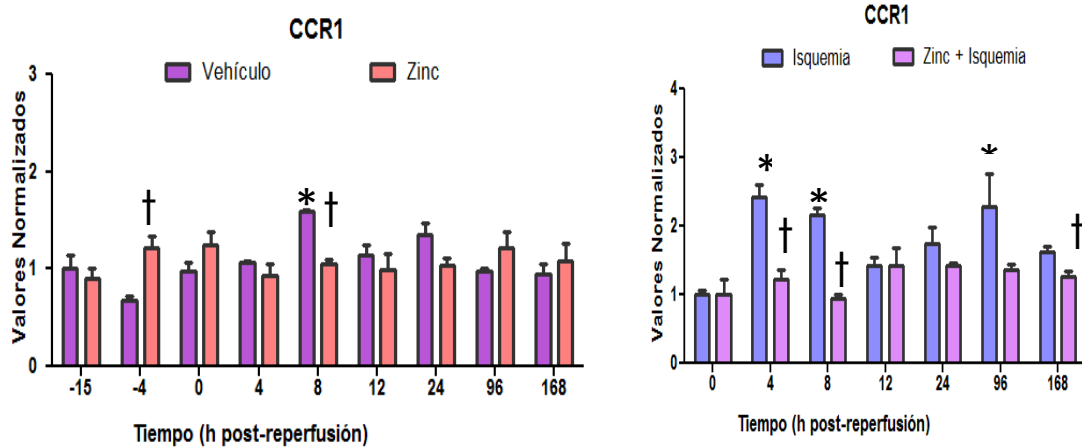
### CCR1

En el grupo vehículo se encontraron diferencias estadísticamente significativas a las 8h en un  $59 \pm 1.7\%$  comparado con el grupo control sin tratamiento.

- Mientras que en el grupo administrado con  $ZnCl_2$  se encontró un incremento de este receptor a los 11 días de administración (-4) en un  $75 \pm 10.1\%$  y una disminución a las 8h en un  $33 \pm 2.38\%$  esto comparándolos con el grupo vehículo.

- En el grupo isquemia se encontraron incrementos a las 4h post-reperfusión en un  $141 \pm 18.2\%$ , a las 8h en un  $115 \pm 10.7\%$  y a las 96h en un  $127 \pm 48.5\%$  todo esto comparado con el grupo control sin tratamiento.

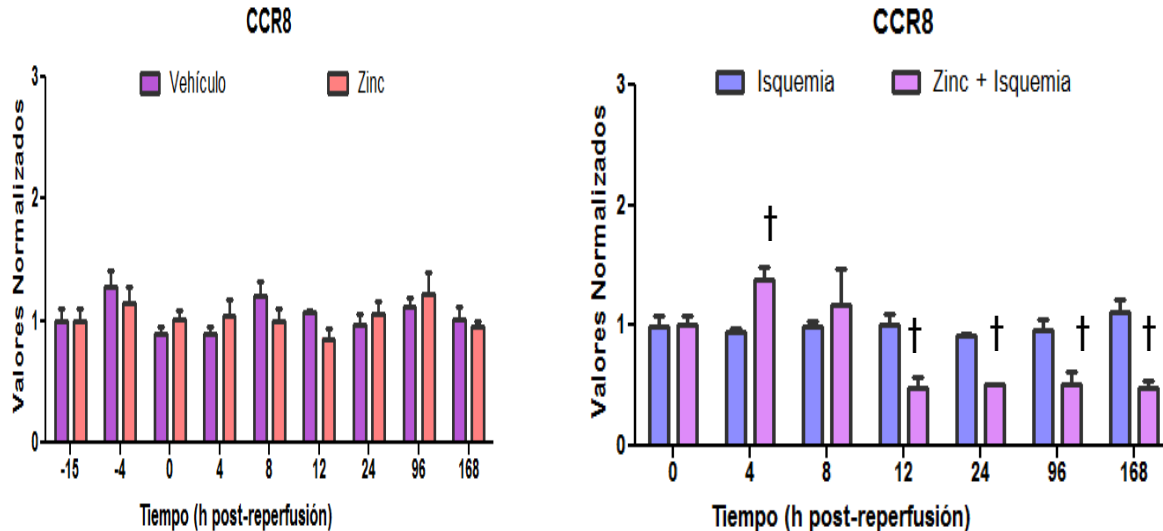
- Ahora bien en el grupo que contó con la administración de Zinc previa a la OACP se observa una disminución en los niveles proteicos a las 4h post-reperfusión en un  $47 \pm 6.6\%$ , a las 8h post-reperfusión en un  $55 \pm 1.4\%$ , así como a las 168h post-reperfusión en un  $22 \pm 5.8\%$  comparándolos con el grupo que solo recibió la OACP.



**Figura 3. Efecto de la administración crónica de Zinc sobre los niveles proteicos del receptor CCR1 tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.** Se observa el curso temporal de los niveles proteicos de este receptor. Los valores representan la media  $\pm$ SEM de 3 ratas. \* $p < 0.05$ , ANOVA con pos hoc Dunnet cuando se compara con el grupo sin tratamiento alguno,  $t p < 0.05$ ,  $t$  de Student cuando se comparan dos grupos en un mismo tiempo.

## CCR8

- En el grupo vehículo y el grupo que solo recibió la administración de Zinc no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.
- En el grupo administrado con  $ZnCl_2$  previo a la isquemia se encontró un incremento a las 4h post-reperusión en un  $47 \pm 18.3\%$ .
- A partir de las 12h post-reperusión disminuyeron los niveles proteicos en un  $51 \pm 10.6\%$ , a las 24h post-reperusión en un  $45 \pm 1.19\%$ , a las 96h post-reperusión en un  $47 \pm 7.2\%$  y finalmente a las 168h post-reperusión en un  $55 \pm 7.5\%$  comparando este grupo con el grupo que solo recibió la OACP.

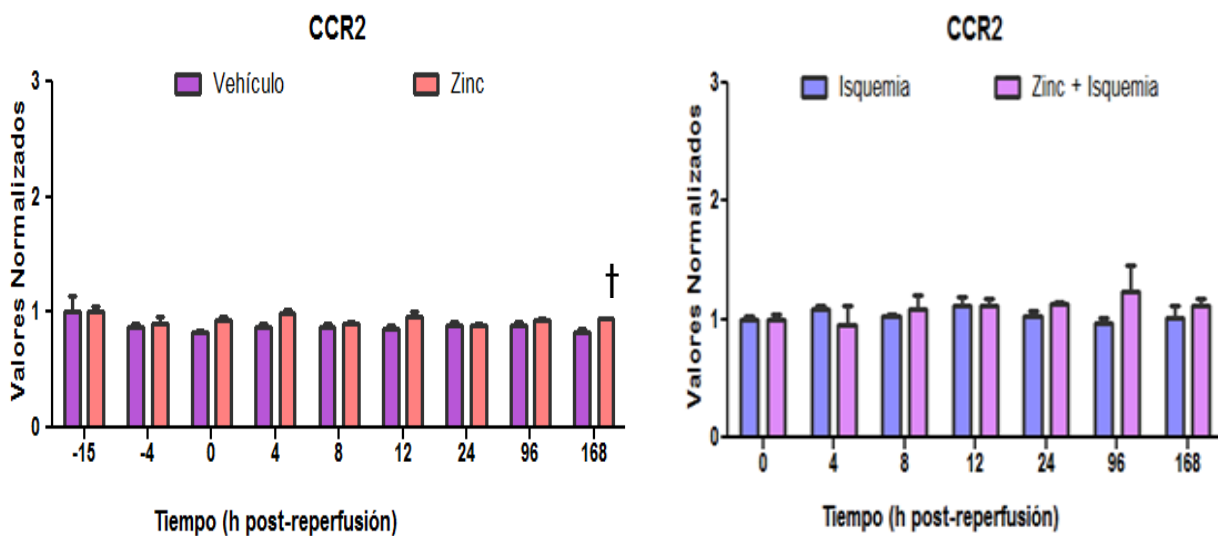


**Figura 4. Efecto de la administración crónica de Zinc sobre los niveles proteicos del receptor CCR8 tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.** Se observa el curso temporal de los niveles proteicos de este receptor. Los valores representan la media  $\pm$ SEM de 3 ratas. \* $p < 0.05$ , ANOVA con pos hoc Dunnet cuando se compara con el grupo sin tratamiento alguno,  $t < 0.05$ ,  $t$  de Student cuando se comparan dos grupos en un mismo tiempo.

## CCR2

●En el grupo que recibió solamente la administración de  $ZnCl_2$  se observó un incremento en los niveles proteicos de este receptor a las 168h en un  $13 \pm 3.14\%$  comparado con el grupo vehículo.

●En el grupo que recibió la OACP y el grupo que recibió la administración de  $ZnCl_2$  previa a la OACP no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los niveles proteicos de este receptor.



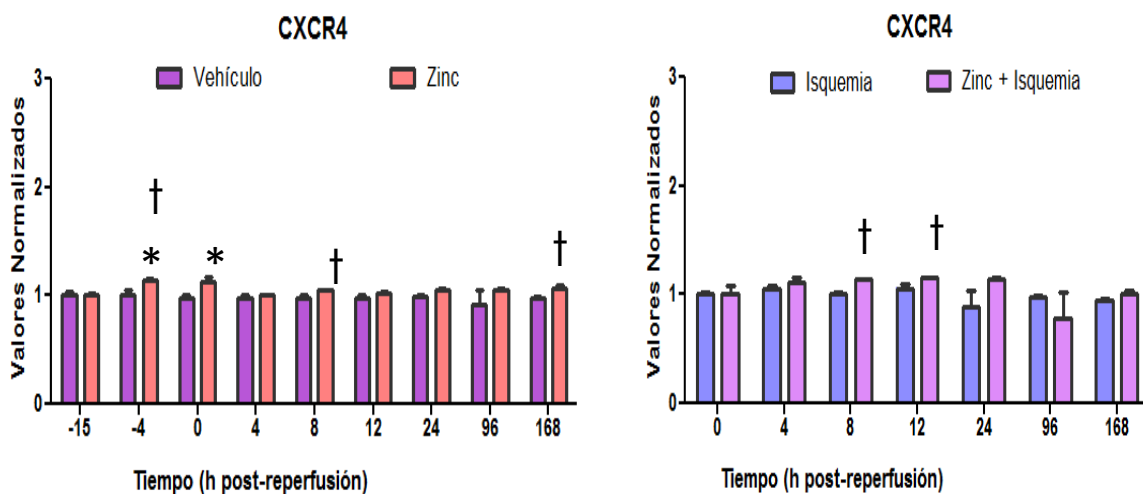
**Figura 5. Efecto de la administración crónica de Zinc sobre los niveles proteicos del receptor CCR2 tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.** Se observa el curso temporal de los niveles proteicos de este receptor. Los valores representan la media  $\pm$ SEM de 3 ratas. \* $p < 0.05$ , ANOVA con pos hoc Dunnet cuando se compara con el grupo sin tratamiento alguno,  $t < 0.05$ ,  $t$  de Student cuando se comparan dos grupos en un mismo tiempo.

## CXCR4

●En el grupo que recibió únicamente la administración de  $ZnCl_2$  se encontró un incremento de los niveles proteicos de este receptor a los 11 días de la administración (-4) en un  $14 \pm 1.2\%$  así también al tiempo 0h en un  $12 \pm 4.5\%$  comparados con el grupo control sin tratamiento.

●De igual manera en el grupo con la administración de  $ZnCl_2$  a los 11 días de administración (-4) se obtuvo un incremento en un  $14 \pm 5.08\%$  comparado con el grupo vehículo. Durante el curso temporal se observó un incremento a las 8h en un  $6 \pm 1.8\%$  y finalmente un incremento a las 168h en un  $9 \pm 3.3\%$  estos también comparado con el grupo vehículo.

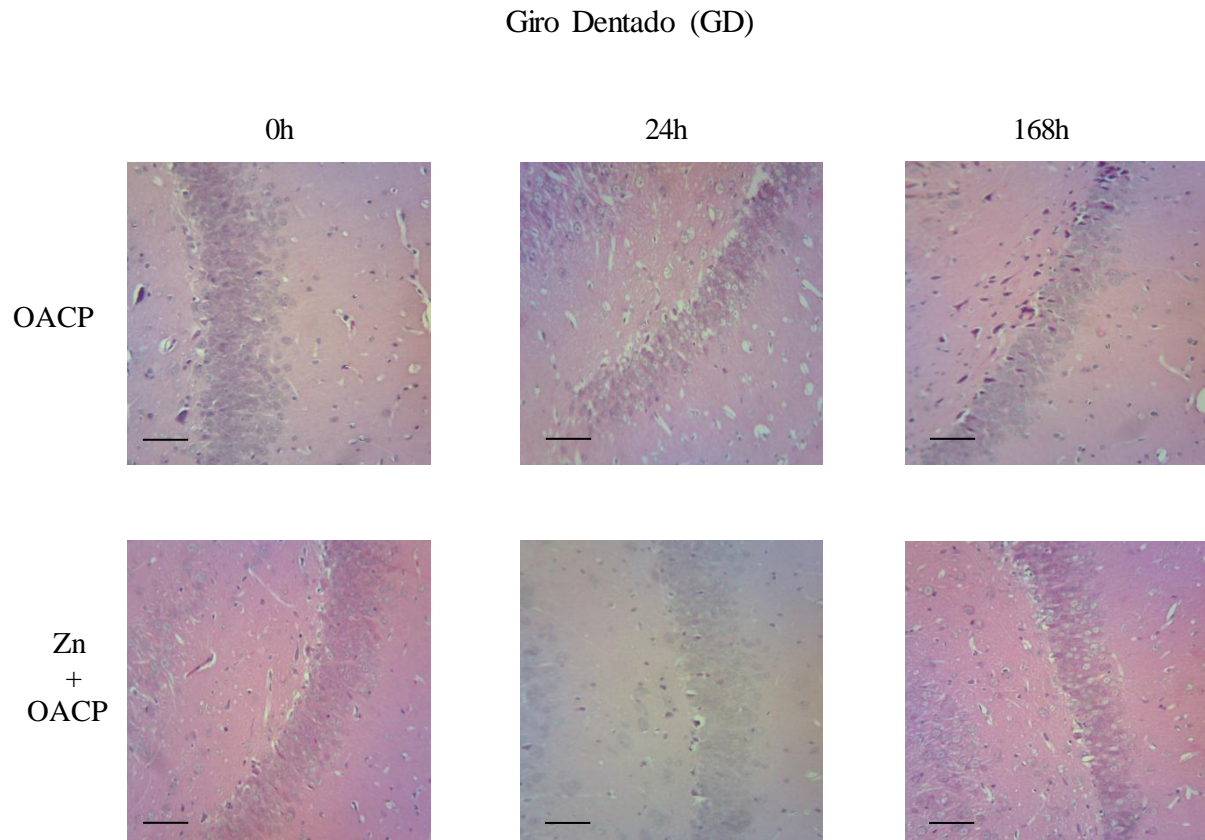
●En el grupo que recibió la administración de  $ZnCl_2$  previa a la OACP se encontraron incrementos en los niveles proteicos de este receptor a las 8h post-reperfusión en un  $13 \pm 2.6\%$  y a las 12h post-reperfusión en un  $8 \pm 2.5\%$  esto comparándolos con el grupo que solo recibió la OACP.



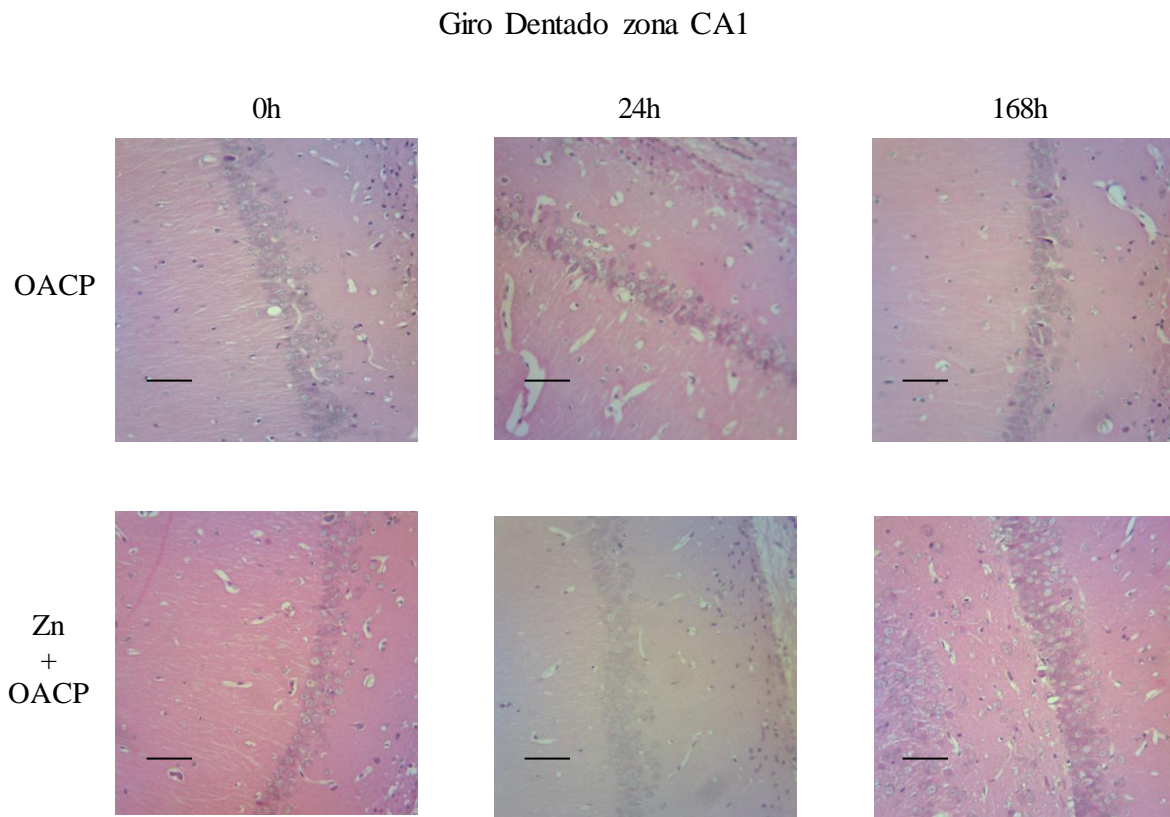
**Figura 6. Efecto de la administración crónica de Zinc sobre los niveles proteicos del receptor CXCR4 tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.** Se observa el curso temporal de los niveles proteicos de este receptor. Los valores representan la media  $\pm$ SEM de 3 ratas. \* $p < 0.05$ , ANOVA con pos hoc Dunnet cuando se compara con el grupo sin tratamiento alguno,  $t < 0.05$ ,  $t$  de Student cuando se comparan dos grupos en un mismo tiempo.



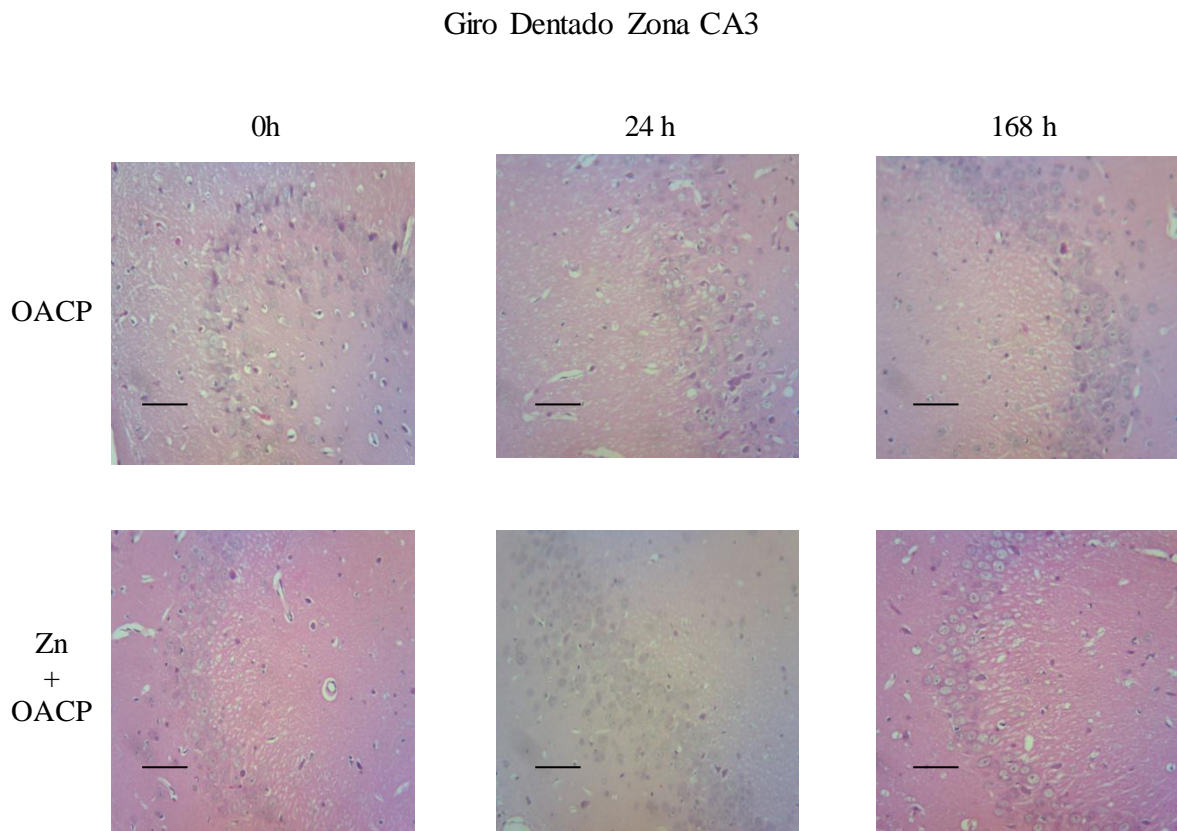
Los resultados obtenidos del estudio histopatológico mediante tinción de Hematoxilina y Eosina se muestran en las siguientes imágenes:



**Figura 7.** Tinción de hematoxilina-eosina en giro dentado de ratas control, con administración crónica de zinc, con OACP y con administración crónica de zinc previa a la OACP. Cortes de tejidos de 3  $\mu$  incluidos en parafina teñidos con hematoxilina-eosina a las 24h y 168 h post reperusión.



**Figura 8. Tinción de hematoxilina-eosina en donde se observa la zona CA1 del giro dentado de ratas control, con administración crónica de zinc, con OACP y con administración crónica de zinc previa a la OACP. Cortes de tejidos de 3  $\mu$  incluidos en parafina teñidos con hematoxilina-eosina a las 24h y 168 h post reperfusion.**



**Figura 9.** Tinción de hematoxilina-eosina en donde se observa la zona CA3 del giro dentado de ratas control, con administración crónica de zinc, con OACP y con administración crónica de zinc previa a la OACP. Cortes de tejidos de 3  $\mu$  incluidos en parafina teñidos con hematoxilina-eosina a las 24h y 168 h post reperusión.

## Discusión

---

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la administración crónica de zinc previa a la OACP, disminuyó los niveles proteicos de CCR1 a partir de la fase temprana del proceso isquémico, con la sola administración crónica de zinc los niveles proteicos de CCR1 se mantienen en sus niveles basales, por el contrario en el grupo que solo recibió la OACP los niveles proteicos de este receptor son mayores tanto en la fase temprana como tardía.

Es por ello que al disminuir los niveles proteicos de este receptor también disminuirá la quimiotaxis de leucocitos por parte de CCL3, la cual atrae principalmente macrófagos al sitio de daño los cuales exacerbarían el daño y aumentarían el riesgo de muerte neuronal ya que las quimiocinas desempeñan un papel importante en la organización y migración de leucocitos en condiciones normales, así como durante las respuestas inflamatorias exacerbando el daño (Belmadani y cols 2006).

La administración crónica de zinc previa a la OACP mostro una disminución en los niveles proteicos de CCR8 a partir de las 12h post-reperfusión hasta el séptimo día lo cual nos habla de una marcada neuroprotección por parte del zinc en la fase tardía del proceso isquémico.

Esta protección se estará dando ya que al verse disminuido este receptor disminuirá la unión con su ligando CCL4 por lo cual no se llevara a cabo la transmisión de la señal y posterior quimiotaxis de leucocitos al sitio de daño durante la fase tardía, de la cual es característica la muerte celular, por lo tanto la cito arquitectura se está protegiendo.

CCL3 y CCL4 pueden iniciar diversas respuestas que regulan tanto la inflamación aguda y crónica junto a la interacción de sus receptores CCR1 y CCR8 e inducir la adhesión de los leucocitos circulantes para su extravasación a través del endotelio (Blanchet y cols 2012)

Con la sola administración crónica de zinc se observa un aumento a las 168 h de la administración ya que se puede ver cierto preconditionamiento del sistema por parte de la unión CCR2/CCL2 esta unión se ve favorecida por el zinc ya que se encontró que los niveles proteicos de este receptor se mantuvieron en sus niveles basales con la administración de zinc previa a la OACP en todo el curso temporal.

CCR2 se encuentra en prácticamente todos los tipos de células del sistema nervioso central, incluyendo neuronas, células gliales, endoteliales y células inmunes, y es el único receptor conocido para CCL2, sin embargo el llevar a cabo estímulos de preconditionamiento del organismo ante un proceso hipóxico-isquémico las quimiocinas en general y CCL2 en particular juega un papel importante en la inducción de tolerancia isquémica, actuando como un mediador de señalización para la inducción de respuestas de adaptación en las células del cerebro, esto con el fin de dar una oportuna protección ante un futuro evento isquémico (Stowe y cols 2012)

A esta unión se le confiere la función de advertir al sistema si en algún momento existe un proceso que requiera la quimioatracción de leucocitos al sitio de daño en este caso (CCR2/CCL2) mostrara una mayor quimiotaxis por monocitos. CCR2 junto a su ligando CCL2, es conocido por promover la quimiotaxis de monocitos progenitores hematopoyéticos a los sitios de la inflamación en el cerebro. En modelos experimentales de accidente cerebrovascular, CCL2 ha mostrado una regulación positiva en las zonas isquémicas además se ha encontrado acumulación de CCL2 en el espacio perivascular de la microvasculatura cerebral, el cual se retransmite activamente a través de la barrera hematoencefálica, y se presenta en la membrana plasmática de las células endoteliales, donde actúa como un importante quimioatrayente para leucocitos (Andres y cols 2011)

Se observó un ligero incremento en los niveles proteicos de CXCR4 (a los 11 días) con la sola administración de zinc, CXCR4 se expresa en los sitios de la migración

neuronal en el hipocampo y la zona media de la neocorteza dándole con esto un papel importante en el desarrollo cerebral, además CXCR4 junto a su ligando CXCL12 se expresa dentro de la corteza primaria y en las meninges que intervienen en el desarrollo del hipocampo, sugiriendo con esto una acción de señalización en el hipocampo en desarrollo por parte de las meninges que recubren el Giro Dentado(Lu y cols 2002). En el grupo con administración crónica de zinc previa a la OACP se encontraron incrementos en los niveles proteicos de este receptor en la fase temprana del proceso isquémico esto debido a que CXCR4 se encuentra en regiones proliferativas del sistema nervioso central en desarrollo y CXCL12 el ligando para CXCR4 se ha observado que se expresa en astrocitos, microglía y neuronas después de una lesión cerebral. La señalización mediada por quimiocinas a través del receptor CXCR4 es de gran importancia en la orientación de la migración de las poblaciones de progenitores neuronales durante el desarrollo; por otra parte, las quimiocinas modulan la actividad sináptica durante la neurogénesis en adultos ya que CXCL12 aumenta la transmisión GABAérgica de progenitores neuronales y con esto además de ayudar a la proliferación neuronal también interviene en la viabilidad y correcto funcionamiento de las nuevas neuronas(Ardelt y cols 2013) por el contrario en el grupo que recibió solamente la OACP los niveles proteicos de este receptor se mantuvieron en su estado basal.

Esto quiere decir que la administración crónica de zinc favorece la proliferación de receptores de quimiocinas benéficas como lo es CXCR4 que junto a su ligando CXCL12 cuenta con funciones de neuroprotección y neurogénesis.

La administración crónica de zinc previno la muerte por apoptosis que se desencadena tras un proceso isquémico a las 24h y 7 días post reperusión, esto se observa con la disminución de las células picnóticas características de la apoptosis en CA1 y CA3 del hipocampo esto se corrobora con diversos estudios con administración subaguda de cloruro de zinc los cuales han mostrado mantener la estructura celular del hipocampo en las zonas CA1 y CA3, Giro dentado y en las neuronas piramidales de la capa V de la corteza cerebral a las 24h post-reperusión (Blanco y cols 2013)

Sin embargo se puede observar una acumulación de zinc en la corteza cerebral y esto se relaciona con el aumento en la necrosis, la cual se observa en CA1 y CA3 en la fase tardía (168h) esto debido a que el zinc acumulado puede ser citotóxico produciendo daño en neuronas piramidales y granulares que puede llegar a la necrosis neuronal no obstante estudios experimentales han demostrado que la isquemia cerebral focal promueve la neurogénesis en la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado induciendo la migración de neuroblastos (Lan y cols 2008).

## Conclusión

---

Los resultados obtenidos durante este trabajo muestran que la administración crónica de zinc previno el incremento en los niveles proteicos de los receptores de quimiocinas pro-inflamatorias (CCR1, CCR8 y CCR2) disminuyendo con esto el proceso inflamatorio ocasionado por la infiltración leucocitaria, llevando a una consiguiente disminución de la muerte neuronal. También se observó que la administración crónica de zinc mostro un aumento en los niveles proteicos de CXCR4 que junto a su quimiocina CXCL12 participan en la regeneración y sobrevivencia neuronal.

Con la premisa anterior se concluye que la administración crónica profiláctica de zinc disminuye el proceso inflamatorio causado por la OACP permitiendo la regeneración y sobrevivencia neuronal.



## Perspectivas

---

- Determinar de manera cualitativa y cuantitativa la infiltración leucocitaria al sitio de daño.
- Determinar de manera cuantitativa a las metalotioneínas.
- Determinar los niveles de zinc en corteza cerebral.

## Bibliografía

---

- 1.- INEGI. (Consulta 08 de abril de 2015)  
<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>
- 2.-Martínez E, Fernández M, Pagola I, Irimia P. «Enfermedades cerebrovasculares.»  
Medicine, 2011: 4871-4881.
- 3.- Wooddruff, Trent M, Thundiyil J, Tang S, Sobey C, Taylor S, Arumugam T.  
«Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke.»  
Molecular Neurodegeneration, 2011: 1-19.
- 4.- Donnan G, Fisher M, Macleod M, Davis S. «Stroke». Lancet. 2008: 1612-1623.
- 5.- Hossmann K.« Cerebral vascular disorders: Circulation and metabolism».Cereb Blood,  
1982: 1-14
- 6.- Hossmann K.« Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia». AnnNeurol.  
1994: 557-565.
- 7.- Brouns R, De Deyn P. «The complexity of neurobiological processes in acute  
ischemic stroke».Neurol, 2009: 483-495.
- 8.- Markus R, Reutens D, Kazui S, Read S, Wright P, Pearce D, Tochon-Danguy H,  
Sachinidis J. «Hypoxic tissue in ischaemic stroke:Persistence and clinical consequences of  
spontaneous survival». Brain, 2004: 1427-1436.
- 9.-Doussoulin S,A. «As underlying the neurorehabilitation from the stand from the  
standpoint of neuroplasticity».Arch Neurocién, 2011:216-222.
- 10.-Planas A,M.«Alteraciones de la membrana celular y de la sintesi de proteínas en  
modelos experimentales de isquemia cerebral: implicaciones farmacologicas para el  
tratamiento de la patologia isquemica». Neurologia, 1997:405-417.

- 11.-Perry V, H.« A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation». *Journal Neuroimmunol* 1998: 113-21.
- 12.- Cuenca M,Brea D, Segura T, Galindo M, Anton D, Agulla J, Castillo J, Jordan J.«la inflamación como agente terapéutico en el infarto cerebral : respuesta inflamatorio celular y mediadores inflamatorios». *Neurol*, 2010:349-359.
- 13.- Castillo J. «Luces y sombras de la neuroprotección en la isquemia cerebral»*Revista Neuropsiquiatria*, 2001:27-31.
- 14.- Che X,Ye W, Panga L, Wu D, Yang G.«Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice». *Brain Res*, 2001:171-177.
- 15.- Mirabelli M, Braunersreuther V, Luciano G, Dallegri F, Quercioli A, Veneselli E, Mach F, Montecucco F. «CC and CXC chemokines are pivotal mediators of cerebral injury in ischaemic stroke». *Schattauer*, 2011:409-420.
- 16.- Fanory N, Montoya C. «Las quimiocinas: citocinas proinflamatorias y reguladoras del trafico celular». *IATREIA*, 2001: 57-72.
- 17.-Pello O, Rodriguez J, Martinez L, Mellado M. «Modulacion del trafico leucocitario: Papel de las quimiocinas y de los opioides». *Inmunologia*, 2006: 39-49.
- 18.-Barrett J.«Chemokines». *Blood*, 1997: 909-928.
- 19.- Stuart M, Baune B. «Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: a systematic review of biomarker studies» *Neuroscience*, 2014: 93-115.
- 20.- Williams J, Holman D, Klein R.«Chemokines in the balance: maintenance of homeostasis and protection at CNS barriers ». *Cellular Neuroscience*, 2014: 1-12.

- 21.- Mojsilovic J, Callaghan D, Cui H, Dean C, Zhang W. «Hypoxia-inducible factor-1(HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5(CCL12)in astrocytes». *Neuroinflammation*, 2007:1-15.
- 22.- Huang G, Edwards A, Tsai C, Lee Y, Peng L.«Ectopic cerebellar cell migration causes maldevelopment of purkinje cells and abnormal motor behaviour in CXCR4 null mice» *Journal pone*, 2014:1-10.
- 23.- Lu M, Grove E, Miller R. «Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor». *PNAS*, 2002:7090-7095.
- 24.- Chasapis C, Loutsidou A, Spiliopoulou C, Stefanidou M. «Zinc and human health: an update». *Arch Toxicol*, 2012: 521-534.
- 25.- Plum L, Rink L, Haase H. «The essential toxin: impact of zinc on human health». *Environ.Res.Public Health*, 2010:1342-1365.
- 26.- Bancila V, Nikonenko I, Dunant Y, Bloc A. «Zinc inhibits glutamate release via activation of pre-synaptic KATP channels and reduces ischaemic damage in rat hippocampus». *Neurochemistry*, 2004:1243-1258.
- 27.- Gower S, Levenson C. «Zinc in the central nervous system: from molecules to behavior». *Biofactors*, 2012:186-193.
- 28.- Adamo A, Oteiza P. «Zinc deficiency and neurodevelopment: the case of neurons». *Biofactors*, 2010:117-124.
- 29.- Foster M, Samman S. «Zinc and regulation of inflammatory cytokines: implications for cardiometabolic disease». *Nutrients*, 2012:676-694.
- 30.- Prasad A.«Zinc in human health: effect of zinc on immune cells». *Mol.Med*, 2008:353-357.
- 31.- Prasad A. «Zinc: Mechanisms of host defense». *J Nutrition*, 2007:1345-1349.

- 32.- Matsushita K, Kitagawa K, Matsuyama T, Ohtsuki T, Taguchi A. «Effect of systemic zinc administration on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus». *Brain Research*, 1996: 362-365.
- 33.- Belmadani A, Tran P, Ren D, Miller R. «Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation» *J. Neurosci*, 2006: 3182-3191.
- 34.- Blanchet X, Longier M, Weber C, Koenen R, Hundelshausen P. «Touch of chemokines» *Immunology*, 2012: 1-18.
- 35.- Stowe A, Wacker B, Cravens P, Perfater J, Li M, Hu R, Freie A, Gidday J. «CCL2 upregulation triggers hypoxic preconditioning-induced protection from stroke» *J. Neuroinflammation*, 2012: 1-12.
- 36.- Andres R, Choi R, Pendharkar A, Gaeta X. «The CCR2/CCL2 interaction mediates the transendothelial recruitment of intravascularly delivered neural stem cells to the ischemic brain» *Stroke*, 2011: 2923-2931.
- 37.- Ardelit A, Bhattacharyya B, Belmadani A, Ren D, Miller R. «Factor-1 de crecimiento derivado del estroma (CXCL12) modula la transmisión sináptica de las neuronas inmaduras durante la reparación cerebral post-isquémica » *Exp. Neurol*, 2013: 246-253.
- 38.- Blanco López P, Soto G, Martínez D, Rubio H, González J, Piña C, León A. «Subacute zinc administration and L-NAME caused an increase of NO, zinc, lipoperoxidation and caspase-3 during a cerebral hypoxia-ischemia process in the rat» *Oxidative Medicine and cellular longevity*, 2013: 1-10.
- 39.- Lan R, Gang Z, Chopp M. «Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone» *Neuropharmacology*, 2008: 345-352.

## Apéndices

### 1.-REACTIVO DE COOMASIE

<b>Acido perclórico 3%</b>	200mL
<b>Azul brillante G-250</b>	0.12g

Se prepara una solución de ácido perclórico 3%, para 200 ml de esta solución se agrega 0.12 g de azul brillante G-250 y se disuelve con agitación constante 30 minutos, una vez disuelto se filtra y se lee en el espectrofotómetro a 465 nm. La absorbancia del colorante debe estar entre 1.3 y 1.5.

### 2.- CURVA DE PROTEINAS TOTALES

[ ] mg/μL	ALBUMINA	AGUA DESTILADA	COOMASIE
<b>1</b>	1 μL	499 μL	500 μL
<b>2.5</b>	2.5 μL	497.5 μL	500 μL
<b>5</b>	5 μL	495 μL	500 μL
<b>10</b>	10 μL	490 μL	500 μL
<b>Blanco</b>	---	500 μL	500 μL

Se lee en espectrofotómetro a 620 nm.

### 3.-BUFFER DE CARBONATOS PARA SENSIBILIZAR LA PLACA DE ELISA

<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	0.795g
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	1.465g
<b>NaN<sub>3</sub></b>	0.1g
<b>H<sub>2</sub>O</b>	50 ml volumen final

## 4.- ABTS (Para preparar 500ml)

<b>Acetato de sodio</b>	6.805g
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	3.459g
<b>ABTS</b>	0.55g

Ajustar pH final a 4.2 utilizando ácido acético.

## 5.-PBS

<b>KCl</b>	0.020g
<b>NaCl</b>	8.064g
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.1633g
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1.1498g
<b>Agua destilada</b>	1000mL

A 900 ml de agua destilada agregar las sales, regular el pH con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N cuando el pH este entre 7.2 y 7.4 aforar a 1L.