



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

**Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Análisis Clínicos**

**“Efecto de la administración subaguda de zinc
sobre el estrés nitrosativo, el aprendizaje y la
memoria tras un proceso hipóxico-isquémico
cerebral en rata”**

Tesis presentada como requisito para obtener el título
de licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Presenta:

pQFB Ana Karina Aguilar Peralta

Directora de tesis

D.C. Bertha Alicia León Chávez

Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas

Asesor Metodológico

D.C. Ilhuicamina Daniel Limón-Pérez de León

Laboratorio de Neurofarmacología

Junio de 2015

Dedicatoria

**A ti Margarita que me cuidas y bendices desde el cielo...
Desearía que pudieras estar aquí y decirme las palabras correctas,
en el momento correcto, así eras tú.**

**Mi pequeña Alison con tu amplia sonrisa...
Inundas de felicidad los momentos que estoy contigo,
haces que me sienta tranquila y más joven...**

Agradecimientos

Parece que fue hace 4 años y algunos meses que llegue al LIQC, temerosa y callada, sin conocer a alguien allí, me aventure a trabajar en un lugar que era completamente ajeno a mí, un lugar en el que he conocido a muchas personas, que ya no están y otras más que se integraron, aprendí a trabajar en arduas jornadas, en equipo, por mí misma y que también te puedes divertir mientras trabajas.

Durante toda esta aventura de la universidad muchas personas estuvieron a mi lado de las cuales aprendí muchas cosas y que a pesar de que ya no están tengo un buen recuerdo de ellas, a las que les agradezco por compartir un poco de su esencia conmigo. Tengo mucho que decir, pero poco espacio, así que gracias a:

A mi madre la mujer más fuerte y valiente que conozco, quien nunca se rinde y da todo por sus hijos... me has enseñado tanto y lo que te falta eres mi modelo a seguir, espero a que llegue el día en el que pueda regresar un poco de lo mucho que me has dado... todo lo que tengo te lo debo a ti y quien soy ahora es gracias a ti...

A mi tía, gracias por ser mi segunda madre, una gran consejera, desde muy pequeña me adoptaste como tu hija y yo como mi mamá, gracias por todo tía, por ser parte fundamental en mi vida...

A mi hermana y mejor amiga, quien sabe casi todo de mi vida, quien me animaba siempre a seguir adelante, me regaña aunque es más pequeña y me ha demostrado con su ejemplo lo fuerte que puede llegar a ser una mujer aun siendo tan joven e inocente como tú lo eres...

A mi familia gracias por las palabras de ánimo y las porras en todo este tiempo, mis hermanos (Miguel y Leonardo), mis primos (Eduardo, Manuel, Luis y Carlos), mis tíos (Alejandra, Luis y Gerardo).

A mis amigos y compañeros del laboratorio (Jesús, Wendy, Ahuatzin, Lupita, Omar, Mary, Vic, Lupita García, Tino, Celia y Lupita Soto) por su apoyo y ayuda cuando lo necesité, con dudas experimentales, teóricas y personales, por todo esto y lo que falta gracias.

Al hombre más importante en mi vida (Alejandro G.V.), quien ha estado conmigo en las buenas, las malas y las peores, desde la uni, en el lab, los seminarios, la tesis y uff lo que falta, gracias por todo. Eres una gran persona en todos los aspectos y me siento muy afortunada de haberte encontrado en este

amplio mundo, que compartas mucha de tu esencia conmigo, recuerda que aún nos falta mucho en el camino que ya empezamos...

A mi comisión revisora por aceptar el proyecto y aportar parte de sus conocimientos y experiencia, para que este trabajo se complementara aun más. Gracias al D.C. Brambila (por brindarme confianza, sus buenos consejos y disponibilidad de tiempo), D.C. Victorino (por los consejos, el apoyo y ánimos para seguir adelante en este camino rumbo a la investigación) y al M.C. Gonzalo (por su disponibilidad y amabilidad de formar parte del jurado de último momento y que todo siguiera según lo planeado), a todos e individualmente gracias.

A la M.C. Maricela Torres y Soto (por su cariño, su ánimo de siempre y los regaños cuando los requerí).

A la Dra. Alice por permitirme trabajar aquí, ser parte de su grupo de trabajo, por confiar en mi forma de trabajar y dejarme un proyecto tan bonito del cual aprendí, me divertí y sufrí. Gracias por compartir sus conocimientos conmigo y poder absorber un poco de ellos, es usted una gran mujer, profesionista y docente.

Al Mtro. Ricardo Villegas, que sin conocerme respondía mis e-mails con saludos y artículos que le solicitaba me ayudara a descargar, los cuales me ayudaron para la elaboración de la tesis.

Al D.C. Daniel Limón por el préstamo del laberinto acuático de Morris cuando lo requerí y sobre todo por los regaños que me merecía y que de eso aprendí que debo hacer bien las cosas.

Y un especial agradecimiento a los 43 pequeños seres, sin los cuales no podría tener este trabajo de tesis, quienes sin saberlo me ayudaron enormemente y que donde sea que estén en el cielo de las ratas me disculpen por lo que les hice o si en algún momento las dañe.

Y bueno, muchas personas que faltan pero que saben que están aquí gracias...

Como parte de las actividades durante la elaboración de esta tesis se participó en:

8ª Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica

Trabajo No. 114

La inhibición de óxido nítrico revierte el déficit de la memoria después de un proceso transitorio de hipoxia-isquemia cerebral en la rata.

¹Aguilar-Peralta A.K, ¹Toxqui-Xiqui, V., ¹González Vázquez, A., ¹Medina Carrera, J., ¹Blanco-Álvarez V., ¹González-Camacho, E.B., ¹Piña-Leyva, C. ¹Soto-Rodríguez, G., ²Martínez-Fong, D., ³González-Barrios, JA, ⁴Ugarte A., ¹Torres y Soto, M., ¹León-Chávez, B.A.

¹Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ²Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, ³Laboratorio de Genómica, Hospital 1º de Octubre, ISSSTE, ⁴Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. bertha.leon@correo.buap.mx



Administración subaguda de zinc disminuye el estrés nitrosativo manteniendo el aprendizaje y memoria durante un proceso hipóxico-isquémico cerebral en ratas

Aguilar Peralta AK, Toxqui-Xiqui V, Piña-Leyva C, Blanco-Álvarez VM, Martínez-Fong D, Limón Pérez de León DI, González-Barrios JA, González-Vázquez A, Medina Carrera J, León-Chávez BA.



Inhibición del óxido nítrico previene la lipoperoxidación y pérdida de procesos cognitivos durante un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.

González Vázquez A, Aguilar Peralta AK, Toxqui Xiqui V, Medina Carrera J, Soto-Rodríguez G, Piña-Leyva C, Martínez-Fong D, Limón Pérez de León D, González-Barrios JA, León-Chávez BA.



Efecto de la administración subaguda de zinc sobre el estrés nitrosativo, el aprendizaje y la memoria tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata

Aguilar Peralta AK, González-Vázquez A, Martínez-Fong D, Limón Pérez de León DI, León-Chávez BA.



RATA HEMBRA WISTAR INFANTIL MEJORA EL APRENDIZAJE Y MEMORIA DESPUÉS DE UNA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE ZINC.

Amayrany Díaz Ruiz¹, Absalom Guinto Marquez¹, Constantino Tomas Sanchez¹, Ana Karina Aguilar Peralta¹, Daniel Martínez Fong², Daniel I. Limón¹, Juan Antonio González Barrios³ y Bertha Alicia León Chávez¹¹ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas, ²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN, ³Hospital Regional 1o de Octubre, ISSSTE.



Óxido Nítrico influye en el aprendizaje y la memoria tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata

González Vázquez A., Aguilar Peralta AK, Piña-Leyva C, Martínez-Fong D, Limón Pérez de León, León-Chávez BA.



Parte de estos resultados fueron publicados en:

Neural Plasticity Impact Factor 3.608

About this Journal Submit a Manuscript Table of Contents

Journal Menu

- About this Journal
- Abstracting and Indexing
- Advance Access
- Aims and Scope
- Article Processing Charges
- Articles in Press
- Author Guidelines
- Bibliographic Information
- Citations to this Journal
- Contact Information

Research Article

Prophylactic Subacute Administration of Zinc Increases CCL2, CCR2, FGF2 and IGF-1 Expression and Prevents the Long-Term Memory Loss in a Rat Model of Cerebral Hypoxia-Ischemia

Victor Manuel Blanco-Alvarez, Guadalupe Soto-Rodriguez, Juan A. Gonzalez-Barrios, Daniel Martinez-Fong, Eduardo Brambila, Maricela Torres-Soto, Ana Karina Aguilar-Peralta, Alejandro Gonzalez-Vazquez, Constantino Tomas-Sanchez, Ilhuicamina Daniel Limon, Jose Ramon Eguibar, Araceli Ugarte, Jeanett Hernandez-Castillo, and Bertha Alicia Leon-Chavez

Received 6 February 2015; Revised 30 May 2015; Accepted 1 June 2015

Academic Editor: Preston E. Garraghty

Provisional PDF

Prophylactic subacute administration of zinc increases CCL2, CCR2, FGF2 and IGF-1 expression and prevents the long-term memory loss in a rat model of cerebral hypoxia-ischemia

¹Victor-Manuel Blanco-Alvarez, ¹Guadalupe Soto-Rodriguez, ²Juan-Antonio Gonzalez-Barrios, ³Daniel Martinez-Fong, ¹Eduardo Brambila, ¹Maricela Torres-Soto, ¹Ana Karina Aguilar-Peralta, ¹Alejandro Gonzalez-Vazquez, ¹Constantino Tomás-Sanchez, ¹Daniel I. Limón, ⁴Jose Ramon Eguibar, ⁴Araceli Ugarte, ¹Jeanett Hernandez-Castillo, ¹Bertha Alicia Leon-Chavez.

¹Facultad de Ciencias Químicas, BUAP, 14 sur y Av. San Claudio, 72570, Puebla, Pue. México

²Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital regional 1° de Octubre, ISSSTE, Avenida Instituto Politécnico Nacional #1669, 07760. México D. F., México.

³Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 14-740, 07000 México D.F., México.

⁴Instituto de Fisiología, BUAP, 14 sur 6301, Puebla, Pue. México

Índice

Lista de abreviaciones	7
Lista de imágenes.....	9
Resumen.....	10
Marco teórico.....	12
Justificación	33
Hipótesis.....	34
Objetivos	35
Diseño de la investigación	36
Diagrama de trabajo	39
Metodología.....	40
Control de calidad	46
Medidas de seguridad.....	47
Resultados	48
Discusión de resultados.....	59
Conclusión	63
Perspectivas.....	64
Bibliografía	65
Apéndice	76

Lista de abreviaciones

4-HDA	4-Hidroxi alquenales
4-HNE	4- Hidroxi nonenales
Ac	Adenilato ciclasa
AIT	Accidente isquémico transitorio
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ATP	Adenosin trifosfato
AVC	Accidente vascular cerebral
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BUAP	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
CA1	Cornu Ammonis 1
CA3	Cornu Ammonis 3
Ca ²⁺	Calcio
CAM	Calmodulina
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Cl ⁻	Cloruro
Cyt c	Citocromo c
DAG	Diacil glicerol
DG	Giro dentado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	Desviación estándar
E	Este
eNOS	Sintasa del óxido nítrico endotelial
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
Glu	Glutamato
GTP	Guanosin trifosfato
K ⁺	Potasio
iNOS	Sintasa del óxido nítrico inducible
IPN	Instituto Politécnico Nacional
LAM	Laberinto acuático de Morris
LIQC	Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas
LP	Lipoperoxidación
LTP	Potenciación a largo plazo
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MDA	Malonildialdehido
MT	Metalotioneinas
Na ⁺	Sodio
NaCN	Cianuro de sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido

NaNO ₂	Nitrito de sodio
Nm	Nanómetro
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
nNOS	Sintasa del óxido nítrico neuronal
N	Norte
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
O	Oeste
OACP	Obliteración de la arteria carótida primitiva
OGD	Privación de oxígeno y glucosa
OMS	Organización mundial de la salud
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBS	Tampón fosfato salino
PKA	Protein cinasa A
PKC	Protein cinasa C
PKG	Protein cinasa G
RE	Retículo endoplásmico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	Sur
SE	Sureste
SEM	Error estándar de la media
SGZ	Zona sub granular
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Super oxido dismutasa
ZIP	Proteína similar a Zrt e Irt
Zn ²⁺	Zinc
ZnCl ₂	Cloruro de zinc

Lista de imágenes

- Figura 1.** Clasificación de los accidentes vasculares cerebrales (AVC)
- Figura 2.** Diagrama de la cascada isquémica
- Figura 3.** Diagrama del mecanismo de excitotoxicidad
- Figura 4.** Efectos de una intoxicación por zinc contra su deficiencia en el organismo
- Figura 5.** Estructura del hipocampo y la vía que emplea en la LTP
- Figura 6.** Mecanismos de Potenciación a largo plazo
- Figura 7.** Esquema del Laberinto Acuático de Morris
- Figura 8.** Diagrama de trabajo
- Figura 9.** Evaluación del aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático de Morris para los 4 grupos: Control Aprendizaje/Memoria, isquemia, administración subaguda de $ZnCl_2$ y administración subaguda de $ZnCl_2$ + obliteración de la arteria carótida primitiva
- Figura 10.** Evaluación del aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático de Morris para los grupos: Control Aprendizaje/Memoria e isquemia.
- Figura 11.** Evaluación del aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático de Morris para los grupos: Control Aprendizaje/Memoria y administración de $ZnCl_2$.
- Figura 12.** Evaluación del aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático de Morris para los grupos: Isquemia y administración de $ZnCl_2$ + obliteración de la arteria carótida primitiva.
- Figura 13.** Evaluación del aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático de Morris para los grupos: Administración de $ZnCl_2$ y administración de $ZnCl_2$ + obliteración de la arteria carótida primitiva.
- Figura 14.** Tiempo de latencia del último ensayo en cada día de la evaluación de aprendizaje, así como la latencia para localizar el cuadrante SE (cuadrante donde se encontraba la plataforma de escape) en la evaluación de la memoria (un ensayo 7 días del último día de aprendizaje).
- Figura 15.** Evaluación de la memoria 7 días después del último ensayo de aprendizaje en el que se registra la latencia de llegada y el número de aciertos al cuadrante donde se encontraba la plataforma de escape.
- Figura 16.** Determinación de nitritos por el método de Griess
- Figura 17.** Determinación de MDA y 4-HDA por el método de Gerard Monier.
- Figura 18.** Determinación de Zn^{2+} por el método de Johnson

Resumen

Los accidentes cerebro vasculares representan un grave problema de salud pública a nivel mundial. Durante el proceso obstructivo hay una disminución de oxígeno y glucosa, llevando al daño y muerte neuronal (daño hipóxico-isquémico), este daño afecta procesos cognitivos y motores, el cual puede ser leve o severo de acuerdo al tiempo de obstrucción. Estudios previos en el laboratorio de investigaciones químico clínicas han demostrado que el incremento en la producción de óxido nítrico (NO) y la acumulación de zinc (Zn) en la corteza temporoparietal e hipocampo produce daño celular y finalmente muerte por apoptosis y necrosis en la zona afectada durante el proceso hipóxico-isquémico. Por otro lado, se ha demostrado que la administración subaguda de zinc tiene un efecto neuroprotector tras un proceso hipóxico-isquémico, disminuyendo el volumen de infarto, e inhibiendo la activación de las caspasas, que promueven la muerte celular por apoptosis y los niveles de nitritos y lipoperoxidación, incrementando factores de crecimiento que ejercen un efecto protector en la célula.

Una forma de corroborar el efecto neuroprotector del zinc es mediante la evaluación del aprendizaje y la memoria espacial en roedores utilizando el laberinto acuático de Morris. Para que se lleve a cabo el aprendizaje y se asegure la memoria se desencadena un mecanismo denominado potenciación a largo plazo (LTP), en este mecanismo participa el Glutamato, el cual desencadena una cascada de señalización que promueve un incremento en la plasticidad sináptica dando como resultado el aprendizaje y la memoria.

Para determinar si la administración subaguda de zinc de manera profiláctica ejerce un efecto protector en el aprendizaje y la memoria 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 subaguda de ZnCl₂ a una dosis de 2.5mg/Kg de peso corporal durante 4 días cada 24 h vía intraperitoneal, 3) Administración subaguda de zinc más la OACP durante 10 minutos.

El grupo control sin tratamiento y los 2 grupos problema, después de 24 h de la última administración de zinc u OACP fueron sometidos a entrenamiento en el laberinto acuático de Morris (LAM) durante 5 días realizando 4 ensayos por día y siete días después del último día de aprendizaje se les evaluó la memoria. Posteriormente, se realizó la determinación de los niveles de nitritos y lipoperoxidación en la corteza cerebral, después del proceso de aprendizaje y memoria.

Los resultados mostraron que la administración subaguda de zinc mantiene el aprendizaje y la memoria en los animales que fueron sometidos a la OACP disminuyendo el estrés nitrosativo reflejado en los niveles de nitritos, MDA y 4-HDA. Mientras que en el grupo que recibió la sola administración de zinc se encuentran alterados los niveles de los metabolitos ya mencionados respecto al grupo control y el grupo que sólo recibió la OACP.

Marco teórico

Los accidentes cerebro vasculares (ACV) son uno de los principales problemas que afectan a la población. De acuerdo a datos emitidos por la Organización mundial de la salud (OMS) los ACV son la tercer causa de muerte a nivel mundial (OMS 2014) y la primer causa de incapacidad cognitiva y motora en pacientes que sufren un proceso obstructivo en un 31% (INEGI 2009). Para que se desencadene la patología obstructiva intervienen múltiples factores de riesgo, que incrementan la probabilidad de sufrir un proceso de esta naturaleza, entre los factores de riesgo se encuentran:

- a. **Edad:** los ACV ocurren en todos los grupos de edad, no obstante, la probabilidad aumenta a partir de los 55 años. Las personas mayores de 65 años tienen un riesgo siete veces mayor de morir de un ACV. La población joven no queda exenta de sufrir un ACV, ya que un 28% de los pacientes tienen menos de 65 años.
- b. **Género:** los hombres tienen un mayor riesgo de sufrir un ACV; sin embargo, un mayor número de mujeres mueren por esta causa, el riesgo de sufrir un ACV entre los hombres es 1.25 veces más alto que las mujeres, esto de acuerdo a las diferentes actividades y hábitos como es la alimentación, a partir de los 65 años el riesgo de sufrir un ACV en mujeres es casi igual al de los hombres. En la población más joven los ACV afectan por igual a hombres y a mujeres.
- c. **Enfermedades y factores de riesgo:** diversos estados de salud incrementan el riesgo de sufrir un ACV, que de forma directa o indirecta impiden o disminuyen el flujo sanguíneo hacía el cerebro. Entre las principales enfermedades y factores de riesgo que

desembocan en un ACV están la diabetes, hipertensión, aterosclerosis, arterioesclerosis, estados de trombosis, embarazo, consumo de drogas.

Los ACV se clasifican de acuerdo a su origen, en isquémico (80% de recurrencia) y hemorrágico (15-20% de recurrencia) (Martínez-Vila, y cols 2011).

1. ACV isquémico: se desencadena por la oclusión de una arteria, interrumpiendo y reduciendo de forma repentina el flujo sanguíneo, de acuerdo al tiempo de oclusión será el grado de daño que ocasione el infarto cerebral (NINDS 2000).

La causa más común de bloqueo arterial son los coágulos sanguíneos, los cuales pueden ocasionar dos tipos de ACV (GeoSalud s.f.):

- a) ACV embólico: se produce por un coágulo libre (émbolo) que se forma en alguna parte del cuerpo (a menudo se forma en el corazón), el cual se traslada a través de los vasos sanguíneos y queda atrapado en una arteria cerebral.
 - b) ACV trombótico: se produce por la formación de un coágulo de sangre en una de las arterias cerebrales que permanece fijo a la pared arterial hasta que aumenta de tamaño lo suficiente para bloquear el flujo de sangre al cerebro.
2. ACV hemorrágico: se desencadena por la ruptura de un vaso sanguíneo que irriga al cerebro (Neurología s.f.). La sangre proveniente del vaso roto, penetra en el tejido cerebral y causa daño, perturbando no sólo el suministro de sangre sino el equilibrio químico que las neuronas requieren para funcionar.

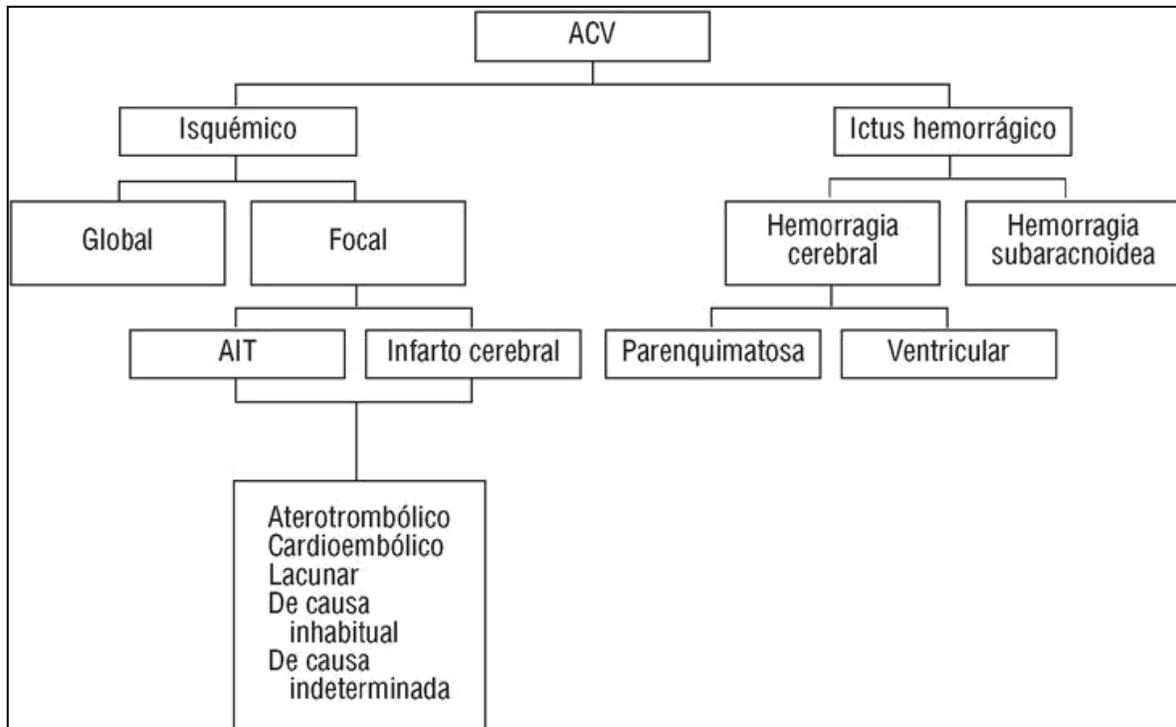


Figura 1. Clasificación de los accidentes vasculares cerebrales (AVC) (Tomado de García Fernández y cols 2003)

El rápido restablecimiento del flujo sanguíneo es de vital importancia ya que permite la sobrevivencia de las neuronas que se encuentran en la zona de penumbra ocasionada por el evento isquémico (Candelario y cols 2009). El restablecimiento del flujo sanguíneo después del proceso isquémico puede agravar la lesión neuronal a través de una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un incremento en la respuesta inflamatoria (Fujimura y cols 1999).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas durante el evento isquémico afectan principalmente a estructuras proteicas, lipídicas y nucleares como el DNA. La oxidación de proteínas afecta su función induciendo un cambio estructural, lo que favorece la formación de agregados proteicos. La oxidación de lípidos provoca alteración en la membrana plasmática y de los organelos celulares, como lo son las mitocondrias y la oxidación de DNA produce mutaciones que repercutirán

en la replicación celular (Mena López 2009). El daño al DNA en el caso de las neuronas desencadena mecanismos de muerte celular (apoptosis).

De acuerdo al tiempo que dure el proceso isquémico, el cual puede ser de unos cuantos segundos hasta varias horas, se desencadenaran diversos mecanismos de daño que afectaran la integridad celular. Al conjunto de mecanismos, se les conoce como cascada isquémica (Fig 2.)

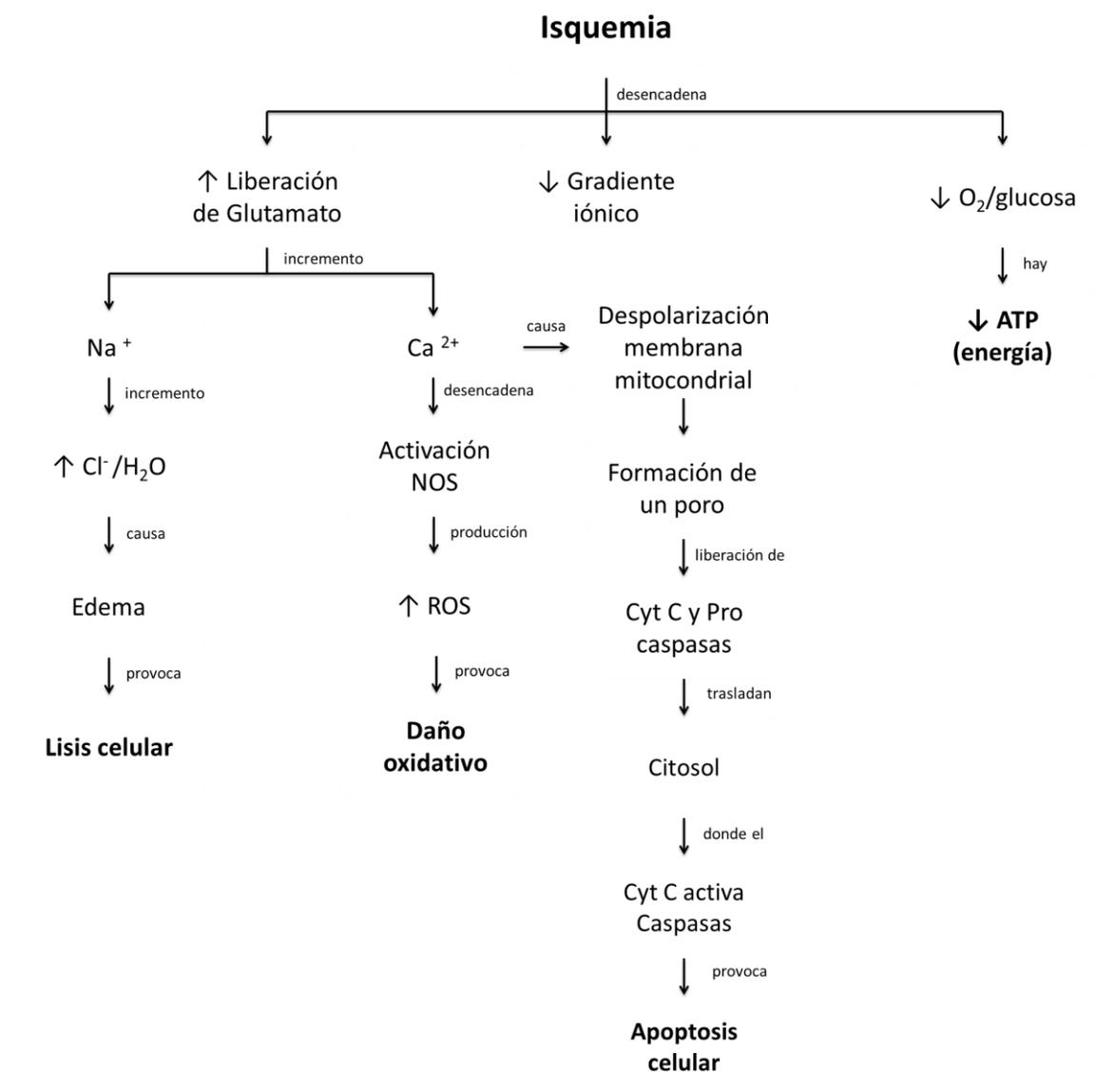


Figura 2. Diagrama de la cascada isquémica (Modificado de Shuttleworth y Weiss 2011; Galasso y Dyck 2007)

Glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central, el principal mediador de la información sensorial, coordinación motora, las emociones y la cognición, incluyendo la formación de la memoria y la recuperación de la misma. En el cerebro, aproximadamente del 80-90% de las sinapsis son glutamatérgicas, lo que hace al glutamato el neurotransmisor más abundante, la concentración de glutamato se encuentra en las estructuras con alto contenido entre los 10-15 μmol por gramo de tejido.

El glutamato se encuentra almacenado en vesículas sinápticas en donde la concentración de glutamato se ha estimado que se encuentra entre los 60-250 mmol/L . Aproximadamente, el 10% de las vesículas sinápticas de terminales glutamatérgicas contiene a la mayor parte de zinc en el hipocampo, el cual es liberado junto al glutamato cuando hay un estímulo dañino.

Excitotoxicidad

El glutamato ejerce un poderoso efecto excitador, el cual puede llegar a ser neurotóxico. Dicho efecto tóxico está relacionado con sus propiedades como excitador, al cual se le denomina excitotoxicidad (Figura 3.).

La excitotoxicidad es el proceso patológico por el cual las neuronas son dañadas y destruidas por la sobre activación de receptores del neurotransmisor excitador a glutamato, como el receptor NMDA (Pandya y cols 2011).

La sobre activación de los receptores a glutamato, principalmente de tipo NMDA, produce una elevación de Ca^{2+} intracelular que activa los

mecanismos para la producción de la lipoperoxidación (LP) de la membrana citoplasmática, retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria (Mattson y cols 2000).

La LP se debe a la formación de peroxinitritos a través de la reacción de óxido nítrico (NO) y radicales superóxido (O_2^-), también se genera 4-hidroxinonal (4-HNE) que altera la actividad de los transportadores de la membrana y canales iónicos cuando los lípidos de las membranas son oxidados (Mattson et al 2000 A). La LP también induce daño a la bomba ATPasa Na^+/K^+ , a los transportadores de glucosa y de glutamato como parte del proceso excitotóxico, perturba la homeostasis iónica en el RE y la mitocondria, comprometiendo el abastecimiento de ATP (Mattson y cols 2000; Mattson y cols 2000).

Por otra parte, el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} también desencadena la activación de vías de señalización intracelular relacionadas con la muerte celular apoptótica como son la activación de diferentes enzimas dependientes de Ca^{2+} , como las proteasas, nucleasas y fosfolipasas (Mattson y cols 2000).

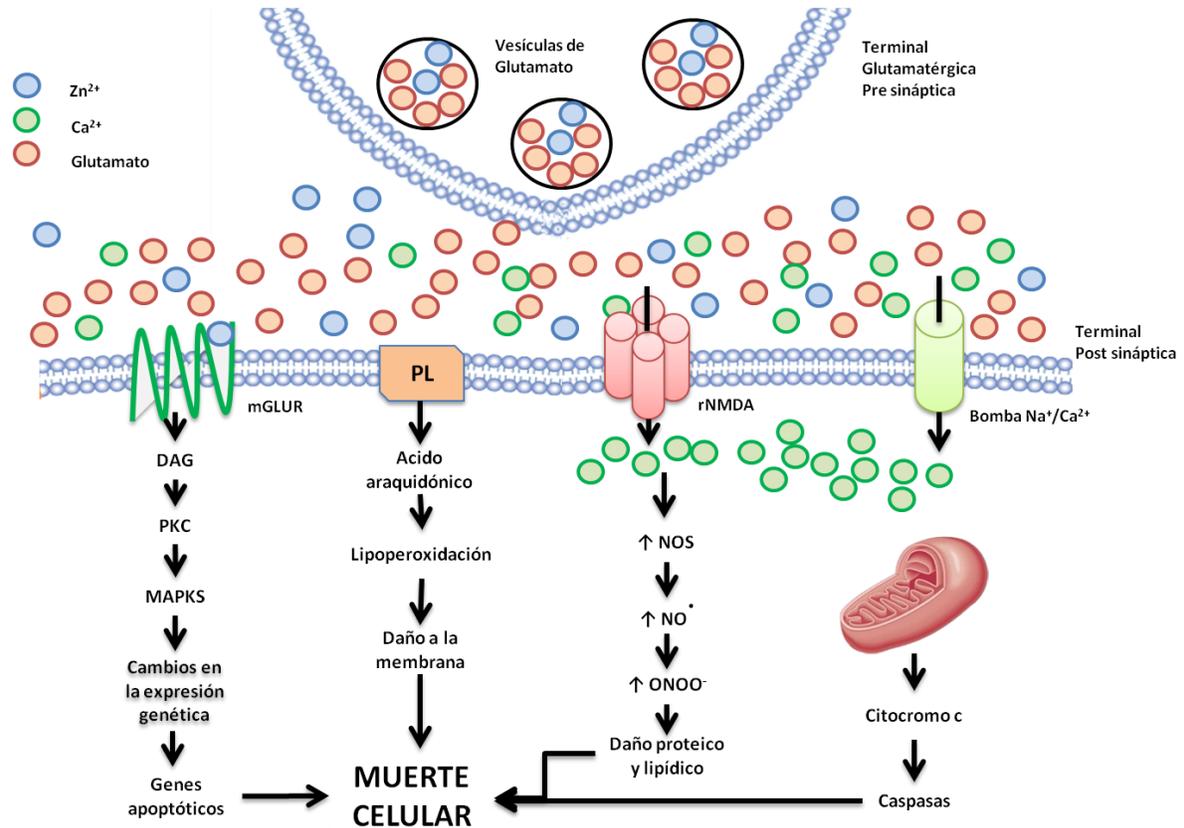


Figura 3. Diagrama del mecanismo de excitotoxicidad (Modificado de M.E. Flores-Soto y cols 2011; Siegel y cols 2006)

Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un gas altamente difusible, el cual tiene numerosos blancos moleculares. El NO controla diversas funciones como la neurotransmisión, el tono vascular y regula la transcripción de genes (Förstermann y Sessa 2012), también participa como mediador de la respuesta inmune (Jiang y cols 2014).

La enzima responsable de la generación de NO es la sintasa del óxido nítrico (NOS), de la cual se han descrito tres isoformas codificadas en genes distintos: NOS neuronal (nNOS o tipo I) la cual se encuentra en tejidos neuronales, la NOS inducible (iNOS o tipo II) es la isoforma que puede ser sintetizada después de la inducción de citocinas pro-

inflamatorias o endotoxinas y la NOS endotelial (eNOS o tipo III), siendo esta isoforma expresada en células endoteliales (Bredt 1999).

nNOS y eNOS se expresan constitutivamente y dependen del incremento de calcio (Ca^{2+}) y calmodulina para funcionar, mientras que la actividad de la iNOS es Ca^{2+} independiente, debido a que la calmodulina se une a calcio en concentraciones de reposo (Calabrese y cols 2007). Durante la activación de los receptores de glutamato, principalmente de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), el Ca^{2+} se incrementa transitoriamente en el citosol y se une a la camodulina para formar y activar a la nNOS (Knowles y Moncada 1994).

El incremento de NO contribuye a una variedad de patologías neurodegenerativas tales como la excitotoxicidad después del accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, Alzheimer y Parkinson (Steinert y cols 2010)

La rápida restauración del flujo sanguíneo después de la isquemia incrementa el nivel de oxigenación de los tejidos, pero en ausencia de NADH da lugar a la producción de O_2^- que junto con una sobreproducción de NO producen peroxinitritos (ONOO^-) (Jiang y cols 2014).

El NO tiene un papel dual después del ACV, por una parte puede reducir el daño ocasionado, ayudando a reestablecer el flujo sanguíneo a la zona isquémica, aunque también puede ocasionar daño participando en la formación de peroxinitrito, al reaccionar el anión superóxido con el nitrito (Blanco Alvarez 2013 tesis de maestría). El papel citoprotector del NO durante la isquemia cerebral promueve la vasodilatación, neuroangiogénesis y la sobrevivencia neuronal, además de proteger a las celular de la apoptosis, a través de la regulación positiva de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y hemoxigenasa-1, así como la inhibición de eventos

pro-apoptóticos como la liberación del citocromo C y la inhibición de la caspasa-3 (Pfeiffer y cols 1996)

eNOS interviene rápidamente después de un proceso de inflamación aguda, daño en cualquier tejido o cuando se presenta un cambio en el flujo sanguíneo, cambiando la permeabilidad vascular e incrementando el flujo sanguíneo hacia la zona de daño (Cirino y cols 2003).

Zinc

El zinc es uno de los metales más importantes del organismo después del hierro, es esencial como ion catalizador, estructural y regulador en la homeostasis, la respuesta inmunológica, el estrés oxidativo, la apoptosis y la proliferación (Bhatnagar y Taneja 2001; Piechal y cols 2012). El zinc se encuentra en una gran cantidad de enzimas y proteínas como cofactor. Tiene valencia de +2, característica que le da la capacidad de no sufrir procesos de óxido-reducción que afecten o cambien la funcionalidad de proteínas o enzimas.

El zinc es un elemento esencial para el crecimiento y el desarrollo, se encuentra en cantidades relativamente importantes en músculo, donde llega a constituir el 50-60% de todo el zinc corporal (Figura 4.). También se encuentra en próstata, retina, pelo y en niveles relativamente elevados en el tejido óseo y en el sistema nervioso central (concretamente en las proximidades del hipocampo) (López de Romaña, Castillo y Diazgranados 2010). Por otra parte, el zinc libre en sangre tiene una función de mantenimiento y almacenamiento de fácil acceso por parte del organismo, estando disponible para su rápida utilización cuando es necesario, en función de los requerimientos existentes. En esta posición sanguínea, el 80% de encuentra ligado a los hematíes, mientras que el 12%, se localiza en el plasma principalmente unido a la albúmina. Un adulto

posee entre 2 y 3 gramos de zinc en su organismo, de los cuales aproximadamente un 0.1% es reemplazado diariamente. En la población normal la ingesta diaria de zinc es del orden de los 12 y 15 mg/día para mujeres y hombres respectivamente, requiriendo niveles más elevados (20-25 mg/día) en el caso de mujeres embarazadas o lactantes (Rico Bodes 2011).

El zinc está asociado con diversas funciones cerebrales como son la síntesis de DNA y proteínas en periodos críticos del desarrollo cerebral, tiene función de neurotransmisor, factor transportador de crecimiento/hormona, segundo mensajero (Yamasaki y cols 2007) y uniéndose a receptores como son NMDA y GABAérgicos (Matsushita y cols 1996). En cuanto al desarrollo neurológico, el zinc está involucrado en el aprendizaje y la memoria y se sugiere que los receptores a glutamato en el SNC pueden estar involucrados (Tahmasebi Boroujeni y cols 2009).

El zinc juega un papel importante en el desarrollo embrionario y en el adulto, involucrándose en la proliferación de células madre en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo, migrando a la capa de células granulares y diferenciándose a neuronas que son integradas en el circuito hipocampal, región del cerebro que participa en el aprendizaje y la memoria (Levenson 2006).

Se ha demostrado que la suplementación de zinc, incrementa la expresión de factores de crecimiento (Blanco Alvarez 2013 tesis de maestría), disminuye la muerte celular (Matsushita y cols 1996) e incrementa la neurogénesis (Levenson y Morris 2011). Mientras que la deficiencia marginal de zinc es una condición muy prevalente en diferentes regiones del mundo (Brown 2003). La causa de esta deficiencia suele radicar en la pobre ingesta de este micronutriente, pero a veces este

déficit es resultado de una menor biodisponibilidad del zinc; es decir, habiendo zinc éste no se absorbe adecuadamente.

La absorción intestinal de zinc se efectúa mediante un mecanismo de transporte, el cual requiere transporte especializado para su captación (Grabruker y cols 2011), en los que participan los importadores de zinc (ZIP) (Colvin y cols 2003). Dicha fracción de absorción en niños se aproxima a 20% - 25%. Por lo tanto, la cantidad aportada de zinc por ingesta influirá en la saturación de su proteína de absorción (Sandström y Cederblad 1980).

La inhibición de la absorción de zinc a nivel intestinal constituye la causa más probable de déficit marginal de éste elemento. Muchos grupos de alimentos son fuente relativamente abundante de zinc pero también contienen inhibidores de su absorción (Gibson y Ferguson 1998). La velocidad de absorción puede ser incrementada si la suplementación de zinc es llevada junto a la vitamina B6, algunos aminoácidos, como la histidina y la metionina. Los ácidos orgánicos tienen efectos positivos en la absorción de zinc y han sido usados junto a la suplementación de zinc (Grabruker y cols 2011).

Bajo ciertas condiciones tales como en la isquemia, se ha observado un efecto tóxico del zinc, debido a un incremento en la excitabilidad neuronal, la cual desencadena un proceso excitotóxico; en la excitotoxicidad se liberan grandes cantidades de glutamato y zinc de la vesícula pre-sináptica. La sobrecarga de zinc en la neurona post-sináptica, resulta en la alteración de los mecanismos homeostáticos y un incremento del zinc libre intracelular (Colvin et al 2003).

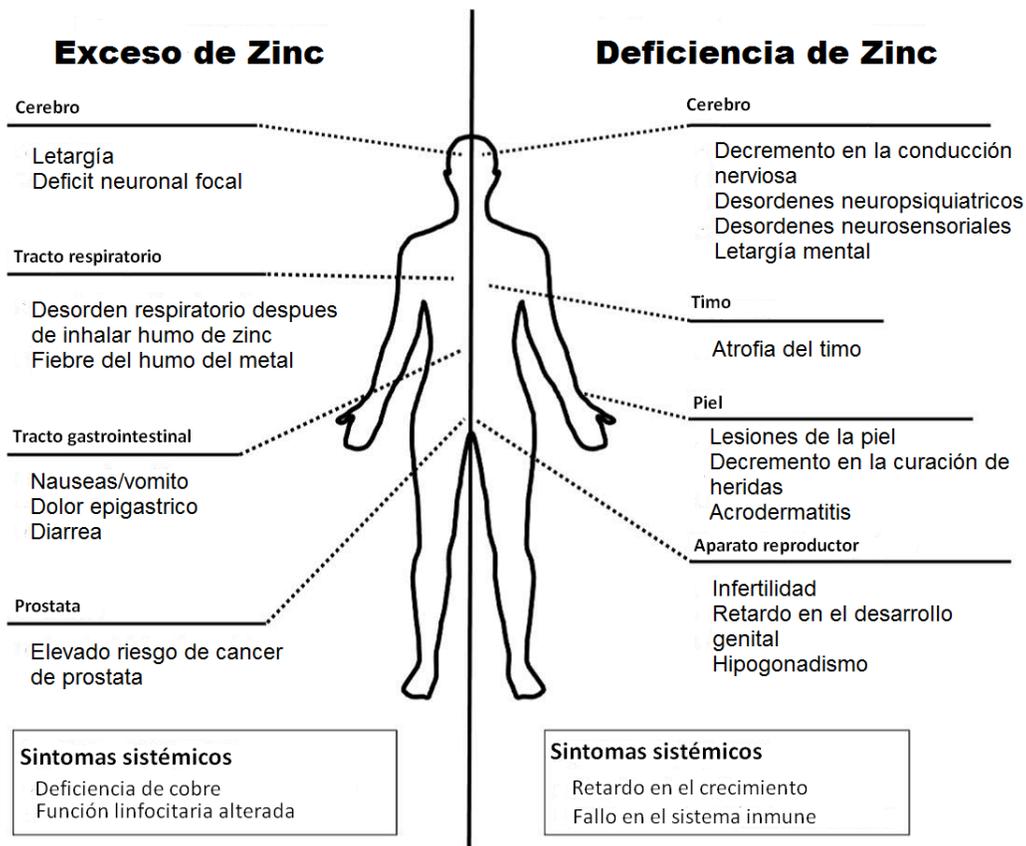


Figura 4. Efectos de una intoxicación por zinc contra su deficiencia en el organismo (Tomado de Plum, Rink y Haase 2010)

En modelos *in vitro* donde la célula es sometida a condiciones de privación de oxígeno y glucosa (OGD) los niveles de zinc libre, mitocondrial y citosólico, mostraron que el zinc mitocondrial incrementa de 0.2 pmol/L a 10 pmol/L 1h después del daño, mientras que el zinc citosólico incrementa gradualmente cerca de 10 veces a las 24 h después del daño (Morris y Levenson 2013).

La liberación excesiva de zinc después de un accidente cerebral, se ha asociado a muerte neuronal y daño, el zinc libre está secuestrado por parte de vesículas sinápticas, posteriormente este zinc es liberado al espacio sináptico donde se acumula en la neurona postsináptica, provocando la muerte (Morris y Levenson 2013).

El zinc ejerce un efecto dañino en la célula y causa muerte neuronal, mediante la ubiquitinación de proteínas. Evidencia experimental demuestra que en cortes cerebrales y homogenizado del hipocampo hay un incremento en los conjugados de proteínas ubiquinadas, seguido de muerte neuronal en las regiones cornu ammonis 1 (CA1) y cornu ammonis 3 (CA3) del hipocampo, alrededor de 48h después de un accidente cerebral (Morris y Levenson 2013).

El zinc a su vez puede jugar un papel neuroprotector en la excitotoxicidad inducida por el glutamato, activando presinápticamente canales de K⁺ sensibles a ATP e inhibiendo el transportador 4 de GABA, este transportador contribuye en la especificidad del canal y participa en mecanismos reguladores intracelulares. Otra forma en la cual se ha observado la acción neuroprotectora del zinc ocurre bajo condiciones en las que las neuronas zincérgicas no se encuentran muy excitadas durante el estado de daño celular (Takeda y Tamano 2014).

Concentraciones subletales de zinc producen un estímulo preconditionante que puede activar vías endógenas que limitan o proporcionan resistencia a un daño letal subsecuente (Kitagawa y cols 1990; Gidday 2006). Los mecanismos que confieren tolerancia neuronal aún no han sido bien definidos, pero se conoce que los mecanismos de activación de factores de muerte celular disparan vías de sobrevivencia (Gidday 2006). Por ejemplo, la activación de caspasa-3 (Garnier y cols 2003, McLaughlin y cols 2003, Tanaka y cols 2004, Lee y cols 2008), poly (ADP-ribosa) polimerasa-1, p38, y protein cinasa C (PKC) (Garnier y cols 2003, Nishimura y cols 2003, Raval y cols 2003, Lee y cols 2008).

Zinc y la muerte celular

De acuerdo a la concentración en la que se encuentre el zinc, ya sea en exceso o deficiencia puede actuar como un agente pro-apoptótico o anti-apoptótico. La inducción de la apoptosis se lleva a cabo cuando el zinc se encuentra en altas concentraciones intracelulares, como consecuencia de la administración exógena de zinc o por liberación de los depósitos de zinc, los cuales activan moléculas pro-apoptóticas como la p38 y canales de potasio, conduciendo a la muerte celular (Plum, Rink y Haase 2010).

Un blanco sensible a la toxicidad por zinc son proteínas de membrana mitocondrial como son la anti-apoptótica Bcl-2 y pro-apoptótica Bax, en su papel apoptótico se ha observado que el zinc incrementa la expresión de Bax, disminuyendo a Bcl-2, como consecuencia, la disipación del potencial de membrana mitocondrial el cual conduce a la liberación de citocromo c de la mitocondria hacia el citosol, activa a las caspasas que conducen a la muerte celular apoptótica.

El zinc tiene dos mecanismos de acción en su papel como anti-apoptótico, en un primer mecanismo el zinc protege a la célula contra el daño oxidativo, preservando la membrana celular y protegiendo a las proteínas de la oxidación de sus grupos sulfihídrido. El zinc interactúa con diversas moléculas que regulan la apoptosis, es un potente inhibidor de la caspasa-3, la concentración a la que causa inhibición es de 10 nM. Entre otras caspasas que son inhibidas por zinc se encuentran la caspasa-6, -7 y -8, siendo caspasa-6 la más sensible de las 3 (Adamo y Oteiza 2010).

Enmarcando en este apartado el papel dual del zinc en la muerte celular y cómo afecta la deficiencia o exceso del metal en diversos procesos patológicos como la isquemia.

Hipocampo

El hipocampo tiene un papel crítico en el aprendizaje y la memoria, está conformado por las siguientes subestructuras: la región CA3, CA1 y el DG (giro dentado). La plasticidad que se lleva a cabo dentro de éste circuito sináptico es conocido como la base del aprendizaje y la memoria a través de la potenciación a largo plazo (LTP) (Machado y cols 2008). El hipocampo ha mostrado tener neuronas zincérgicas (Takeda y cols 1995), principalmente las fibras musgosas del circuito de CA3. La tinción con Timm muestra que el zinc se encuentra en el giro dentado y en las fibras musgosas de la CA3 (Ketterman y Li 2008). El circuito glutamatérgico (zincérgico) juega un papel clave en las estructuras de construcción cognitivo (Martinez-Guijarro y cols 1991; Nacher y cols 2000). La plasticidad sináptica como la potenciación de larga duración se cree es el mecanismo celular involucrado en el aprendizaje y memoria (Bliss y Collingridge 2013; Takeda y Tamano 2014).

Las neuronas hipocámpales se distribuyen en tres subregiones principales: células granulares en el giro dentado, y neuronas piramidales en CA1 y CA3. La organización funcional está basada en un circuito trisináptico en el cual: primeramente las dendritas de las células granulares del giro dentado reciben aferencias de la corteza entorrinal por medio de la vía perforante; en segundo lugar, las células granulares (fibras musgosas) envían eferencias a las neuronas piramidales de CA3; y en tercer lugar, las neuronas piramidales de CA3 y CA1 proyectan de vuelta hacia la corteza entorrinal mediante el subículo (Kempermann 2012) (Figura 5.).

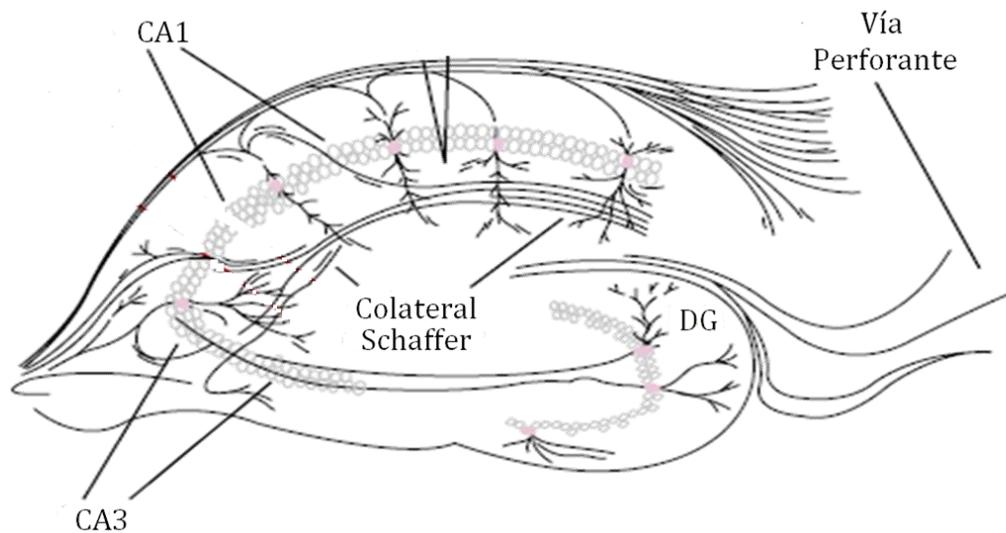


Figura 5. Estructura del hipocampo y la vía que emplea en la LTP (Tomado de Siegel y cols 2006)

Para que se lleve a cabo el aprendizaje y se asegure la memoria se desencadena un mecanismo denominado potenciación a largo plazo (LTP), en este mecanismo participa Glutamato que es liberado de vesículas glutamatergicas, promoviendo el flujo masivo de Ca^{2+} a la terminal postsináptica a través del cual se activan diversos mecanismos que desencadenan cambios a nivel molecular y celular que promueven el incremento en las sinapsis neuronales, una amplificación de la señal y un incremento en la neurogénesis. Estos mecanismos son la base del aprendizaje y la memoria, se llevan a cabo en el hipocampo principalmente y se requiere que el estímulo sea continuo para que el aprendizaje y la memoria se consoliden.

Aprendizaje y memoria espacial

El aprendizaje y la memoria son aspectos cognitivos esenciales para el desarrollo y sobrevivencia de los seres vivos, estas funciones no son aisladas la una de la otra, si el proceso de adquisición se lleva de la forma adecuada (aprendizaje) se asegura el proceso de almacenamiento y una

posterior recuperación de la información (memoria) (L. [Aguado-Aguilar 2001](#)).

Una forma de clasificar los procesos de aprendizaje y memoria se da de acuerdo a la forma en la que se adquiere la información del medio que rodea al sujeto y los recursos que este emplea para desenvolverse en el entorno. ([Carrillo Mora y cols 2009](#)). La memoria se clasifica en sensorial, a corto plazo y a largo plazo. La sensorial registra lo que sucede en el medio exterior, sensaciones visuales, olfatorias, el gusto y tacto, son de muy corta duración, pero suficiente para ser pasada a la memoria de corto plazo. La función de la memoria de corto plazo es organizar y analizar la información, la duración del recuerdo es muy corto entre 18 y 20 segundos. Mientras que la memoria de largo plazo tiene los recuerdos de forma ilimitados, permanece toda la vida y no se pierde ([Mc Graw-Hill 2015](#)). En la memoria de largo plazo podemos encontrar la memoria declarativa (saber qué, conocimientos de una persona) y procedimental (saber cómo, se adquiere por condicionamiento o experiencias repetidas).

En el proceso de aprendizaje y memoria espacial hay diversas estrategias que se relacionan en la consolidación de dicho proceso, una de ellas se basa en crear representaciones reales del entorno para localizar el objetivo con el empleo de un laberinto, a esta estrategia se le denomina mapa cognitivo ([Tolman 1948](#)). La cognición espacial es obtenida a través del comportamiento exploratorio, un comportamiento instintivo y ampliamente preservado en todas las especies animales incluyendo al hombre ([Thinus-Blanc 1996](#)). La memoria espacial es una función responsable del reconocimiento, codificación, almacenamiento y recuperación de información espacial alrededor de objetos dispuestos o rutas específicas ([Kessels y cols 2001](#)).

Zinc en el aprendizaje y la memoria

A lo largo de muchos años se han realizado diversos estudios en los cuales se evalúa el papel del zinc en el aprendizaje y la memoria, con diversas variables, como lo son la edad de los animales de experimentación, el modelo animal, la vía de administración, la dosis, el uso de quelantes o estados de deficiencia de zinc.

Un estudio realizado en ratas preñadas a las cuales se les suplemento con zinc a diferentes concentraciones durante la gestación, la lactancia y el desarrollo de los críos una vez terminado el proceso de entrenamiento; mostró un mejor resultado en las pruebas de comportamiento en los grupos que recibieron la suplementación con zinc respecto al grupo control, el cual sólo recibió agua (Piechal y cols 2012)

Otro estudio realizado en ratas macho de 6 semanas de edad, los cuales recibieron diferentes tratamientos de zinc (dosis suplementada, adecuada y deficiente) durante 4 semanas, al final de las 4 semanas a los animales se les realizó un daño traumático cerebral. Posteriormente, los animales fueron sometidos al entrenamiento en el laberinto acuático de Morris durante 10 días. Los resultados demuestran que el grupo que recibió la dieta suplementada de zinc y el daño tiene un desempeño similar al grupo control, mientras que los grupos que recibieron una dieta adecuada y deficiente muestran un incremento en los tiempos de latencia, respecto al grupo control y al grupo que recibió la dieta suplementada (Cope y cols 2012).

De acuerdo a la bibliografía hay diversos reportes que relacionan la suplementación de zinc como un factor que influye en la LTP, mejorando el proceso de aprendizaje y memoria en modelos animales.

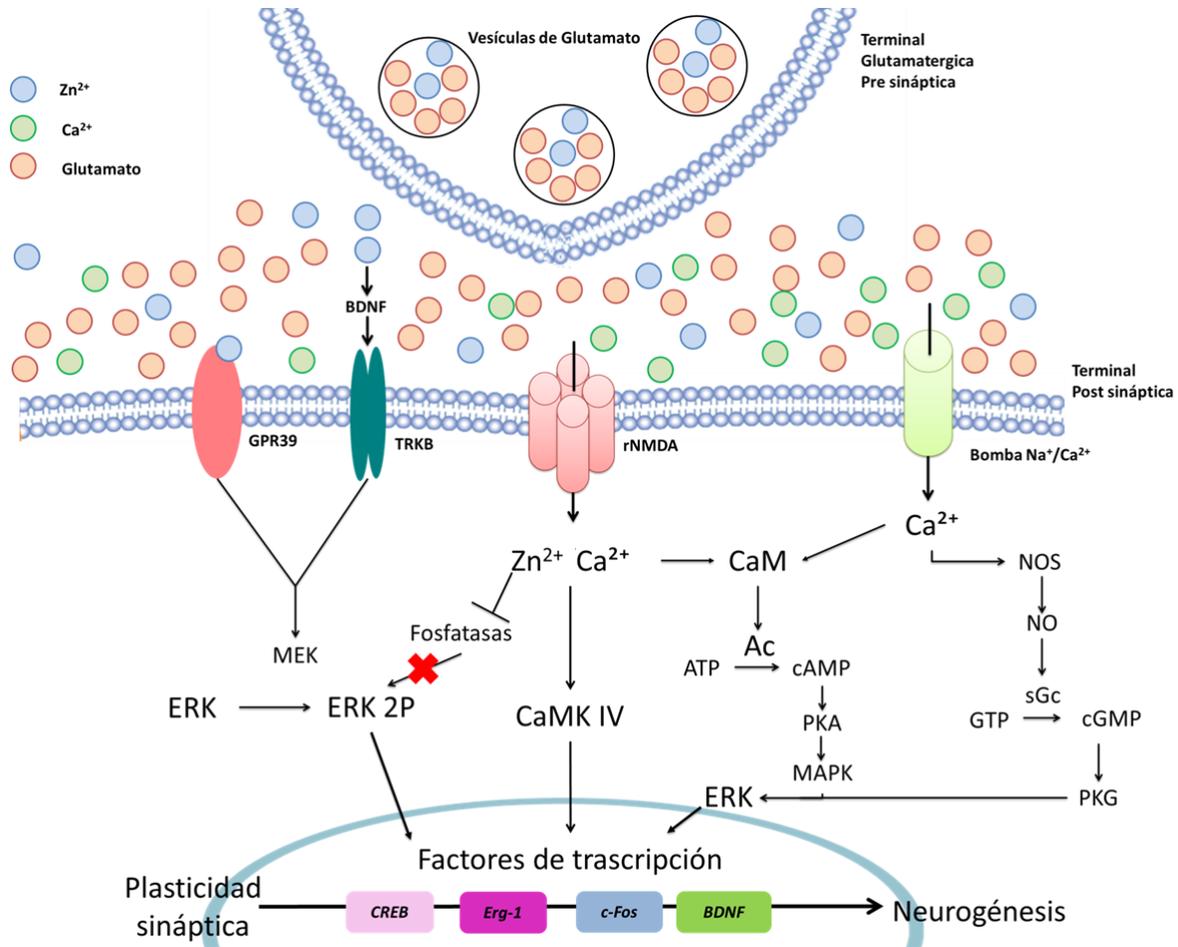


Figura 6. Mecanismos de Potenciación a largo plazo (Modificado de González Vázquez Tesis de Licenciatura 2015)

Laberinto acuático de Morris

El laberinto acuático de Morris (LAM) es una prueba desarrollada por Richard Morris en 1981, posteriormente en 1984 perfecciona la técnica y la denomina LAM (Morris 1984). Actualmente se ha convertido en una de las principales pruebas empleadas para evaluar aprendizaje y memoria espacial en roedores con daño en estructuras relacionadas con la memoria, y para evaluar la acción de diversos fármacos (Myhrer, 2003). Este paradigma resulta de especial interés, puesto que no necesita de la privación de agua o comida ni de la aplicación de una descarga eléctrica para motivar la conducta (Vicens y cols 2003).

Consta de una piscina de nado llena de agua opaca con un diámetro que oscila entre 1.5-2.0 m y una profundidad de 60-80 cm, una plataforma de escape que se encuentra sumergida a 2 cm del nivel del agua con un diámetro de 10-15 cm (Figura 7.). Para el proceso de entrenamiento se recomiendan de 4-6 ensayos por día en un periodo de 5 a 10 días. Cada ensayo debe tardar de 60-180 s, con un intervalo de tiempo que va de 5 minutos a 2 horas entre cada ensayo, ya que se ha observado que este intervalo de tiempo mejora significativamente la capacidad de retención en los animales (Bolding y Rudy 2006).

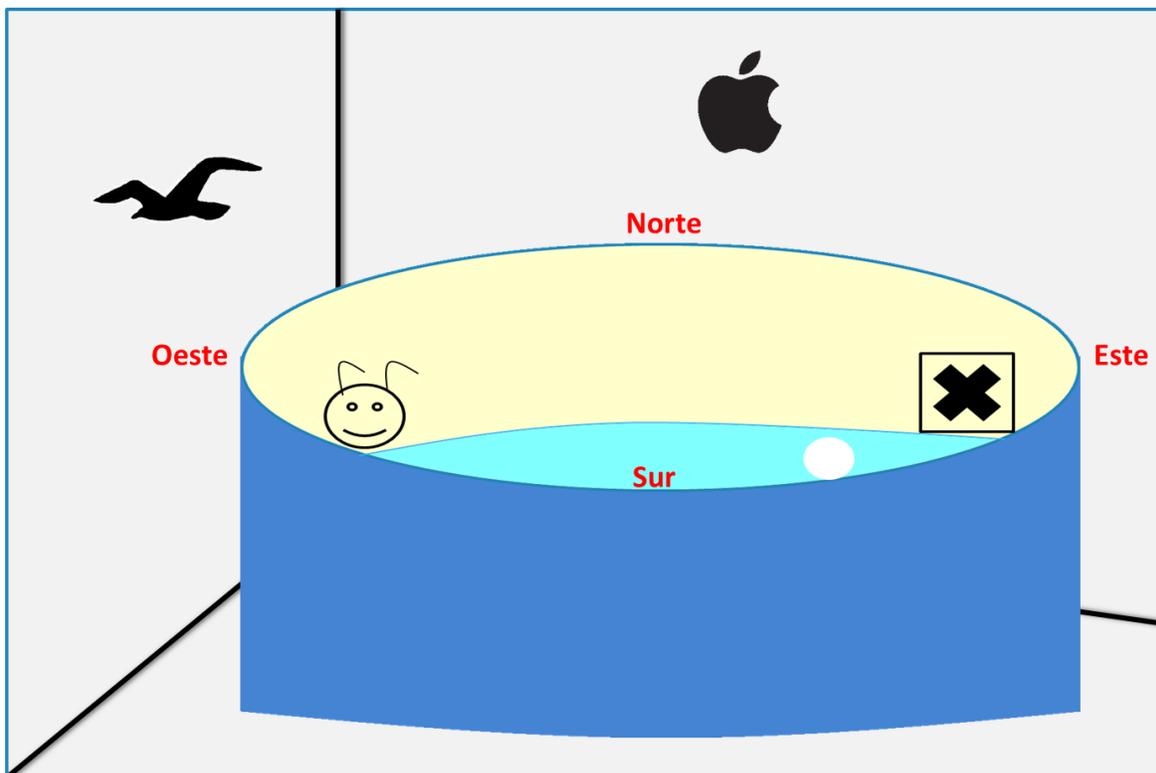


Figura 7. Esquema del Laberinto Acuático de Morris

El propósito del experimento original realizado por Morris era mostrar que el aprendizaje espacial no requiere la presencia de pistas locales, lo que significa que las ratas pueden aprender a localizar un objeto sin ningún tipo de señales auditivas, visuales u olfativas (Morris 1981).

Los roedores emplean tres formas diferentes de localizar la plataforma de escape:

- 1) Estrategia práxica: el animal aprende la secuencia de movimientos que se necesitan para encontrar la plataforma de escape.
- 2) Estrategia taxica: el animal usa pistas o señales visuales próximas para encontrar la plataforma de escape.
- 3) Estrategia espacial: el animal encuentra la plataforma usando información acerca de la localización espacial de la plataforma de acuerdo a la configuración espacial de señales visuales distales (Carrillo Mora y cols 2009).

Posteriormente se emplearon ratas con daño hipocampal total y animales sin daño, todos ellos fueron sometidos al LAM. Los resultados mostraron un cambio en la trayectoria formada por el animal, respecto al grupo control, concluyendo que el hipocampo es una de las estructuras relacionadas con la navegación espacial (Morris y cols 1982).

Justificación

Las enfermedades cerebrovasculares son una de las principales causas de incapacidad y muerte en la población económicamente activa a nivel mundial, son ocasionados por la irrupción del flujo sanguíneo de alguna arteria que irriga el cerebro, a consecuencia de esto se ha observado daño en diferentes regiones cerebrales como la corteza cerebral temporoparietal e hipocampo, el cual se lleva a cabo a través del desencadenamiento de una cascada de eventos que involucran al estrés oxidativo, nitrosativo y la respuesta inmunológica, como principales causantes de muerte celular por apoptosis y necrosis. De acuerdo al nivel de daño y muerte neuronal que haya en las regiones afectadas, será el deterioro de los aspectos cognitivos y motores, que en ciertas ocasiones puede llegar a ser irreversible. Estudios han demostrado que existe una relación estrecha entre el óxido nítrico y el zinc, teniendo efectos protectores y citotóxicos afectando los aspectos cognitivos del individuo, como son el aprendizaje y la memoria. El óxido nítrico libera el zinc de las metaloproteínas y causa la despolarización de las neuronas liberando el zinc contenido en las vesículas sinápticas. El zinc estabiliza el dímero de las sintasas del óxido nítrico constitutivas (nNOS y eNOS) y previene la expresión de la NOS inducible.

En el LIQC se ha demostrado que la administración subaguda de zinc tiene un efecto protector, disminuyendo el estrés nitrosativo y la muerte celular posterior a un proceso hipóxico isquémico cerebral en un modelo de rata. Por lo que, una manera de corroborar si la administración subaguda de zinc disminuye el daño celular y previene la muerte neuronal, es evaluando el aprendizaje y la memoria en la rata después de un evento hipóxico-isquémico cerebral.

Hipótesis

La administración subaguda de zinc previene el daño en el aprendizaje y la memoria, a través de la disminución del estrés nitrosativo tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.

Objetivos

General

Evaluar el efecto de la administración subaguda de zinc sobre el daño en el aprendizaje y la memoria, a través de la disminución del estrés nitrosativo tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.

Específicos

1. Determinar si la administración subaguda de zinc previene el estrés nitrosativo durante el aprendizaje y la memoria tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.
2. Evaluar si la administración subaguda de zinc mejora el aprendizaje y la memoria tras un proceso 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 $n=5$ 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 190-230g

Criterios de exclusión

Ratas de otra cepa

Ratas hembra

Ratas enfermas o con algún daño diferente al daño hipóxico-isquémico

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 proceso de aprendizaje y memoria, sin administración de $ZnCl_2$ y con ausencia de daño.

Definición de las variables y escalas de medición

Variable independiente: entrenamiento, tiempo y dosis.

Variable dependiente: Tiempos de latencia y determinaciones bioquímicas (Proteínas totales, nitritos, MDA y 4-HDA y Zinc).

Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas

Los valores son la media \pm SEM de determinaciones realizadas por triplicado. Las pruebas estadísticas fueron de tipo paramétrico y no paramétrico, los datos de tipo paramétrico fueron analizados con una ANOVA 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. Los datos de tipo no paramétrico fueron analizados por un Kruskal-Wallis seguido de una post-prueba de comparación múltiple de Dunn's y por una U de

Mann-Whitney seguido de una post-prueba de comparación múltiple de Dunn's.

Aspectos bioéticos

Todos los procedimientos siguieron las normas de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana "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

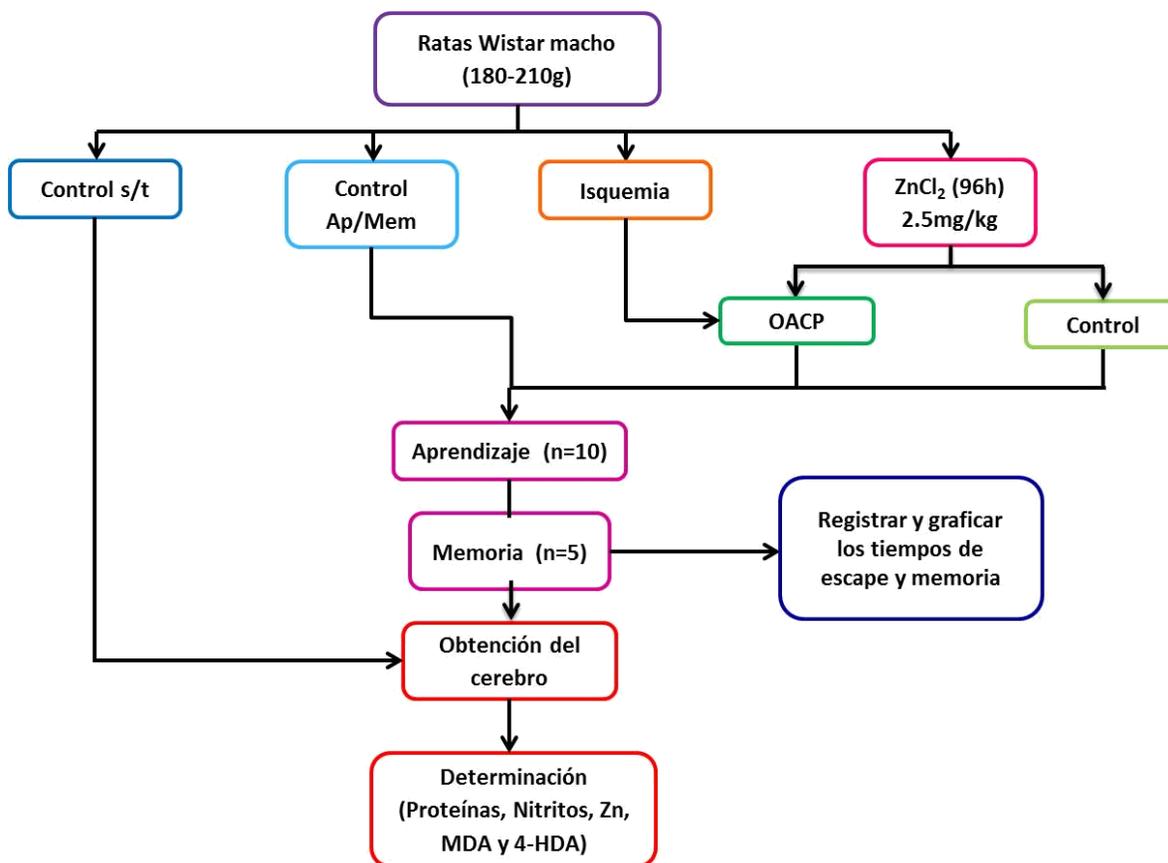


Figura 8. Diagrama de trabajo Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 180-210g de peso corporal, las cuales se dividieron en 4 grupos experimentales: un grupo control sin tratamiento con una n=5 el cual solo se utilizó para obtener el cerebro y realizar las determinaciones bioquímicas en condiciones basales, un grupo que se sometió a aprendizaje y memoria (n=10), el grupo al cual se le realizó isquemia (n=10), dos grupos a los cuales se les administró ZnCl₂ (n=10 cada grupo) a una dosis de 2.5mg/Kg de peso corporal durante 4 días cada 24h vía intraperitoneal, a un grupo se le realizó la OACP durante 10 minutos.

Los 3 grupos fueron sometidos a entrenamiento en el laberinto acuático de Morris durante 5 días realizando 4 ensayos por día, se sacrificaron 5 ratas de cada grupo para la obtención del cerebro, a los animales restantes se les evaluó la memoria 7 días después del último día de aprendizaje, una vez obtenidas todas las muestras se realizaron las determinaciones bioquímicas de la corteza temporoparietal.

Metodología

1) Animales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 180-210g, provenientes del bioterio del CINVESTAV, los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y temperatura de 22°C, con acceso de agua y alimento *ad libitum*.

2) Administración de ZnCl₂

La administración de cloruro de zinc (ZnCl₂) se realizó durante 4 días cada 24 horas a una dosis de 2.5mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal. El ZnCl₂ se encontró a una concentración de 5mg/ml de agua destilada, todos los procedimientos se realizaron en concordancia con las normas del uso y manejo de animales de experimentación.

3) Obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP)

Las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral a una dosis de 350 mg/kg por vía intraperitoneal, se les colocó de frente en una camilla, con una cánula en la boca que les permitió una mejor respiración, se rasuró el cuello y limpió con benzal. Se realizó una pequeña incisión, se disectaron los músculos que cubren la arteria carótida primitiva izquierda, separando el nervio vago. Se colocó una pinza de presión para arterias (bulldog), para bloquear el flujo sanguíneo hacia el cerebro durante 10 minutos, una vez transcurrido el tiempo se retiró la pinza y se restableció la reperusión sanguínea.

Se suturó y se mantuvo a la rata en recuperación, hasta su completa incorporación.

4) Laberinto acuático de Morris (Water Maze)

El laberinto acuático de Morris consta de una tina circular (piscina de nado) de un diámetro que va entre los 120-200 cm y una altura de 56-75 cm, la plataforma de escape mide 10 cm de diámetro. La tina se llenó con agua (19-22°C), tomando como referencia la plataforma, un centímetro arriba de esta, el agua se opacó con dióxido de titanio, para asegurar que las ratas no vieran la plataforma de escape. La piscina de nado se encuentra dividida en 4 cuadrantes Norte (N), Sur (S), Este (E) y Oeste (O), mientras que en las paredes internas de la tina se colocan dos dibujos, los cuales sirven de orientación y ubicación de la plataforma.

Se realizaron 4 ensayos por día, uno en cada cuadrante, las ratas tenían 60 segundos (s) para encontrar la plataforma (tiempo de latencia), una vez que la encontraron y se ubicaron en ella, se les dejó sobre la plataforma 30 s, posteriormente fueron retiradas de la plataforma y se esperaron 30 segundos para iniciar el ensayo en el siguiente cuadrante, siguiendo el orden de N, O, S y E durante 5 días consecutivos (Figura 8.).

Siete días después del último ensayo de aprendizaje se evaluó la memoria, para esto se realizó un solo ensayo durante 60 s desde el cuadrante más lejano a la posición de la plataforma, contabilizando el número de veces que la rata pasó por el sitio donde se encontraba la plataforma de escape, así como el segundo en el que lo realizó.

5) Extracción de cerebros

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical de acuerdo al grupo perteneciente (aprendizaje o memoria en el laberinto acuático de Morris).

Los cerebros se disectaron en sus diferentes estructuras (tallo, cerebelo, núcleos, corteza cerebral derecha e izquierda), la corteza a su vez se disectó para obtener la fracción temporoparietal, todas las muestras se almacenaron en tubos Eppendorf y en ultracongelación a temperatura de -70°C .

6) Procesamiento de las muestras

Para procesar las muestras, estas fueron descongeladas, posteriormente se adicionó 1 mL de PBS 1X (solución buffer de fosfatos), primero 500 μL y con ayuda de un homogeneizador eléctrico se homogenizó el tejido durante 1 minuto o hasta que no se observarán partes del tejido, agregando los 500 μL restantes, posteriormente se centrifugaron a 12500 rpm a 4°C durante 30 minutos. Una vez hecho esto se procedió a separar el sobrenadante del botón en otro tubo Eppendorf, cuidando de no tocar el sobrenadante para evitar calentarlo. Los sobrenadantes se almacenaron a 4°C hasta las determinaciones.

7) Determinaciones Bioquímicas

- **Cuantificación de proteínas totales** (Sedmak y Grossberg1977)

El anión del colorante Coomassie reacciona electrostáticamente con el grupo NH_3^+ de las proteínas, la unión del anión a la proteína causa un cambio en la absorción del colorante de 465-620nm. Las

proteínas totales fueron cuantificadas por el método de Sedmak y Grossberg. Las proteínas se cuantificaron en 1 μ L del sobrenadante contenido en 499 μ L de agua y 500 μ L del reactivo de color (azul de Coomassie 0.06). El producto de reacción fue leído en un espectrofotómetro (Biorad SmartSpect 3000) a 620nm. La concentración de proteínas fue determinada interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva estándar de albúmina de suero bovino (1-10 μ g), la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo.

- **Cuantificación de nitritos por el Método de Griess** (Chao y cols 1992; Griess 1879)

Este método se basa en la reacción del analito en medio ácido para formar una sal de diazonio que acoplada a aminas aromáticas produce un colorante azo (Diazotización de Griess). Esta reacción de color es monitoreada fácilmente por medio de espectrofotometría.

La producción de óxido nítrico fue estimada a través del contenido del ión nitrito (NO_2^-) en los sobrenadantes de cerebro utilizando el método de Griess. El reactivo de Griess se compone de volúmenes iguales de dihidrocloruro de n-1nafiletilendiamino al 0.1% disuelto en agua destilada y sulfanilamida al 1.32% disuelto en ácido acético glacial al 60%. La reacción fue leída en un espectrofotómetro (Biorad SmartSpect 3000) a 540 nm. La concentración de (NO_2^-) se determinó interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de NaNO_2 (0.5 a 10 μ M), la cual se determinó paralelamente en cada ensayo.

- **Cuantificación de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiálquenos (4-HDA)** (Gerard-Monnier y cols 1998)

Los niveles de MDA y 4-HDA se cuantificaron por el método de Gerard-Monnier. Este ensayo se basa en la reacción entre N-metil-2-fenilindol con MDA y los 4-HDA a 45°C, una molécula de MDA o de 4-HDA reaccionan con dos moléculas de N-metil-2-fenilindol proporcionando un cromóforo estable que absorbe a 586 nm. El empleo de esta longitud de onda y de la temperatura de incubación (45°C) minimiza las interferencias presentes en otros métodos para determinar aldehídos derivados del proceso de peroxidación lipídica.

Para cuantificar lipoperoxidación en las muestras se tomaron 100µL del sobrenadante del cerebro, se le adicionaron 650 µL de la solución 1 (compuesta de N-metil-2-fenilindol a una concentración de 10.3 Mm en acetonitrilo y metanol), 100 µL de agua destilada, 150 µL de ácido metanosulfónico, las muestras se homogenizaron y se incubaron por una hora a 45°C en baño maría, después de la incubación se centrifugaron a 3000 rpm, por 15 minutos y se leyó el sobrenadante en un espectrofotómetro (Biorad SmartSpect 3000) a 586 nm. La concentración de MDA y 4-HDA fue determinada interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva patrón de MDA, 1,1,3,3-tetrametoxipropano (0.5 a 5 µM), la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo.

- **Determinación de Zinc** (Johnson y cols 1977)

Los niveles de zinc fueron cuantificados por el método de Johnson. Este ensayo se basa primero en la utilización de una concentración óptima de clorhidrato de guanidina para causar la liberación de zinc

de las proteínas, seguido de la formación de un enmascaramiento a través del complejo del zinc liberado con el cianuro. El complejo de cianuro-zinc es desenmascarado con hidrato de cloral, seguido de una reacción colorimétrica entre el zinc y el 4-(2-pyridylazo) resorcinol. Este complejo con zinc tiene una absorción máxima a 497 nm. Para cuantificar zinc en las muestras se tomaron 100 μL de sobrenadante de la muestra, más 100 μL de agua desionizada, 1 ml de guanidina, 100 μL de pyridylazo resorcinol, 50 μL de hidrato de cloral, una vez que se colocaron los reactivos se mezclaron y se esperó 5 minutos. Posteriormente, se leyó la muestra a 497 nm en el espectrofotómetro.

Control de calidad

El control de calidad metodológico y experimental se llevó a cabo mediante monitoreos previos a la realización de cada una de las partes que componen el experimento, para lo cual se verificó que ninguna de las variables como el horario de evaluación, la temperatura, el nivel y la opacidad del agua durante la evaluación del LAM. Las muestras fueron extraídas lo más rápido posible, colocadas en PBS frío y almacenadas a -70°C hasta el momento de su uso. Con ayuda de las curvas de calibración de las cuales se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.999, asegurando con esto la linealidad de los datos de cada una de las muestras, la exactitud y precisión del pipeteo. Se aseguró que todos los reactivos a emplear se encontraran en óptimos valores de pH, concentración de acuerdo a lo requerido para cada reactivo, para lo cual los reactivos fueron preparados un día antes de la realización del experimento, así como asegurar que todo el material a emplear durante el experimento se encontrará perfectamente limpio y libre de contaminantes que pudieran interferir en la determinación de los metabolitos de interés. Para la determinación de cada metabolito se siguieron pasos metódicos y de esta forma asegurar que todas las muestras se manejaran de la misma forma, las muestras fueron preparadas por triplicado y de esta manera disminuir el error en cada muestra, disminuyendo las alteraciones que pudieron haber en las muestras al momento de la obtención de los resultados.

Medidas de seguridad

En la realización de este trabajo se llevaron a cabo todas las medidas de seguridad establecidas por el Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas (LIQC).

Recursos humanos

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

Recursos materiales

El Bioterio del CINVESTAV- IPN aportó los animales de experimentación, el Laboratorio de Neurofarmacología de la Facultad de Ciencias Químicas aportó el Laberinto Acuático de Morris (LAM) y el LIQC de la misma facultad aportó los equipos y reactivos para las determinaciones bioquímicas empleadas para la realización de este trabajo.

Recursos financieros

Este proyecto es financiado por los proyectos de investigación de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP.

Resultados

Para evaluar el efecto de la administración subaguda de $ZnCl_2$ (2.5mg/kg de peso cada 24h durante 4 días) sobre el aprendizaje y la memoria tras un proceso hipoxico-isquémico cerebral en rata, los animales fueron sometidos a entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, obteniendo los siguientes resultados:

Los resultados de la figura 9. muestran el desempeño de los animales de experimentación en el laberinto acuático de Morris para los grupos: Control Aprendizaje/Memoria, el grupo al que sólo se le realizó la isquemia, los grupos que recibieron la administración subaguda de $ZnCl_2$ y el grupo al cual se le realizó la obliteración de la arteria carótida primitiva y posteriormente fueron sometidos al entrenamiento. En la gráfica se observa que no hay diferencias significativas en el tiempo de latencia para encontrar la plataforma de escape, durante todos los días de entrenamiento para cada grupo. Mientras que en la evaluación de la memoria se encuentran diferencias significativas para el grupo de isquemia respecto al grupo control.

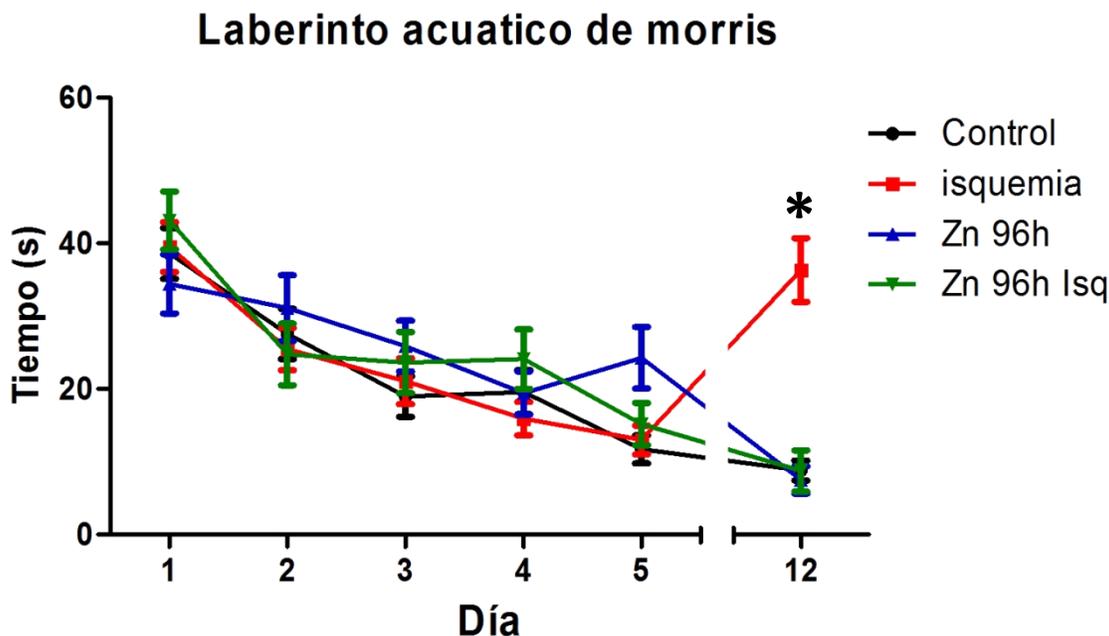


Figura 9. Evaluación del aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático de Morris para los 4 grupos: Control Aprendizaje/Memoria, isquemia, administración subaguda de $ZnCl_2$ y administración subaguda de $ZnCl_2$ + obliteración de la arteria carótida primitiva. Analizado por una prueba para datos no paramétricos, U de Mann-Whitney test, con una $P > 0.05$ comparando a los grupos experimentales contra el grupo control. Cada punto representa el promedio de 10 ratas por grupo en cada día del entrenamiento.

Los resultados de la figura 10. muestran el desempeño de los animales de experimentación en el laberinto acuático de Morris para los grupos: Control Aprendizaje/Memoria y el grupo al que sólo se le realizó la isquemia, en la gráfica se observa que no hay diferencias significativas en el tiempo de latencia para encontrar la plataforma de escape, durante todos los días de entrenamiento para cada grupo. En la evaluación de la memoria 7 días después de la evaluación del aprendizaje, se observa un incremento en el tiempo de latencia para ubicar la zona donde se encontraba la plataforma el cual tiene diferencias significativas respecto al grupo control con un incremento del $2753 \pm 139\%$.

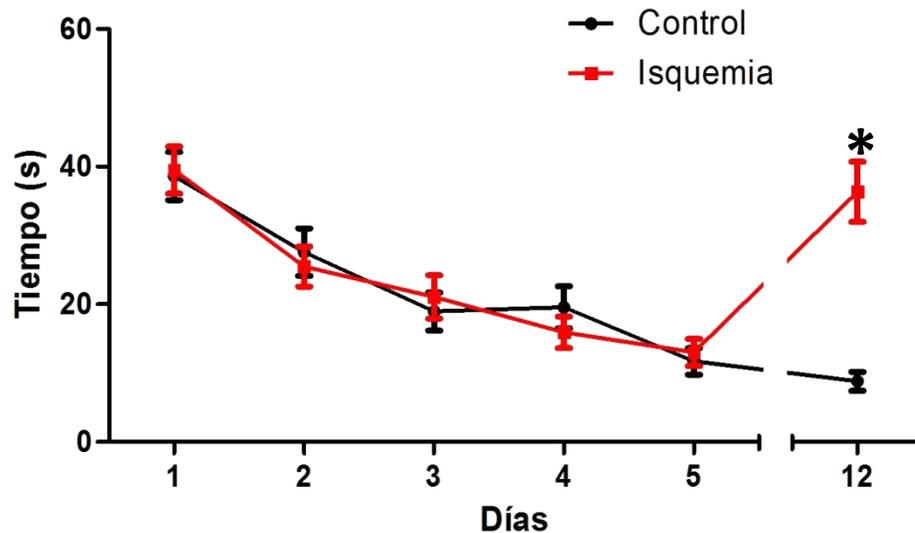


Figura 10. Evaluación del aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático de Morris para los grupos: Control Aprendizaje/Memoria e isquemia. *Analizado por una prueba para datos no paramétricos, U Mann-Whitney test, con una $P < 0.05$ comparando al grupo experimental contra el grupo control. Cada punto representa el promedio de 10 ratas por grupo en cada día del entrenamiento.

Los resultados de la figura 11. muestran el desempeño de los animales de experimentación en el laberinto acuático de Morris para los grupos: Control Aprendizaje/Memoria y el grupo que sólo recibió la administración subaguda de $ZnCl_2$, en la gráfica se observa que no hay diferencias significativas en el tiempo de latencia para encontrar la plataforma de escape, hasta el día 5 en el cual se observa un incremento en el tiempo de latencia al encontrar la plataforma en el grupo que recibió solamente la administración de $ZnCl_2$, el cual no es significativo. En la evaluación de la memoria 7 días después de la evaluación del aprendizaje, se observa que no hay diferencias significativas en los tiempos de latencia para ubicar la zona donde se encontraba la plataforma de escape.

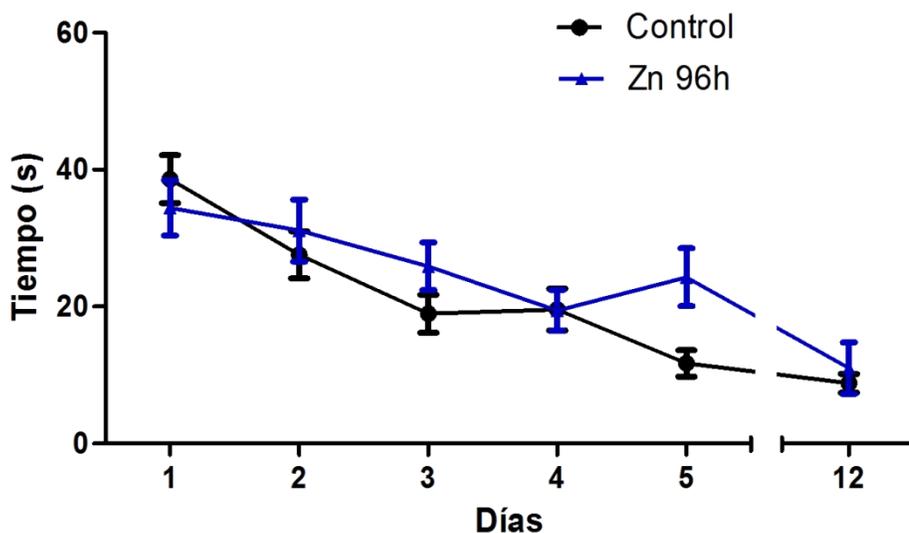


Figura 11. Evaluación del aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático de Morris para los grupos: Control Aprendizaje/Memoria y administración de $ZnCl_2$. Analizado por una prueba para datos no paramétricos, U Mann-Whitney test, con una $P < 0.05$ comparando al grupo experimental contra el grupo control. Cada punto representa el promedio de 10 ratas por grupo en cada día del entrenamiento.

Los resultados de la figura 12. muestran el desempeño de los animales de experimentación en el laberinto acuático de Morris para los grupos: Isquemia y el grupo que recibió la administración subaguda de $ZnCl_2$ y posteriormente se le realizó la OACP, en la gráfica se observa que hay una tendencia a incrementar los tiempos de latencia para encontrar la plataforma en el grupo Zn 96h Isquemia, la cual no es estadísticamente significativa. En la evaluación de la memoria 7 días después de la evaluación del aprendizaje, se observa que hay un buen proceso de recuperación de la información en el grupo Zn 96h Isquemia, a diferencia del grupo isquémico en el cual se observa un incremento en los tiempos de latencia para ubicar la zona en la que se encontraba la plataforma, aunque la diferencia no sea estadísticamente significativa.

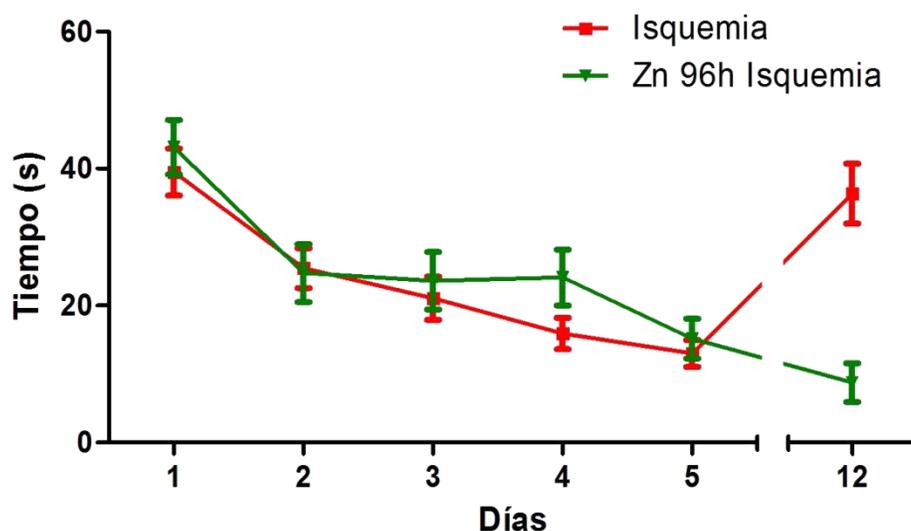


Figura 12. Evaluación del aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático de Morris para los grupos: Isquemia y administración de $ZnCl_2$ + obliteración de la arteria carótida primitiva. Analizado por una prueba para datos no paramétricos, U Mann-Whitney test, con una $P < 0.05$ comparando al grupo experimental contra el grupo control. Cada punto representa el promedio de 10 ratas por grupo en cada día del entrenamiento.

Los resultados de la figura 13. muestran el desempeño de los animales de experimentación en el laberinto acuático de Morris para los grupos: Administración subaguda de $ZnCl_2$ y administración subaguda de $ZnCl_2$ y OACP, en la gráfica se observa que no hay diferencias significativas en los tiempos de latencia durante el proceso de aprendizaje. En la evaluación de la memoria 7 días después de la evaluación del aprendizaje, se observa que no hay diferencias significativas en el proceso de recuperación de la información al ubicar la zona en la que se encontraba la plataforma de escape, para ambos grupos.

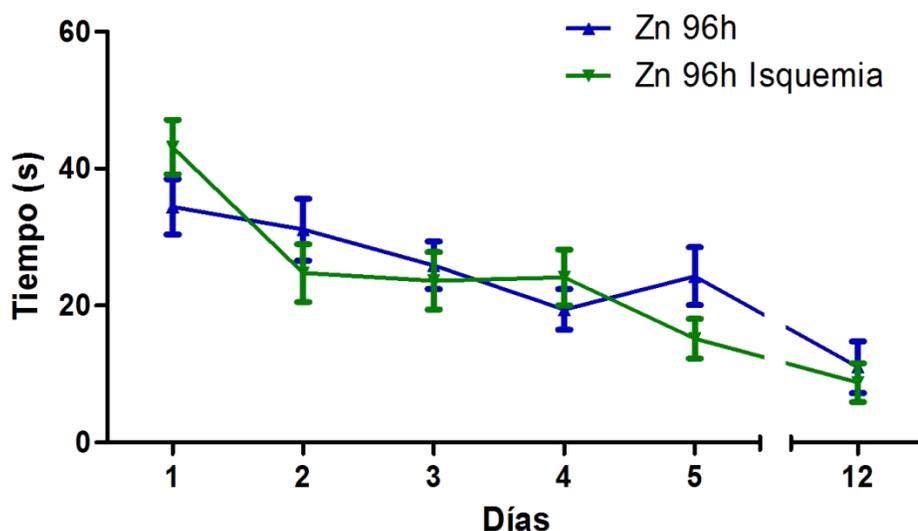


Figura 13. Evaluación del aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático de Morris para los grupos: Administración de $ZnCl_2$ y administración de $ZnCl_2$ + obliteración de la arteria carótida primitiva. Analizado por una prueba para datos no paramétricos, U Mann-Whitney test, con una $P < 0.05$ comparando al grupo experimental contra el grupo control. Cada punto representa el promedio de 10 ratas por grupo en cada día del entrenamiento.

Los resultados de la figura 14. muestran el desempeño de los animales de experimentación en el laberinto acuático de Morris en el ultimo ensayo de cada día para todos los grupos: Control Aprendizaje/Memoria, el grupo al que sólo se le realizó la isquemia, los grupos que recibieron la administración subaguda de $ZnCl_2$ y el grupo al cual se le realizó la obliteración de la arteria carótida primitiva y posteriormente fueron sometidos al entrenamiento. a) se observa una tendencia a la disminución de las latencias de escape conforme la evaluación avanza respecto al día 1 en el grupo Control Ap/Mem. b) se observa una uniformidad en las latencias de escape a lo largo de la evaluación de aprendizaje respecto al día 1, mientras que en la memoria se observa un incremento en el tiempo de escape en el grupo Isquemia c)

se observa una uniformidad en las latencias de escape a lo largo de la evaluación de aprendizaje respecto al día 1 en el grupo Zn 96h Ap/Mem. d) se muestra una tendencia a disminuir la latencia de escape pero solo en el día 2 el cual es estadísticamente significativo respecto al día 1.

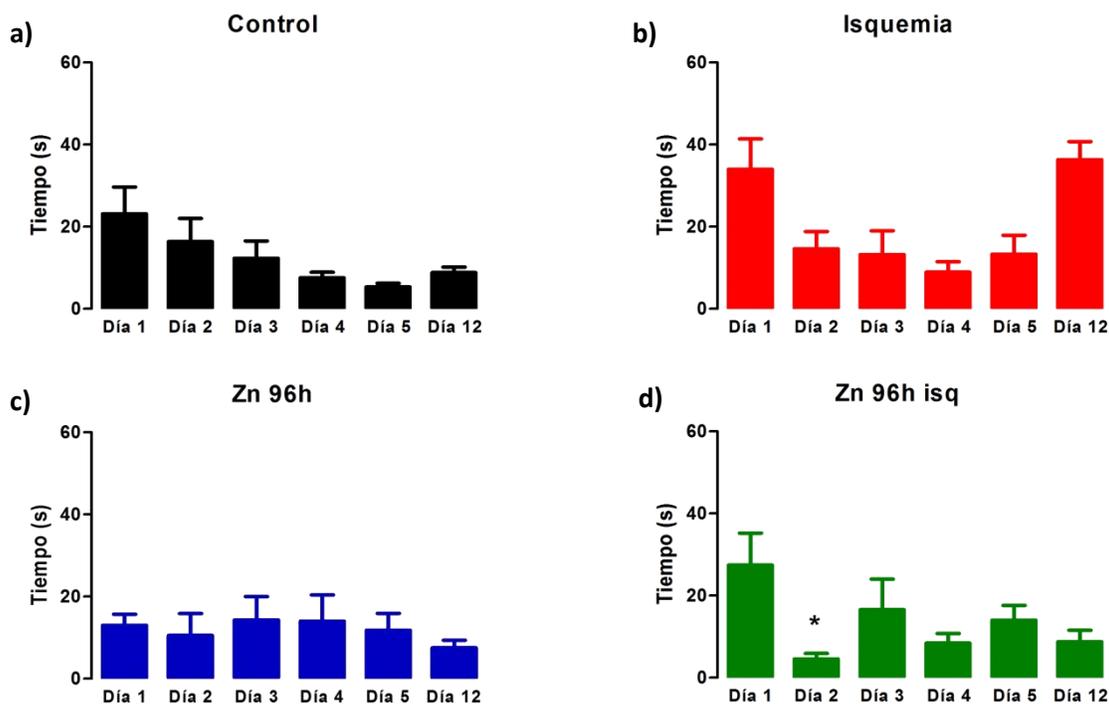


Figura 14. Tiempo de latencia del último ensayo en cada día de la evaluación de aprendizaje, así como la latencia para localizar el cuadrante SE (cuadrante donde se encontraba la plataforma de escape) en la evaluación de la memoria (un ensayo 7 días del último día de aprendizaje). * Analizado por ANOVA de una vía para datos no paramétricos, Kruskal-Wallis test y un post-test Dunns con una P 0.01- 0.05 comparando todos los datos. Las barras muestran el promedio \pm SEM de 5 ratas.

Los resultados de la figura 15. muestran el desempeño de los animales de experimentación en el laberinto acuático de Morris en la evaluación de la memoria 7 días después del último ensayo de aprendizaje para los grupos: Control Aprendizaje/Memoria, el grupo al que sólo se le realizó la isquemia, los grupos que recibieron la administración subaguda

de $ZnCl_2$ y el grupo al cual se le realizó la obliteración de la arteria carótida primitiva y posteriormente fueron sometidos al entrenamiento. a) se muestra la latencia de los roedores en cada grupo para encontrar el cuadrante donde se encontraba la plataforma (SE). Se encuentra que hay diferencias entre los grupos experimentales isquemia respecto al control con un incremento del $2753 \pm 139\%$. b) se muestra el promedio de veces correctas que el roedor paso por el cuadrante donde se encontraba la plataforma. En el cual no se observan diferencias entre los grupos experimentales.

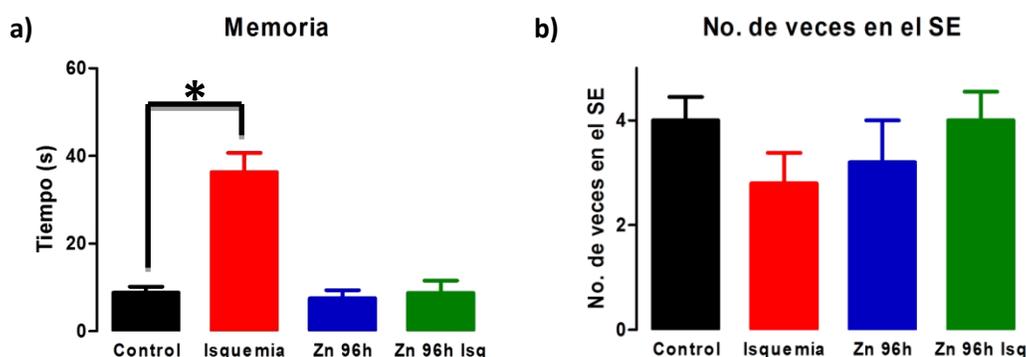


Figura 15. Evaluación de la memoria 7 días después del último ensayo de aprendizaje en el que se registra la latencia de llegada y el número de aciertos al cuadrante donde se encontraba la plataforma de escape. *Analizado por una prueba para datos no paramétricos, U Mann-Whitney test, con una $P < 0.05$ comparando al grupo experimental contra el grupo control. Cada punto representa el promedio de 10 ratas por grupo en cada día del entrenamiento.

Los resultados de la figura 16. muestran los niveles de nitritos determinados en la corteza temporoparietal izquierda de los grupos: Control Aprendizaje/Memoria, el grupo al que sólo se le realizó la isquemia, los grupos que recibieron la administración subaguda de $ZnCl_2$ y el grupo al cual se le realizó la obliteración de la arteria carótida primitiva y posteriormente fueron sometidos al entrenamiento. a) se muestran los niveles de nitritos normalizados contra el control sin tratamiento en las

muestras de los grupos que fueron sometidos a aprendizaje, en los cuales no se observan diferencias significativas. b) se muestran los niveles de nitritos normalizados en las muestras de los grupos que fueron sometidos a aprendizaje y memoria, en los cuales no se observan diferencias significativas entre el grupo Zn 96h respecto al grupo control, se observan cambios significativos del grupo Zn 96h isq respecto al grupo control con una disminución del $59.5 \pm 8.3\%$, se observan cambios significativos del grupo Zn 96h isq respecto al grupo Zn 96h con una disminución de $64.4 \pm 9.4\%$.

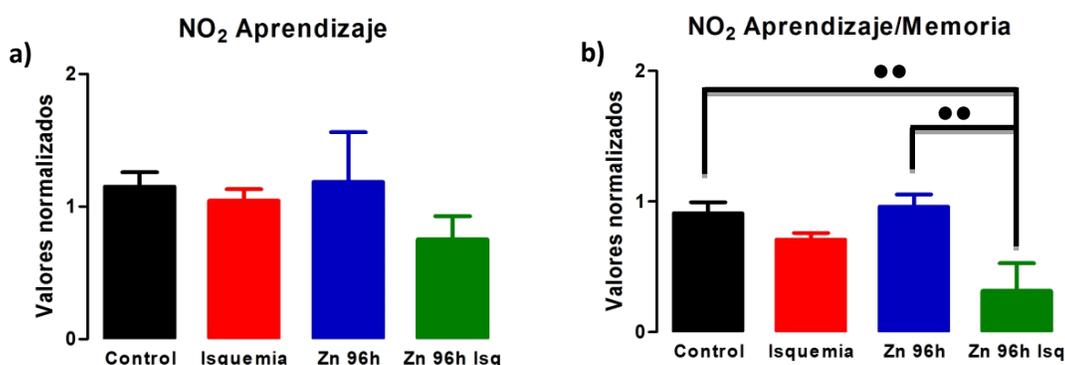


Figura 16. Determinación de nitritos por el método de Griess. Analizado por ANOVA de una vía para datos paramétricos y un post-test Dunnet con una $P > 0.05$ comparando todos los grupos. •• Analizado por ANOVA de una vía para datos paramétricos y un post-test Dunnet con una $P 0.001- 0.01$ comparando todos los grupos. Las barras muestran el promedio \pm SEM.

Los resultados de la figura 17. muestran los niveles de MDA y 4-HDA determinados en la corteza temporoparietal izquierda de los grupos: Control Aprendizaje/Memoria, los grupos que recibieron la administración subaguda de $ZnCl_2$ y el grupo al cual se le realizó la obliteración de la arteria carótida primitiva y posteriormente fueron sometidos al entrenamiento. a) se muestran los niveles de MDA y 4-HDA normalizados contra el control sin tratamiento en las muestras de los grupos que fueron sometidos a aprendizaje, en el cual se observan diferencias significativas

del grupo Zn 96h isq respecto al grupo Isquemia con una disminución del $50.2 \pm 32.6\%$. b) se muestran los niveles de MDA y 4-HDA normalizados en las muestras de los grupos que fueron sometidos a aprendizaje y memoria, en el cual se observan cambios significativos en el grupo isquemia respecto al grupo control con un incremento del $71.4 \pm 5.5\%$, de igual manera hay diferencias del grupo Zn 96h respecto al grupo control con un incremento del $37.8 \pm 5.5\%$, se encuentran diferencias en el grupo Zn Isq respecto al control con una disminución de $20.36 \pm 5.5\%$, cuando se realiza la comparación entre los grupos que recibieron la isquemia se observan diferencias significativas del grupo Zn 96h Isq respecto al grupo Isquemia con una disminución del $51 \pm 9.4\%$ y finalmente se observan diferencias significativas del grupo Zn 96h Isq respecto al grupo Zn 96h con una disminución del $17.48 \pm 13.6\%$.

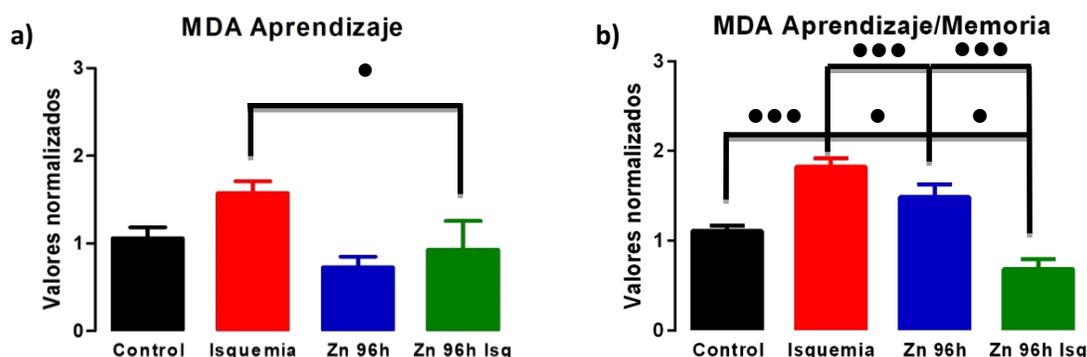


Figura 17. Determinación de MDA y 4-HDA por el método de Gerard Monier. Analizado por ANOVA de una vía para datos paramétricos y un post-test Dunnet con una $P > 0.05$ comparando todos los grupos. • Analizado por ANOVA de una vía para datos paramétricos y un post-test Dunnet con una $P 0.01 - 0.05$ comparando todos los grupos. ••• Analizado por ANOVA de una vía para datos paramétricos y un post-test Dunnet con una $P 0.001 - 0.01$ comparando todos los grupos. Las barras muestran el promedio \pm SEM.

Los resultados de la figura 18. muestran los niveles de Zn^{2+} determinados en la corteza temporoparietal izquierda de los grupos: Control Aprendizaje/Memoria, los grupos que recibieron la administración subaguda de $ZnCl_2$ y el grupo al cual se le realizó la obliteración de la

arteria carótida primitiva y posteriormente fueron sometidos al entrenamiento. a) se muestran los niveles de Zn^{2+} normalizados contra el control sin tratamiento en las muestras de los grupos que fueron sometidos a aprendizaje, en los cuales se observan diferencias entre el grupo Zn 96h respecto al grupo control con un incremento de $59.8 \pm 13.7\%$, en el grupo de Zn 96h se encuentran diferencias significativas respecto al grupo isquemia con un incremento de $78.2 \pm 15.3\%$ y se encuentran diferencias del grupo Zn 96h Isq respecto al grupo Zn 96h con una disminución del $63.3 \pm 17\%$. b) se muestran los niveles de Zn^{2+} normalizados contra el control sin tratamiento en las muestras de los grupos que fueron sometidos a aprendizaje y memoria, en los cuales se observan diferencias entre el grupo Zn 96h respecto al grupo control con un incremento de $214.1 \pm 15.6\%$, en el grupo de Zn 96h se encuentran diferencias significativas respecto al grupo isquemia con un incremento de $162 \pm 7.1\%$ y se encuentran diferencias del grupo Zn 96h Isq respecto al grupo Zn 96h con una disminución de $115 \pm 60.3\%$.

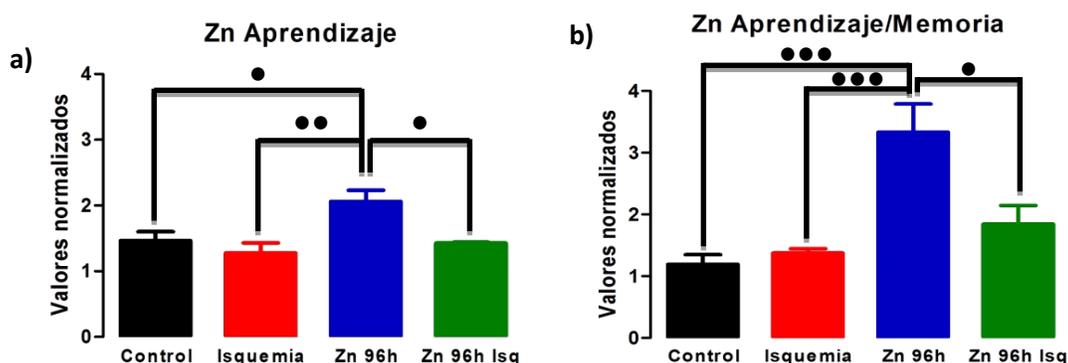


Figura 18. Determinación de Zn^{2+} por el método de Johnson. • Analizado por ANOVA de una vía para datos paramétricos y un post-test Dunnet con una P 0.01-0.05 comparando todos los grupos. •• Analizado por ANOVA de una vía para datos paramétricos y un post-test Dunnet con una P 0.001- 0.01 comparando todos los grupos. ••• Analizado por ANOVA de una vía para datos paramétricos y un post-test Dunnet con una P < 0.001 comparando todos los grupos. Las barras muestran el promedio \pm SEM.

Discusión de resultados

Los resultados de este trabajo muestran que la administración subaguda de zinc previene la pérdida de la memoria y estrés nitrosativo causada por la OACP, como se observa en el grupo que recibió sólo la isquemia. En las cuantificaciones de los metabolitos se encontró que la administración subaguda de zinc causó la acumulación del metal en la corteza temporoparietal en ratas que sólo fueron tratadas con zinc, en el tiempo en el que se realizó prueba final de aprendizaje y la memoria.

El aprendizaje y la memoria son aspectos cognitivos estudiados a lo largo de muchos en los cuales se encuentran involucrados diversos mecanismos, los cuales están regulados desde distintos puntos e influyen diversas moléculas las cuales son esenciales para que se lleve a cabo. El zinc es un metal involucrado en el aprendizaje y la memoria, diversos estudios han relacionado la deficiencia de zinc con dificultad en el proceso de adquisición y recuperación de información cuando el animal de experimentación es sometido a una tarea (Piechal y cols 2011).

En el grupo control se observó que conforme avanza el entrenamiento los animales cambian la ruta de llegada hacia la plataforma de escape, lo que se ve reflejado en la disminución en los tiempos de latencia, dicho de otra forma el aprendizaje se logra por la experiencia y se perfecciona con la práctica (Oyuela, y cols 2004). En cuanto a la memoria se obtuvieron valores muy parecidos a los registrados el último día del entrenamiento, lo que nos da un indicio de que los animales guardaron, recuerdan y están recuperando la información que se les presentó durante el entrenamiento (Stuchlik 2014).

En el grupo al cual se le realizó la isquemia y posteriormente fue sometido al entrenamiento, no se observan cambios significativos en los tiempos de latencia registrados respecto al grupo control, lo cual podría ser debido a que en una fase temprana posterior al daño isquémico el sistema no se ve alterado, mientras que en la fase tardía al tiempo en que se realiza la evaluación de la memoria hay un incremento en los tiempos de latencia, lo cual nos da un indicativo de daño en la fase tardía posterior al proceso isquémico, el cual impide una correcta recuperación de la información.

En el grupo que recibió sólo la administración de zinc, no se observan variaciones en el periodo del entrenamiento y en la evaluación de la memoria, el comportamiento del grupo es muy similar al obtenido por el grupo control, en diversos estudios se ha demostrado que una larga exposición al zinc o en altas concentraciones causa muerte celular y puede causar un déficit en el aprendizaje y la memoria (Moazedi, Valizadeh y Parham 2008; Grabrucker y cols 2011).

La administración subaguda de zinc mostró tener un efecto protector sobre el aprendizaje y la memoria, en un modelo de trauma, donde la suplementación de zinc en la dieta o por vía parental redujo la depresión asociada a un daño cerebral traumático y mejoró la función cognitiva, especialmente el aprendizaje y memoria. Sin embargo, en este estudio observamos que la administración subaguda de zinc causó un incremento de zinc, con un ligero decremento de lipoperoxidación en comparación con el grupo isquémico, pero mayor cuando se compara cuando se realizó la isquemia, esto pudiera ser debido a que la excesiva liberación de zinc libre, particularmente en el hipocampo, lo que se ha asociado con daño celular. Por lo que, la administración de zinc debe ser considerado para no rebasar la concentración de zinc [Morris y Levenson 2013]. Sin

embargo, el zinc ha mostrado tener un efecto preconditionante como lo hace en un preconditionamiento isquémico, causando una resistencia y tolerancia para responder ante un daño mayor [Aras 2011; Thompson 2012]. Además, la suplementación de zinc resultó en un desarrollo motor en infantes [Bhatnagar y Taneja 2001]. Este efecto ocurre a través de la inducción mediada de ERK o p38 MAPK de HSP70 que juega un papel importante al inhibir la activación caspasa-3 durante el preconditionamiento de zinc [Lee y cols 2015].

En cuanto a los metabolitos estudiados, se observa que hay una disminución en los niveles de nitritos en los grupos de aprendizaje y memoria, que recibieron la administración subaguda de $ZnCl_2$ y posteriormente la OACP, se ha demostrado que el zinc tiene un efecto inhibitor sobre la expresión de iNOS a través de la inhibición de A20 que inhibe IKKB, y así la activación de $NF\kappa B$ (Cortese-Krott y cols 2014), siendo iNOS asociado al daño neuronal después de una hipoxia [Li y cols 2004]. Otros estudios han mostrado que la suplementación de la combinación de nutrientes tales como metionina, taurina, zinc, ácido ascórbico y glicina disminuyen la latencia de escape, incrementando la actividad de SOD, NOS y los niveles de NO en el hipocampo [Fan y cols 2009]. Por otro lado, el zinc estabiliza a la nNOS [Hemmens y cols 2000], que ha sido implicada en la modulación de las funciones fisiológicas tales como aprendizaje, y la memoria [Piechal y cols 2011; Bhatnagar y Taneja 2001; Joshi y cols 2012], también está involucrado en un gran número de enfermedades [Zhou y Zhu 2009]. El óxido nítrico derivado de la nNOS está asociado con la plasticidad neuronal cuando se somete a roedores en un medio ambiente enriquecido, mejorando el aprendizaje y memoria.

La administración subaguda de zinc ha mostrado que disminuye la lipoperoxidación causada por la OACP (Blanco-Alvarez y cols 2013), como

ha sido sugerido en este trabajo, el efecto protector de la administración de zinc ocurre al disminuir el estrés nitrosativo y la muerte celular, previniendo así la pérdida de la memoria.

Se encontró un incremento en la acumulación de zinc en la corteza cerebral en el grupo que sólo recibió la administración de $ZnCl_2$, respecto a los demás grupos. Diversos estudios relacionan al zinc en el proceso de aprendizaje y memoria, en los que su deficiencia o exceso provoca cierto déficit cognitivo (Yang y cols 2013). Sin embargo, cuando la suplementación del metal es a una dosis adecuada se mejoran los procesos de consolidación de la información (aprendizaje) y la recuperación de la misma (memoria). Se sugiere que el zinc participa en el mecanismo de LTP (Siegel y cols 2006; Takeda y Tamano 2014; Sensi y cols 2011), en la neurogenesis a través de la regulación del ciclo celular (Levenson y Morris 2011), incrementando la expresión de factores de crecimiento (Adamo y Oteiza 2010; Blanco Alvarez 2013 tesis de maestría) y disminuyendo la muerte celular (Adamo y Oteiza 2010; Matsushita y cols 1996).

Conclusión

La administración subaguda de zinc previene la pérdida de la memoria causado por un evento hipóxico-isquémico cerebral, a través de la disminución del estrés nitrosativo.

Perspectivas

- Realizar el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris por un periodo de tiempo más prolongado.
- Realizar las determinaciones de los metabolitos en tiempos intermedios del entrenamiento, para evaluar cómo cambian a lo largo del proceso de aprendizaje y en la memoria.
- Realizar cortes histológicos del hipocampo y observar si hay cambios en la arquitectura celular a lo largo del proceso de aprendizaje y en la memoria.
- Realizar la cuantificación de otros metales y determinar el efecto que el zinc tiene sobre ellos.
- Realizar la cuantificación de otros marcadores de daño y de neuroprotección en el cerebro que se encuentren relacionados al proceso isquémico cerebral y al efecto protector del zinc.

Bibliografía

1. OMS 2014
2. INEGI. 25 de Septiembre de 2009.
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2009/corazon09.asp?c=2740&ep=21> (último acceso: 22 de Julio de 2014).
3. Martínez-Vila, E., M. Murie Fernández, I. Pagola, y P. Irimia. «Enfermedades cerebrovasculares.» *Medicine*, 2011: 4871-4881.
4. NINDS. Instituto Nacional de Transtornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares. Diciembre de 2000.
http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/accidente_cerebrovascular.htm#CVI (último acceso: 19 de Octubre de 2014).
5. GeoSalud. GeoSalud . s.f.
http://www.geosalud.com/Enfermedades%20Cardiovasculares/accidente_cerebrovascular.htm (último acceso: 19 de Octubre de 2014).
6. Neurología, Departamento de. «Hospital de la Universidad de Nuevo México.» <http://hospitals.unm.edu/>. s.f.
http://hospitals.unm.edu/stroke/documents/hemorrhagic_spanish.pdf (último acceso: 19 de Octubre de 2014).
7. García Fernández, Miguel A., Javier Bermejo, y Mar Moreno. «Utilidad de las técnicas de imagen en la valoración etiológica y toma de decisiones en el paciente con ictus.» *Revista Española de Cardiología*, 2003: 1119-1132.
8. Candelario-Jalil, E, Y Yang, y GA Rosenberg. «Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia.» *Neuroscience*, 2009: 983-994

9. Fujimura, M, y otros. «Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome C and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice.» *Journal of Neuroscience*, 1999: 3414-3422.
10. Mena López, Raúl. *Neurobiología de los trastornos neuropsiquiátricos más prevalentes en México*. México: D´R, 2009.
11. Shuttleworth, C. William, y John H. Weiss. «Zinc: new clues to diverse roles in brain ischemia.» *Trends Pharmacol Sci*, 2011: 480-486
12. Galasso, Sherri L., y Richard H Dyck. «The role of zinc in cerebral ischemia .» *Molecular Medicine*, 2007: 380-387.
13. Pandya, Rachna S., y otros. «Central nervous system agents for ischemic stroke: neuroprotection mechanisms.» *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 2011: 81-97.
14. Mattson MP, LaFerla FM, Chan SL, Leissring MA, Shepel PN, Geiger JD. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*. 2000; 23:222-9.
15. Mattson MP, Culmsee C, Yu ZF. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res*. 2000; 301:173-87.
16. Flores-Soto, M.E., V. Chaparro-Huerta, M. Escoto-Delgadillo, E. Vazquez-Valls, R.E. González-Castaneda, y C. Beas-Zarate. «Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA.» Elsevier, 2012: 301-310
17. Hassel, Bjørnar, y Raymond Dingleline. «Glutamate.» En *Basic Neurochemistry Molecular, cellular and medical aspects*, de George J. Siegel, R. Wayne Albers, Scott T. Brady y Donald L. Price, 267-301. San Diego, California: Elsevier, 2006
18. Forstermann, Ulrich, y William C. Sessa. «Nitric oxide synthases: regulation and function.» *European Society of Cardiology*, 2012: 829-837

19. Zheng Jiang, Chun Li, Denise M. Arrick, Shu Yang, Alexandra E. Baluna, Hong Sun. «Role of Nitric Oxide Synthases in Early Blood-Brain Barrier Disruption following Transient Focal Cerebral Ischemia.» PLOS ONE, 2014: 1-9
20. Bredt DS. «Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and patho-physiology. » Free Radic Res 1999: 577–596
21. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzitelli E, Butterfield DA, Stella AM. «Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. » Nat Rev Neurosci 2007: 766–775.
22. Knowles RG, Moncada S. «Nitric oxide synthases in mammals. » Biochem 1994: 249–258.
23. Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. «Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. » Neuroscientist 2010: 435–452
24. Blanco-Alvarez, VM. Efecto de la administración subaguda de zinc sobre la transcripción genética de quimiocinas, sus receptores y factores de crecimiento durante un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata. Puebla. Pue.: Tesis de Maestría, 2013
25. Silvia Pfeiffer, Eva Leopold, Kurt Schmidt, Friedrich Brunner and Bernd Mayer. «Inhibition of nitric oxide synthesis by NG^{*}nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine.» British Journal of Pharmacology, 1996: 1433-1440
26. Cirino G, Fiorucci S, Sessa WC. «Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation?» Trends Pharmacol Sci., 2003: 91-95
27. Bhatnagar S, Taneja S. «Zinc and cognitive development.» Journal of Nutrition, 2001: 139-145
28. Agnieszka Piechal, Kamilla Blecharz-Klin, Justyna Pyrzanowska, Ewa Widy-Tyszkiewicz. «Maternal Zinc Supplementation Improves Spatial Memory in Rat Pups.» Biol Trace Elem Res, 2012: 299-308

29. López de Romaña, Daniel, Carlos Castillo D., y Doricela Diazgranados . «El zinc en la salud humana.» Revista Chilena de nutrición, 2010: 234-239.
30. Rico Bodes JI, Pérez López M. «La actividad física y el zinc: una revisión.» Archivos medicina del deporte, 2011: 36-44
31. Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, Kuroski T, Yamashita S, Tokunaga M, Nishida K, Hirano T. «Zinc is a novel intracellular second messenger.» Journal of Cell Biology, 2007 : 637-645
32. Matsushita, K., y otros. «Effect of systemic zinc administration on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus.» Brain Res, 1996: 362-365
33. Tahmasebi Boroujeni, S., y otros. «The Effect of Severe Zinc Deficiency and Zinc Supplement on Spatial Learning and Memory.» Biol Trace Elem Res, 2009 : 48-61
34. Levenson, Cathy W. «Regulation of the NMDA receptor: Implications for neuropsychological development.» Nutrition Reviews, 2006: 428-432
35. Levenson, Cathy W., y Deborah Morris . «Zinc and neurogenesis: making new neurons from development to adulthood.» American Society for Nutrition, 2011: 96-100
36. Brown K. Simposium sobre Zinc en Nutrición Humana, Octubre 2003, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú
37. Grabrucker AM, Rowan M, Garner CC. «Brain-Delivery of Zinc-Ions as Potential Treatment for Neurological Diseases: Mini Review.» NIH Public Access, 2011: 13-23
38. Colvin RA, Fontaine CP, Laskowski M, Thomas D. «Zn²⁺ transporters and Zn²⁺ homeostasis in neurons.» Elsevier Science, 2003: 171-185

39. Sandström, B., y A. Cederblad. «Zinc absorption from composite meals.» *Am J Clin Nutr*, 1980: 1778-1783
40. Gibson, RS , y EL Ferguson . «Assessment of dietary zinc in a population.» *Am J Clin Nutr*, 1998: 430-434
41. Plum, Laura M., Lothar Rink, y Hajo Haase. «The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health.» *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2010: 1342-1365
42. Morris DR, Levenson CW. «Zinc in traumatic brain injury: from neuroprotection to neurotoxicity.» *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 2013: 708-713
43. Takeda A, Tamano H. «Cognitive decline due to excess synaptic Zn(2+) signaling in the hippocampus.» *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2014: 1-7
44. Gidday, JM. «Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance.» *Nature reviews neuroscience*, 2006: 437-448
45. Kitagawa Y, Wada O. «Pharmacokinetics of trace elements by noncompartmental analysis in rats (Part 1): Significance of the pharmacokinetic parameters.» *Nihon Eiseigaku Zasshi*, 1990: 1097-1106
46. Garnier P, Ying W, Swanson RA. «Ischemic preconditioning by caspase cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase-1.» *Journal of neuroscience*, 2003 : 7967-7973
47. McLaughlin B, Hartnett KA, Erhardt JA, Legos JJ, White RF, Barone FC, Aizenman E. «Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003: 715-720
48. Tanaka M, Mokhtari GK, Terry RD, Balsam LB, Lee KH, Kofidis T, Tsao PS, Robbins RC. «Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) suppresses ischemia-reperfusion injury and

- subsequent development of graft coronary artery disease in murine cardiac grafts.» *Circulation*, 2004: 11200-11206
49. Lee JY, Kim YJ, Kim TY, Koh JY, Kim YH. «Essential role for zinc-triggered p75NTR activation in preconditioning neuroprotection.» *Journal of neuroscience*, 2008: 10919-10927
50. Nishimura M, Sugino T, Nozaki K, Takagi Y, Hattori I, Hayashi J, Hashimoto N, Moriguchi T, Nishida E. «Activation of p38 kinase in the gerbil hippocampus showing ischemic tolerance.» *Nature Publishing Group*, 2003: 1052-1059
51. Raval AP, Dave KR, Mochly-Rosen D, Sick TJ, Pérez-Pinzón MA. «Epsilon PKC is required for the induction of tolerance by ischemic and NMDA-mediated preconditioning in the organotypic hippocampal slice.» *Journal Neuroscience*, 2003: 384-391
52. Adamo AM, Oteiza PI. «Zinc deficiency and neurodevelopment: the case of neurons.» *Biofactors*, 2010: 117-124
53. Machado, S., y otros. «Aprendizaje y memoria implícita: mecanismos y neuroplasticidad.» *Revista de Neurología*, 2008: 543-549.
54. Takeda A, Sawashita J, Okada S. «Biological half-lives of zinc and manganese in rat brain.» *Brain research*, 1995: 53-58
55. Ketterman JK, Li YV. «Presynaptic evidence for zinc release at the mossy fiber synapse of rat hippocampus.» *Journal of neuroscience research*, 2008: 422-434
56. Martínez-Guijarro FJ, Soriano E, Del Río JA, López-García C. «Zinc-positive boutons in the cerebral cortex of lizards show glutamate immunoreactivity.» *Journal of neurocytology*, 1991: 834-843
57. Nacher J, Palop JJ, Ramirez C, Molowny A, López-García C. «Early histological maturation in the hippocampus of the guinea pig.» *Brain, behavior and evolution*, 2000: 38-44

58. Takeda A, Tamano H. «Cognitive decline due to excess synaptic Zn(2+) signaling in the hippocampus.» *Frontiers in aging neuroscience*, 2014: 1-7
59. Bliss TV, Collingridge GL. «Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide.» *Molecular brain*, 2013: 1-14
60. Kempermann G. «New neurons for 'survival of the fittest'.» *Nature reviews. Neuroscience*, 2012: 727-736
61. L., Aguado-Aguilar. «Aprendizaje y memoria.» *Revista de Neurología*, 2001: 373-381
62. Babbeley A. «Mc Graw-Hill Interamericana de España.» *Mc Graw-Hill Interamericana de España. s.f.*
<http://www.mcgraw-hill.es/bcv/guide/capitulo/8448180607.pdf>
(último acceso: 12 de enero de 2015)
63. Tolman EC. «Cognitive maps in rats and men.» *Psychological review*, 1948 : 189-208
64. Thinus-Blanc C. «Exploration and spatial knowledge.» En *Animal Spatial Cognition. Behavioral and Neural Approaches*, de Thinus-Blanc C., 1-42. Singapore: Word Scientific, 1996
65. Paul CM, Magda G, Abel S. «Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents.» *Behavioural brain research*, 2009: 151-164
66. Kessels RP, de Haan EH, Kappelle LJ, Postma A. «Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions.» *Brain research reviews*, 2001: 295-303
67. Cope EC, Morris DR, Levenson CW. «Improving treatments and outcomes: an emerging role for zinc in traumatic brain injury.» *Nutrition reviews*, 2012: 410-413

68. González Vázquez, Alejandro. Óxido nítrico influye en el aprendizaje y la memoria tras un proceso hipoxico isquemico cerebral en rata. Puebla, Puebla.: Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, 2015.
69. Morris R. «Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat.» *Journal of neuroscience methods*, 1984: 47-60
70. Myhrer T. «Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks.» *Brain research reviews*, 2003: 268-287
71. Vicens P, Redolat R, Carrasco MC. «Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones.» *Psicothema*, 2003: 539-544
72. Bolding K, Rudy JW. «Place learning in the Morris water task: making the memory stick.» *Learning & memory*, 2006: 278-286
73. Morris RGM. «Spatial localization does not require the presence of local cues.» *Learning and motivation*, 1981: 239-260
74. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. «Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions.» *Nature*, 1982: 681-683
75. Sedmak, J.J, y S.E Grossberg. «A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250.» *Anal Biochem*, 1977: 544-552.
76. J. P. Griess, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1879, 12, 426.
77. Chao, CC, S Hu, TW Molitor , EG Shaskan, y PK Peterson . «Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism.» *J Immunol.*, 1992: 2736-4741.
78. Gerard-Monnier, D, I Erdelmeier, K Régnard, N Moze-Henry, JC Yadan , y J Chaudière. «Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation.» *Chem Res Toxicol*, 1998: 1176-1183.

79. Johnson, Deadre J., Yin-Ying Djuh, Joseph Bruton, y Harold L. Williams. «Improved Colorimetric Determination of Serum Zinc.» *Clin. Chem.*, 1977: 1321-1323.
80. Oyuela, R., y otros. «Efecto en el aprendizaje y la memoria espacial de un péptido sintético en ratas: estudio preliminar.» *Psicología desde el Caribe*, 2004: 1-14.
81. Stuchlik, Ales. «Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update.» *Frontiers in behavioral neuroscience*, 2014: 1-6
82. Moazedi, A.A., Z. Valizadeh, y G.H.A. Parham. «The role of CA1hippocampus NMDA receptors to passive avoidance task in presence and absence of ZnCl₂ in adult male rats.» *Journal of Biological Sciences*, 2008: 1205-1210
83. Aras MA, Aizenman E. «Redox regulation of intracellular zinc: molecular signaling in the life and death of neurons.» *Antioxidants and redox signaling*, 2011: 2249-2263
84. Thompson JW, Narayanan SV, Perez-Pinzon MA. «Redox signaling pathways involved in neuronal ischemic preconditioning.» *Current Neuropharmacology*, 2012: 354-369
85. Lee JM, Lee JM, Kim KR, Im H, Kim YH. «Zinc preconditioning protects against neuronal apoptosis through the mitogen-activated protein kinase-mediated induction of heat shock protein 70.» *Biochemical and biophysical research communications*, 2015: 220-226
86. Cortese-Krott, Miriam M., Larissa Kulakov, Christian Oplander, Victoria Kolb-Bachofen, Klaus-D. Kroncke, y Christoph V. Suschek. «Zinc regulates iNOS-derived nitric oxide formation in endothelial cells.» *Elsevier*, 2014: 945-954.

87. Li L, Zhang J, Block ER, Patel JM. «Nitric oxide-modulated marker gene expression of signal transduction pathways in lung endothelial cells.» *Nitric oxide*, 2004: 290-297
88. Fan G, Feng C, Li Y, Wang C, Yan J, Li W, Feng J, Shi X, Bi Y. «Selection of nutrients for prevention or amelioration of lead-induced learning and memory impairment in rats.» *The Annals of occupational hygiene*, 2009: 341-351
89. Hemmens B, Goessler W, Schmidt K, Mayer B. «Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase.» *The Journal of biological chemistry*, 2000: 35786-35791
90. Joshi, M., M. Akhtar, A.K. Najmi, A.H. Khuroo, y D. Goswami. «Effect of zinc in animal models of anxiety, depression and psychosis.» *Human and experimental toxicology*, 2012: 1237-1243.
91. Zhou L, Zhu DY. «Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications.» *Nitric oxide*, 2009: 223-230
92. Blanco-Alvarez VM, Lopez-Moreno P, Soto-Rodriguez G, Martinez-Fong D, Rubio H, Gonzalez-Barrios JA, Piña-Leyva C, Torres-Soto M, Gomez-Villalobos Mde J, Hernandez-Baltazar D, Brambila E, Eguibar JR, Ugarte A, Cebada J, Leon-Chavez BA. «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
93. Yang, Yang, y otros. «High dose zinc supplementation induces hippocampal zinc deficiency and memory impairment with inhibition of BDNF signaling.» *PLOS ONE*, 2013: 1-10

94. Sensi, Stefano L., Pierre Paoletti, Jae-Young Koh, Elias Aizenman, Ashley I. Bush, y Michal Hershfinkel. «The neurophysiology and pathology of brain zinc.» *Journal of Neuroscience*, 2011: 1-20.

Apéndice

Técnica Cuantificación de proteínas por el método de Coomassie:

Reactivo de Coomassie

- Preparar 210 mL de solución de ácido perclórico del 70% al 3%
- Pesar 0.12 g de Coomassie blue G-250, disolver a agitación constante en la solución de ácido perclórico al 3%
- Filtrar la solución.
- Leer en el espectro a 465 nm utilizando como blanco un poco de solución de ácido perclórica al 3%, ajustando una absorbencia de 1.3 a 1.5 (agregando más solución de ácido perclórico al 3% o más de Coomassie blue G-250)
- El reactivo de Coomassie se debe mantener protegido de la luz, colocándolo en un frasco ámbar.

Para realizar las cuantificaciones se debe realizar una curva de calibración, se mide en el espectrofotómetro a 620nm

[] μM	Stock Albúmina μL	H ₂ O Destilada μL	Coomassie Blue G-250 μL
Blanco	0	500	500
1.0	1.0	499	500
2.5	2.5	497.5	500
5.0	5.0	495	500
10.0	10.0	490	500

*una vez que se ha agregado el reactivo de Coomassie la reacción es estable por 15 minutos, por lo que es recomendable que las muestras sean leídas lo más pronto posible.

Muestras:

- 498 μ L de agua destilada
- 2 μ L de muestra
- 500 μ L de reactivo de Coomassie

Técnica de Método de Griess:**Stock de nitritos****1. Solución 1mM de nitrito de sodio (NaNO_2)**

En un eppendorf pesar 0.069g de NaNO_2 diluirlos en 1mL de agua destilada, mezclar perfectamente.

2. Solución 1 μ M de nitrito de sodio (NaNO_2)

En un eppendorf colocar 999 μ L de agua destilada, con una micro pipeta medir 1 μ L de la solución 1mM de NaNO_2 y mezclar perfectamente.

Reactivo de Griess (Solución A + Solución B)**• Solución A**

Pesar 1.32g de sulfanilamida

Medir 60mL de ácido acético glacial

Medir 39mL de agua destilada

Mezclar perfectamente, almacenar en un frasco color ámbar y almacenar a 4°C.

Volumen final: 100mL

• Solución B

Pesar 0.1g de N-1-naftil-etilendiamina

Medir 100mL de agua destilada

Mezclar perfectamente, almacenar en un frasco color ámbar y almacenar a 4°C.

Volumen final: 100mL

*Las soluciones se mezclan en el momento en que se realizaran las determinaciones, evitando que el Reactivo de Griess entre en contacto con la luz.

*El reactivo de Griess se prepara en proporción 1:1 de solución A y de solución B.

Para realizar las cuantificaciones se debe realizar una curva de calibración, se mide en el espectrofotómetro a 540nm.

Curva de calibración

[] μM	Stock NaNO_2 μL	H_2O Destilada μL	Reac. Griess μL	H_2O Destilada μL
Blanco	0	100	100	800
1.0	1.0	99	100	800
2.5	2.5	97.5	100	800
5.0	5.0	95	100	800
10.0	10.0	90	100	800

*El blanco de la curva no debe dar coloración, de suceder esto cambiar el agua destilada o revisar que los tubos en los que se realizó la curva no se encuentren sucios.

Muestras:

- 100 μL de muestra
- 100 μL de Reactivo de Griess
- 800 μL de agua destilada

Técnica de Gerard Monnier:

Stock de 1,1,3,3-tetrametoxipropano

1. Solución 10 μM de 1,1,3,3-tetrametoxipropano

En un eppendorf disolver 1.65 μ L de 1,1,3,3-tetrametoxipropano en 1mL de agua destilada, mezclar perfectamente.

2. Solución 0.1 μ M de 1,1,3,3-tetrametoxipropano

En un tubo falcón diluir la solución 10 μ M de 1,1,3,3-tetrametoxipropano tomando 50 μ L y llevarlo a un volumen de 5mL, mezclar perfectamente.

Solución de N-metil-2-fenil-indol (Solución I)

- Pesar 38mg de N-metil-2-fenil-indol.
- Disolver el N-metil-2-fenil-indol en 18mL de acetonitrilo, mezclar perfectamente.
- Al momento de emplear la solución debe adicionarse 6mL de metanol, alcanzándose un volumen final de 24mL.

Para realizar las cuantificaciones se debe realizar una curva de calibración, se cierran los tubos con un poco de parafilm, incubar a 45°C durante una hora, en caso de que los tubos tengan mucho sobrenadante se centrifuga 15 minutos a 3000rpm y se mide en el espectrofotómetro a 586nm.

[] μ M	Solución I μ L	Stock de 1,1,3,3- tetrametoxipropano μ L	Ác. Metanosulfónico μ L	H ₂ O Destilada μ L
Blanco	650	0	150	200
0.5	650	5	150	195
1.0	650	10	150	190
2.5	650	25	150	175
5.0	650	50	150	150

Muestra:

- 650 μL de solución I
- 200 μL de muestra
- 150 μL de ác. Metanosulfónico

Técnica de Jonhson:

- **Stock de Zinc:** Disolver 1g de óxido de zinc en 1mL de agua desionizada, a partir de esta solución preparar varias diluciones hasta obtener una solución a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- **Guanidina 6M:** Disolver 6M de guanidina en 1L de TRIZMA BASE 0.2M, el cual contiene 0.15% de NaCN y 0.35% de ácido ascórbico.
- **4-(2-pyridylazo) resorcinol:** Disolver 1g de 4-(2-pyridylazo) resorcinol en un litro de agua desionizada. Proteger de la luz y mantener almacenado en refrigeración.
- **Hidrato de cloral:** Disolver 600g de hidrato de cloral en un litro de agua desionizada.

*Todos los reactivos se preparan con agua desionizada.

*Preparar la guanidina 6M en el mismo día de la determinación.

* Utilizar tubos que hayan sido desionizados.

Una vez que se colocaron todos los reactivos y se agitaron, se espera 5 min. Leyendo posteriormente la curva de calibración a 497nm en el espectrofotómetro. La cual se realiza de la siguiente manera:

[] μg	H ₂ O Desionizada μL	Stock de Zinc μL	Guanidina 6M μL	Pyridylazo resorcinol μL	Hidrato de cloral μL
Blanco	200.0	0	1000	100	50
0.5	199.5	0.5	1000	100	50
1.0	199.0	1.0	1000	100	50
2.5	197.5	2.5	1000	100	50
5.0	195.0	5.0	1000	100	50
10.0	190.0	10.0	1000	100	50

Muestra:

- 100 μL de agua desionizada
- 100 μL de muestra
- 1000 μL de guanidina 6M
- 100 μL de pyridylazo resorcinol
- 50 μL de hidrato de cloral