



Administración profiláctica crónica de zinc disminuye CCR1 y CCR8 después de un evento hipóxico-isquémico cerebral en rata

Wendy García Falfán¹, Constantino Tomas Sanchez¹, Omar Enrique Ahuatzin Flores¹, Víctor Manuel Blanco Alvarez¹, Daniel Martínez Fong², Maricela Torres y Soto¹, Juan Antonio González Barrios³ y Bertha Alicia León Chávez¹

¹ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ² Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN, ³ Hospital Regional 1o de Octubre, ISSSTE. bertha.leon@correo.buap.mx

RESUMEN

Introducción: La obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP) incrementa la respuesta inmunológica, liberando quimiocinas que quimioatrae leucocitos a través de sus receptores favoreciendo el daño celular. La administración subaguda de zinc disminuye el estrés nitrosativo y la muerte celular, mostrando tener un efecto protector. Sin embargo, no existe estudios a cerca del efecto de la administración crónica sobre los receptores de quimiocinas inflamatorias como son CCR1 y CCR8 que están involucrados en la quimioatracción de macrófagos al sitio de daño. En este trabajo se evaluó el efecto de la administración crónica de zinc previo a la OACP sobre la expresión de receptores de quimiocinas durante un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata. **Metodología:** A un grupo control de ratas macho Wistar fueron tratados con ZnCl₂ (0.5 mg/Kg cada 24 h durante 14 días), a otro grupo tratado con zinc se le realizó la OACP por 10 min., un tercer grupo se le administró el vehículo (SSI), y un último grupo se le realizó únicamente la OACP. Los cerebros se extrajeron a diferentes tiempos (0, 4, 11, 15 días de administración y 4, 8, 12, 24, 96 y 168 horas post-reperusión). Los niveles proteicos de los receptores fueron determinados por ELISA. Para evaluar el daño cerebral se realizó el estudio histopatológico por la tinción de hematoxilina-eosina. **Resultados:** Los resultados muestran que la administración crónica de zinc antes de la OACP disminuyó CCR1 y CCR8 sugiriendo un efecto anti-inflamatorio, que se ve reflejado en disminuir el daño cerebral. Nuestros resultados sugieren que la administración crónica de zinc disminuye la expresión de receptores de quimiocinas pro-inflamatorias después de un proceso hipóxico-isquémico. Estos resultados sugieren que la administración crónica de zinc puede ser una estrategia terapéutica para eventos cerebrovasculares, sin embargo, se debe realizar más estudios para asegurar el efecto protector del zinc

INTRODUCCIÓN

La enfermedad cerebrovascular (ECV) es la principal causa de muerte y discapacidad en todo el mundo. El tipo más común de ECV es el isquémico (70% en Japón)[1]. El infarto cerebral es la muerte del tejido cerebral causada por la isquemia. En la isquemia cerebral severa el tejido se ve privado de oxígeno, glucosa, lípidos y nutrientes causando inflamación, lo cual produce la muerte celular acompañado de la disrupción de la barrera hematoencefálica, la infiltración de leucocitos;



que promueven la inflamación cerebral mediante la producción exacerbada de mediadores inflamatorios (citocinas, quimiocinas)[2].

Las quimiocinas son proteínas quimioatrayentes pertenecientes a la superfamilia de las citocinas, de bajo peso molecular (8-14 kDa), que regulan el tráfico leucocitario, modulando la quimiotaxis y la activación celular por lo que desempeñan un papel importante en los procesos de inflamación del SNC, en la comunicación celular y en el reclutamiento de células inflamatorias. Ahora bien evidencia reciente sugiere que los receptores de quimiocinas se expresan en el sistema nervioso central y que sus funciones se extienden más allá de los procesos inflamatorios [3].

Los receptores de quimiocinas pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G y están formados por una única cadena polipeptídica de unos 350 aminoácidos. Al atravesar siete veces la membrana plasmática, tanto el extremo amino terminal como tres de los bucles que unen los dominios transmembrana quedan expuestos hacia el exterior de la célula, participando en la unión del ligando, mientras que el extremo carboxilo terminal y otros tres bucles se orientan hacia el interior de la célula y participan principalmente en la transmisión de la señal intracelular [4].

Proteína Inflamatoria de Macrófagos- 1 α (MIP-1 α) o también llamada CCL3 es un mediador activo en la inflamación lleva a cabo su función pro inflamatoria a través de la unión al receptor transmembrana de quimiocinas CC selectivos (CCR1) en la superficie de células inflamatorias. En el cerebro de rata neonatal, la hipoxia aguda determina un aumento en las concentraciones tisulares de CCL3. El proceso de una regulación positiva (Up regulation) de CCL3 se ha demostrado que se asocia con la quimioatracción de monocitos y la acumulación microglial en el cerebro lesionado. En modelos de isquemia cerebral en ratas adultas, se ha confirmado la regulación positiva de CCL3 después del daño [5].

Proteína Inflamatoria de Macrófagos- 1 β (MIP-1 β) o también llamada CCL4 lleva a cabo su función mediante la unión selectiva al receptor transmembranal CCR8. Su actividad ha sido relacionada en la inducción de reclutamiento de monocitos al sitio de daño. Estudios indican que CCL4 podría estar involucrada en el reclutamiento de monocitos dentro de las placas del ateroma, siendo las placas ateromatosas una de las posibles causas de accidentes cerebrovasculares por obstrucción [5].

La inflamación post-isquémica promueve la inflamación cerebral (edema cerebral) que conduce a la compresión del cerebro normal envolvente de tejido en el núcleo isquémico; este efecto indeseable del proceso post-isquémico y la inflamación cerebral deben ser suprimidos para que con esto disminuya las consecuencias incapacitantes de estos procesos[6].

En el sistema nervioso central el zinc solo es superado por el hierro y su prevalencia es un reflejo de sus funciones generalizadas. La homeostasis del zinc unido a proteínas y libre es fundamental para la función normal del sistema nervioso central además de proporcionar estabilidad estructural a una variedad de factores de transcripción y con esto regulando la expresión génica. Recientemente se descubrió que la neurogénesis adulta en el cerebro depende de zinc, un hallazgo que tiene amplias repercusiones en la función del hipocampo y en la restauración del sistema dañado [7].

En contraste con la intervención terapéutica basada en la quelación, ha demostrado beneficios neuroprotectores después de la administración de zinc; por ejemplo Matsushita y sus colaboradores demostraron que la administración de zinc proporcionan neuroprotección a la zona CA1 del hipocampo durante la isquemia global en el jerbillo. Debido a que el jerbillo posee hemisferios cerebrales aislados y un círculo de Willis incompleto, la oclusión bilateral de las arterias (BCCAO) resultó en una pronunciada isquemia global. Encontraron que la administración profiláctica superaguda de ZnCl₂ (de 1 hora antes de la BCCAO) no mostró protección, mientras



que la administración profiláctica subaguda (24 horas antes de la BCCAO) sí proporcionó neuroprotección significativa a las células de la zona CA1 del hipocampo contra la muerte neuronal [8].

METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (180 -200g de peso corporal) a las cuales se administró de ZnCl₂ de forma crónica (0.5mg/kg de peso corporal v.i.p.) cada 24h durante 14 días. Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral v.i.p. (350mg/kg de peso corporal), se disectó la arteria carótida primitiva izquierda y se presionó con el fin de obstruir el flujo sanguíneo (obliteración) durante 10 minutos con ayuda de una pinza de presión para vasos sanguíneos de tipo bulldog (clamp arterial). Al término del tiempo de obliteración, se retiró la pinza y se verificó visualmente la restauración del flujo sanguíneo en la arteria (reperusión). Posteriormente, la herida se suturo y las ratas se mantuvieron bajo una fuente de calor hasta recuperarse del efecto anestésico. Los animales fueron sacrificados en el tiempo post-reperusión correspondiente, por dislocación cervical, para poder obtener la región temporo-parietal de la corteza cerebral y el hipocampo. El tejido se mantuvo a -80°C hasta su uso (Thermoforma -86°C ultra freezer). Los tejidos fueron homogenizados con PBS 1X y posteriormente, se utilizaron los homogenizados de las muestras para la evaluación bioquímica (ELISA) mencionada a continuación.

ELISA (Inmunoensayo Enzimático)

Cinco µg del homogenizado de los tejidos obtenidos se completan a un volumen final de 100 µL con buffer de carbonatos para sensibilizar las placas de ELISA, y se colocan en cada pozo de la placa durante 16 horas a 4° C. Posteriormente, los pozos se lavaron con PBS-Tween 0.1%; los sitios inespecíficos se bloquearon con albúmina de suero bovino 0.5% durante 20 min. Inmediatamente se lava con PBS-Tween 0.1%, y se adiciona el primer anticuerpo para cada quimiocina durante dos horas a temperatura ambiente. Se lavaron y se adiciona el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano, se lava con PBS-Tween y se le agrega el sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilencil-tiazolina-6-sulfónico). Finalmente la placa se leyó en un lector de ELISA (Bio-Rad Benchmark) a 415 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de los grupos experimentales de los niveles proteicos de CCR1 muestran varios incrementos; en la fase temprana, de 141 ± 18% a las 4 horas después de la OACP, 115% ± 10% a las 8 h y de 127% ± 20% a las 96 h, incrementos que se previenen con la administración crónica de zinc, manteniéndose en los niveles basales de este receptor en todo el curso temporal (Figura 1). Estos resultados sugieren que el zinc previene la migración de macrófagos-microglía y linfocitos T como se había observado en otros modelos [9,10], así como en neuronas de pacientes con Alzheimer [11]; sin embargo, la deficiencia de esta quimiocina incrementa la expresión de moléculas de adhesión e invasión de células inflamatorias periféricas después de un daño traumático. Además, CCR1 también puede ser receptor de CCL5 [12], la cual ha sido asociada a los procesos inflamatorios crónicos durante un proceso isquémico [13], lo cual explicaría que el receptor esté actuando a través de CCL5 y no de CCL3. La acción de este receptor es observado en las células vasculares, mientras que CCR3 y CCR5 (receptores para CCL5) en neuronas y astrocitos que mostró un efecto protector [14], apoyando el papel protector de zinc sobre el proceso inflamatorio causado por la isquemia.

La expresión proteica de CCR8 se ve reducida con la administración de zinc previo a la isquemia desde las 12 h en un 52 ± 14% hasta las 168 h en un 51 ± 7% comparado con el control sin tratamiento (Figura 2). la administración crónica de zinc causó una disminución de la expresión de la proteína del receptor CCR8 inducido por la OACP, estos resultados sugieren que el zinc



disminuyó la quimioatracción de células que expresan este receptor como células T, NK, TH2, macrófagos y eosinófilos que son reclutados durante la isquemia y otros modelos [15]. Sin embargo, CCR8 ha sido localizado en interneuronas del hipocampo y en astrocitos reactivos en un modelo de epilepsia [16]. La función neurológica de este receptor es poco conocida pero se sabe que su regulación positiva puede debilitar el mecanismo neuroprotector de CCR7, CCR9 y CCR10, debido a que ha sido localizado en las interneuronas y en astrocitos reactivos aumentando la liberación presináptica de glutamato, lo que lleva a la sobre-excitación y el retraso en la pérdida de las neuronas del hipocampo [16]. Estos resultados sugieren que el zinc disminuye el reclutamiento de células inmunológicas y la reactividad de los astrocitos, generando un efecto protector durante la isquemia cerebral.

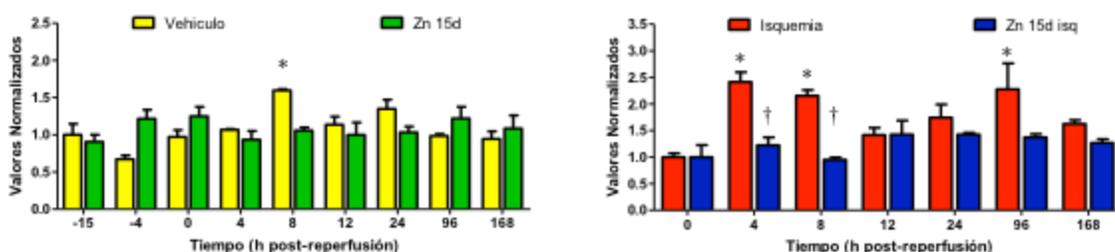


Figura 1. Efecto de la administración crónica de Zinc sobre los niveles proteicos del receptor CCR1 durante un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.. Los valores representan la media \pm SEM de 3 ratas. *P < 0.05, ANOVA con pos hoc Dunnet cuando se compara con el grupo sin tratamiento alguno, † P < 0.05, t de Student cuando se compara entre el grupo experimental contra el grupo vehículo.

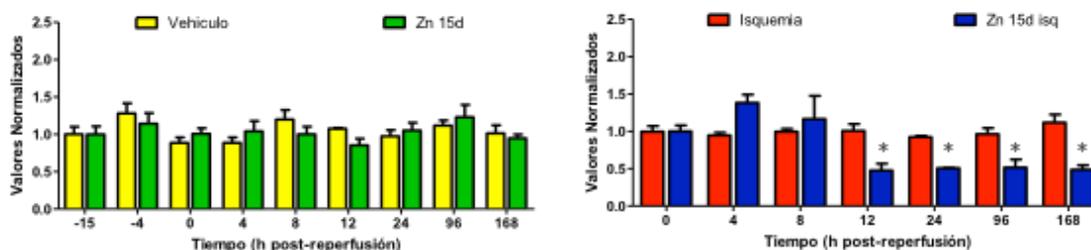


Figura 2. Efecto de la administración crónica de Zinc sobre los niveles proteicos del receptor CCR8 durante un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.. Los valores representan la media \pm SEM de 3 ratas. *P < 0.05, ANOVA con pos hoc Dunnet cuando se compara con el grupo sin tratamiento alguno, † P < 0.05, t de Student cuando se compara entre el grupo experimental contra el grupo vehículo.

CONCLUSIONES

La administración crónica profiláctica de zinc previene la inflamación causada por la obliteración de la arteria carótida primitiva en rata



BIBLIOGRAFIA

1. Perry VH. « A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation». *J Neuroimmunol* 1998; 90: 113-21.
2. Morancho A, Rosell A, Garcia L and Montaner J. «Metalloproteinase and stroke infarct size:role for anti-inflammatory treatment». *Ann N.Y.Acad.Sci.*2010:123-133.
3. Cowell RM,Silverstein FS. «Developmental changes in the expression of chemokine receptor CCR1 in the rat cerebellum». 2003.
4. Pello O.M, Rodriguez J.M, et al. «Modulacion del trafico leucocitario : papel de las quimiocinas y de los opioides».2006;3-5.
5. Mirabelli M, Braunersreuther V, Luciano G, Dallegri F, Quercioli A, Veneselli E, Mach F and Montecucco F. «CC and CXC chemokines are pivotal mediators of cerebral injury in ischemic stroke». 2011: 409-414.
6. Takano T, Oberheim N, Cotrina M and Nedergaard M. «Astrocytes and ischemic injury ». *Stroke.* 2009:8-12.
7. Shannon D. et al. «Zinc in the central nervous system: from molecules to behavior».2012; 2-5.
8. L.Galasso S, H.Dyck R.«The Role of Zinc in Cerebral Ischemia».2007;5-7.
9. Sherry, B., Schmidtmayerova, H., Zybarth, G., Dubrovsky, L., Raabe, T., & Bukrinsky, M. (2000). Nitric oxide regulates MIP-1alpha expression in primary macrophages and T lymphocytes: implications
10. Koch, A. E., Kunkel, S. L., Harlow, L. A., Mazarakis, D. D., Haines, G. K., Burdick, M. D., . . . Strieter, R. M. (1994). Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 93(3), 921-928. doi: 10.1172/JCI117097
11. Halks-Miller, M., Schroeder, M. L., Haroutunian, V., Moening, U., Rossi, M., Achim, C., . . . Horuk, R. (2003). CCR1 is an early and specific marker of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 54(5), 638-646. doi: 10.1002/ana.10733
12. Andjelkovic, A. V., Spencer, D. D., & Pachter, J. S. (1999). Visualization of chemokine binding sites on human brain microvessels. *J Cell Biol*, 145(2), 403-412.
13. Furuichi, K., Gao, J. L., Horuk, R., Wada, T., Kaneko, S., & Murphy, P. M. (2008). Chemokine receptor CCR1 regulates inflammatory cell infiltration after renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol*, 181(12), 8670-8676.
14. Tokami, H., Ago, T., Sugimori, H., Kuroda, J., Awano, H., Suzuki, K., . . . Investigators, R. (2013). RANTES has a potential to play a neuroprotective role in an autocrine/paracrine manner after ischemic stroke. *Brain Res*, 1517, 122-132. doi: 10.1016/j.brainres.2013.04.022
15. Bielecki, B., Mazurek, A., Wolinski, P., & Glabinski, A. (2007). Expression of chemokine receptors CCR7 and CCR8 in the CNS during ChREAE. *Scand J Immunol*, 66(4), 383-392. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.01954.x
16. Liu, J. X., Cao, X., Tang, Y. C., Liu, Y., & Tang, F. R. (2007). CCR7, CCR8, CCR9 and CCR10 in the mouse hippocampal CA1 area and the dentate gyrus during and after pilocarpine-induced status epilepticus. *J Neurochem*, 100(4), 1072-1088. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04272.x