



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

Amayrani 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 Chávez¹

¹ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ² Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN, ³ Hospital Regional 1o de Octubre, ISSSTE.

Resumen

1. Introducción: Existe una diversidad de métodos experimentales, la evaluación de aprendizaje en los animales y habilidades de la memoria son los dispositivos más utilizados en su mayoría hoy en día para probar la memoria en los roedores como lo son en general los laberintos. Se ha asociado un papel importante al zinc en procesos de aprendizaje y memoria, de acuerdo a la concentración que este se encuentre. **2. Metodología:** Se realizaron las determinaciones bioquímicas de nitritos, MDA y 4-HDA, como indicadores de daño celular y estrés nitrosativo en la corteza cerebral. **3. Resultados:** Muestran mejora en el entrenamiento en el LAM y una disminución en los marcadores de daño. **4. Conclusión:** La administración crónica de zinc ha demostrado un papel protector.

Introducción

El laberinto acuático fue diseñado por R.G. Morris para evaluar la memoria espacial en ratas [1], después de un daño o para evaluar la acción de algún fármaco que afecte el hipocampo o alguna otra área relacionada con el aprendizaje y la memoria. La acumulación de zinc intracelular en neuronas vulnerables en las células piramidales del cornu ammonis 1 (CA1) del hipocampo precede la degeneración durante un corto periodo de isquemia [2,3]. Por otro lado, hay evidencia que sugiere que la suplementación con zinc provee neuroprotección a la región de CA1 hipocampal durante la isquemia global en el gerbillo [3,4].

El zinc es uno de los metales más importantes del organismo después del hierro, es esencial como catalizador, ion estructural y regulador en la homeostasis, la respuesta inmunológica, estrés oxidativo, apoptosis y proliferación. El zinc se encuentra en una gran cantidad de enzimas y proteínas, esto debido a que sólo tiene valencia de +2, no puede sufrir procesos de reducción, que afecten o cambien la funcionalidad de dichas proteínas o enzimas.

El zinc es asociado con diversas funciones cerebrales como son la síntesis de DNA y proteínas en periodos críticos del desarrollo cerebral, función de neurotransmisor, factor transportador de crecimiento/hormona y uniéndose a receptores [4]. En cuanto al desarrollo neurológico, el zinc está



involucrado en el aprendizaje y la memoria, se sugiere que los receptores a glutamato en el SNC pueden estar involucrados [5].

El zinc juega un papel importante en etapas tempranas (desarrollo embrionario) y en etapas tardías (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 [6].

La potenciación a largo plazo (LTP) juega un papel crucial para que se genere el aprendizaje y con esto se asegure la memoria en el sujeto, el cual es un mecanismo de retención de información a largo plazo y de neurogénesis hipocampal, el cual es un mecanismo que involucra aspectos específicos dinámicos y flexibles del aprendizaje [7,8].

El hipocampo es el centro de control del aprendizaje y la memoria, en enfermedades como la isquemia cerebral se provoca daño a la estructura hipocampal, lo cual se ve reflejado en un déficit cognitivo. Esto es debido al daño generado por la liberación masiva de Zn, que desencadena la activación de la protein cinasa C (PKC), resultando en la inducción y activación de la NADPH-oxidasa y la sintasa del óxido nítrico, en la generación de anión superóxido, óxido nítrico y peroxinitrito [9], las cuales causan daño y sí se generan en exceso provocan muerte neuronal en la zona afectada. Sin embargo, existen pocos estudios a cerca de la suplementación en niñas y el aprendizaje y memoria espacial, por tal motivo en este trabajo se estudió el efecto de varias concentraciones de zinc sobre el aprendizaje y memorial espacial evaluado por el laberinto acuático de Morris

Metodología

* Animales: Se emplearon ratas hembra de la cepa Wistar con peso de g, provenientes del bioterio del CINVESTAV, mantenidas bajo condiciones controladas, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y temperatura de 22°C, con acceso de agua y alimento ad libitum.

* Administración de ZnCl₂: La administración de cloruro de zinc (ZnCl₂) se realizara durante 14 días cada 24 horas a una dosis de 2.5mg/kg de peso de la rata, por vía intraperitoneal, siguiendo las normas del uso y manejo de animales de experimentación.

* Laberinto acuático de Morris (LAM): El laberinto acuático de Morris consta de una tina circular (piscina de nado) de un diámetro que va entre los 120-200cm y una altura de 56-75cm, la plataforma de escape mide 10 cm de diámetro. La tina se llena con agua (19-22°C), tomando como referencia la plataforma, un cm arriba de esta, el agua se opaca con dióxido de titanio, como una forma de asegurar que las ratas no encuentren 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 [8].

Se realizarán 4 ensayos por día, uno en cada cuadrante teniendo 60 segundos (s) para encontrar la plataforma (tiempo de latencia), una vez que la haya encontrado y se ubique en ella, se le deja sobre la plataforma 30 s, se retira de la plataforma se esperan 30 segundos e inicia el ensayo en el siguiente cuadrante, siguiendo el orden de N, O, S y E durante 5 días consecutivos. Para evaluar la



memoria, 7 días después del último ensayo de aprendizaje, se realizará un solo ensayo desde el cuadrante más lejano a la posición de la plataforma, durante 60 s y se contará el número de veces

que la rata pase por el sitio donde se encuentra la plataforma, así como el segundo en el que lo realizó. [8].

* Cuantificación de proteínas totales: 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 serán cuantificadas por el método de Sedmak y Grossberg [10]. Las proteínas se cuantificarán en $1\mu\text{L}$ del sobrenadante contenido en $499\mu\text{L}$ de agua y $500\mu\text{L}$ del reactivo de color (azul de Coomassie 0.06). El producto de reacción será leído en un espectrofotómetro (BioradSmartspect 3000) a 620 nm. La concentración de proteínas será determinada interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva estándar de albúmina de suero bovino ($1-10\mu\text{g}$), la cual será determinada paralelamente en cada ensayo.

* Cuantificación de nitritos por el Método de Griess: 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 será estimada a través del contenido del ion nitrito (NO_2^-) en los sobrenadantes de cerebro utilizando el método de Griess [11,12]. El reactivo de Griess se compone de volúmenes iguales de dihidrocloruro de n-1naftiletilendiamino al 0.1% disuelto en agua destilada y sulfanilamida al 1.32% disuelta en ácido acético glacial al 60%. La reacción será leída en un espectrofotómetro (BioradSmartSpect 3000) a 540 nm. La concentración de (NO_2^-) se determinará interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de NaNO_2 (0.5 a $10\mu\text{M}$), la cual se determinará paralelamente en cada ensayo.

* Cuantificación de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4-HDA): Los niveles de MDA y 4-HDA serán cuantificados por el método de Gerard-Monnier [13]. 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 tomarán $100\mu\text{L}$ del sobrenadante del cerebro, se le adicionarán $650\mu\text{L}$ de la solución 1 (compuesta de N-metil-2-fenilindol a una concentración de 10.3M en acetonitrilo y metanol), $100\mu\text{L}$ de agua destilada, $150\mu\text{L}$ 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 el sobrenadante se leyó 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 $5\mu\text{M}$), la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo.

Resultados

Los resultados muestran que la administración crónica de zinc a diferentes concentraciones no modificó el aprendizaje en las ratas infantiles (Figura 1). Sin embargo, se observa un decremento del tiempo de latencia para llegar a la plataforma de $77 \pm 6\%$ en la concentración de 1.0 mg/kg en la memoria (Figura 1), sugiriendo que el zinc mejoró el proceso consolidación de la memoria.

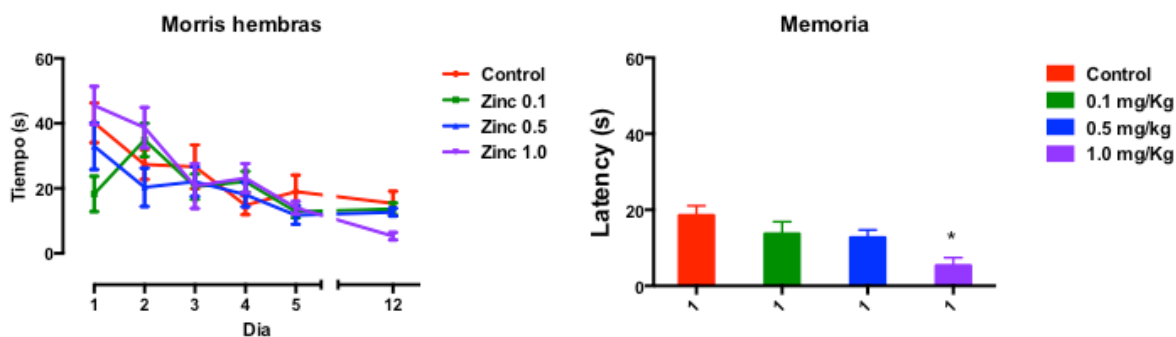


Figura 1. Efecto de la administración crónica de zinc sobre aprendizaje y memoria en ratas SD hembras infantiles. Las ratas fueron sometidas a aprendizaje en el laberinto acuático de Morris durante 5 días, con 4 eventos cada día (Días del 1 a 5). A los 7 días posteriores del último día de aprendizaje se evaluó la memoria (Día 12). Los valores son la media \pm SEM de 10 animales.* $P < 0.05$, t de Student.

La administración crónica de zinc causó un incremento de los niveles de óxido nítrico en ratas SD hembras infantiles, desde la concentración mínima, siendo la más alta, disminuyendo a la mayor concentración, cuando se compara con el grupo control (Figura 2). Por otro lado, no se observó que incrementa la lipoperoxidación a ninguna concentración (Figura 2).

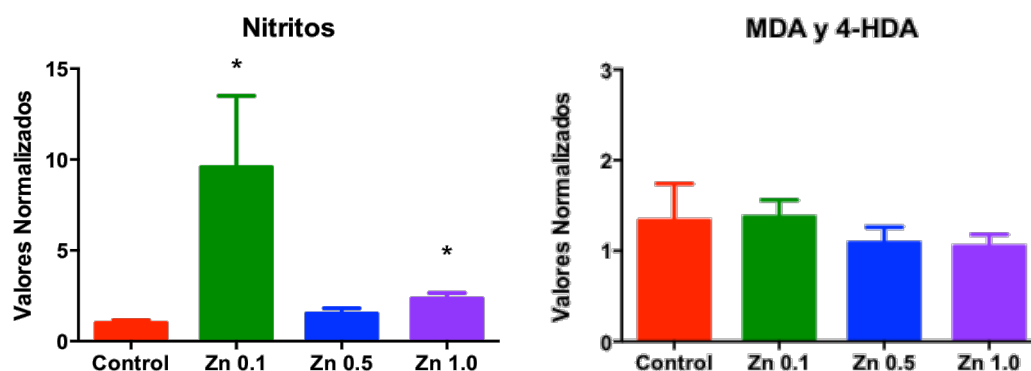


Figura 2. Efecto de la administración crónica de zinc sobre los niveles de óxido nítrico y lipoperoxidación en ratas SD hembras infantiles. Las ratas fueron sometidas a aprendizaje y memoria en el laberinto acuático de Morris. Los cerebros fueron extraídos después de evaluación de la memoria (Día 12). Los valores son la media \pm SEM de 10 animales.* $P < 0.05$, t de Student.



Estudios realizados en ratas adultas después de una suplementación de zinc disminuyó el tiempo de latencia para llegar a la plataforma e incrementó la actividad de SOD y NOS, y niveles de NO en el hipocampo [14], sugiriendo que el NO participa en el proceso de adquisición y consolidación de la memoria sin causar daño alguno.

Conclusión

La administración crónica de zinc ha demostrado un papel protector disminuyendo los niveles de nitritos y manteniendo los niveles de lipoperoxidación, así como preservando la memoria en el grupo que recibió la dosis más alta en ratas SD hembras infantiles, siendo mayor la concentración de zinc tolerable en ratas hembras que en ratas machos encontrados en otro trabajo.

Bibliografía:

1. Morris, Richard. «Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat.» *Journal of Neuroscience Methods*, 1984: 47-60.
2. Koh, JY, SW Suh, BJ Gwaq, YY He, CY Hsu, y DW Choi. «The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia.» *Science*, 1996: 1013-1016.
3. Galasso, Sherri L., y Richard H Dyck. «The role of zinc in cerebral ischemia .» *Molecular Medicine*, 2007: 380-387.
4. Matsushita, K., y otros. «Effect of systemic zinc administration on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus.» *Brain Res*, 1996: 362-365.
5. 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.
6. Levenson, Cathy W. «Regulation of the NMDA receptor: Implications for neuropsychological development.» *NutritionReviews*, 2006: 428-432.
7. Levenson, Cathy W., y Deborah Morris. «Zinc and Neurogenesis: Making New Neurons from Development to Adulthood.» *American SocietyforNutrition*, 2011: 96-100.
8. Paul CM, Magda G, Abel S. «Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents.» *Behavioural brain research*, 2009: 151-164
9. Shuttleworth, C. William, y John H. Weiss. «Zinc: new clues to diverse roles in brain ischemia.» *Trends Pharmacol Sci*, 2011: 480-486.
10. 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.
11. J. P. Griess, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1879, 12, 426.
12. 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.
13. 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.
14. Fan G1, 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. *Ann Occup Hyg.* 2009 Jun;53(4):341-51. doi: 10.1093/annhyg/mep019. Epub 2009 Apr 8.