



## INCREMENTO DE LA LIPOPEROXIDACIÓN Y AFECTÓ LA MEMORIA EN RATA MACHO INFANTIL DESPUES DE UNA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE ZINC

Salma Trinidad Ruiz Pastrana<sup>a</sup>, José Antonio Benavides Paredes<sup>a</sup>, Víctor Manuel Blanco-Álvarez<sup>a</sup>, Daniel Martínez Fong<sup>b</sup>, Daniel I. Limón<sup>a</sup>, Eduardo Brambila<sup>a</sup>, Bertha Alicia León Chávez<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Pue., hope\_rock9@hotmail.com, ilhlimon@yahoo.com, eduardobrambila1@yahoo.com.mx, alileonch@gmail.com,

<sup>b</sup>Dept Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN, martinez.fong@gmail.com,

### RESUMEN

**Introducción:** Estudios previos mostraron que la administración de zinc de forma subaguda en ratas adultas protege del daño cerebral. Sin embargo, el zinc puede ser tóxico cuando no se administra en concentraciones óptimas. En este trabajo se evaluó el efecto de zinc sobre el estrés nitrosativo y aspectos cognitivos en ratas infantiles. **Metodología:** Ratas Sprague-Dawley de 1 mes de edad fueron tratadas con ZnCl<sub>2</sub>; 0, 0.1 y 0.5 mg/kg, v.i.p por 14 días. En el día 15 fueron sometidas al laberinto acuático de Morris durante 5 días, y después de 7 días se evaluó la memoria. El cerebro fue disectado en 4 regiones cerebrales (corteza cerebral, cerebelo, tallo cerebral y núcleos subcorticales). En el sobrenadante se determinó los niveles de óxido nítrico por el método de Griess y malonildialdehído y 4-hidroxi-alquenos por el método de Gerard-Monnier. **Parte experimental:** Los resultados muestran que los niveles de nitritos no variaron en ninguna dosis utilizada en todas las regiones estudiadas. Sin embargo, la lipoperoxidación incrementó en la dosis de 0.5 mg/kg, siendo para corteza cerebral de 2066 ± 585.8%, para cerebelo de 1032% ± 28.3%, para núcleos subcorticales de 928 ± 37.6% y para tallo cerebral de 1256% ± 541.7%. La concentración de 0.5 mg/kg causó un incremento de la latencia al encontrar la plataforma en la evaluación de la memoria de largo plazo. La dosis óptima de un infante es de 8 mg/día (aproximadamente de 0.25 mg/kg), la dosis de 0.1 mg/kg se encuentra por debajo de lo requerido no causó daño y mejoró la memoria, mientras que la dosis de 0.5 mg/kg causó lipoperoxidación y falla en la memoria de largo plazo, siendo la dosis reportada tolerable de 0.71 mg/kg. **Conclusión:** La administración crónica de zinc en concentraciones tolerables causó daño celular y pérdida de las funciones cognitivas.

### 1. INTRODUCCIÓN

Estudios se han llevado a cabo para mejorar el rendimiento escolar en niños, entre ellos se ha visto que la deficiencia de zinc causa una disminución de aprendizaje y memoria, y que la administración de zinc la mejora. Sin embargo, el zinc puede causar daño celular, a través de la formación de radicales libres o especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, como el peroxinitrito formado por la reacción del anión superóxido con el óxido nítrico, produciendo lipoperoxidación de membranas y daño tanto en proteínas como en el DNA.

En la actualidad se han realizado estudios para mejorar el desempeño académico en niños, donde han encontrado que la administración de zinc mejora el aprendizaje y memoria, sin embargo, el zinc puede causar daño por estrés nitrosativo si no se administra a una concentración adecuada. Por esto en este trabajo se busca en ratas infantiles la concentración idónea de la administración crónica de zinc que mejore el aprendizaje y la memoria, sin causar daño por estrés nitrosativo. Este estrés es producido por un incremento del óxido nítrico y del anión superóxido, formando peroxinitrito capaz de nitrar proteínas y causar daño en las membranas de la célula.

El zinc es un elemento esencial para el crecimiento y el desarrollo, se encuentra en cantidades relativamente importantes en el músculo, donde llega a constituir del 50-60% de



todo el zinc corporal. El zinc también se encuentra en la próstata, la retina y el pelo, y en niveles relativamente elevados en el tejido óseo y en el sistema nervioso central (concretamente en las proximidades del hipocampo). 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 sea 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 de 2 a 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 está situado entre los 12 y 15 mg/día para mujeres y hombres, respectivamente, elevándose en el caso de mujeres embarazadas o lactantes a 20-25 mg/día [1].

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 [2] y uniéndose a receptores como son NMDA y GABAérgicos [3]. 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 [4].

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 hipocampo, región del cerebro que participa en el aprendizaje y la memoria [5].

En este trabajo se evaluó si la administración crónica de zinc en ratas infantiles machos mejoraba el aprendizaje y la memoria previniendo el estrés nitrosativo.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### Metodología

#### Animales

Se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 90-100 g, 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*.

- **Administración de ZnCl<sub>2</sub>**

La administración de cloruro de zinc (ZnCl<sub>2</sub>) se realizó durante 14 días cada 24 horas a una dosis de 0, 0.1, 0.5 1.0 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal.

- **Laberinto acuático de Morris (Water Maze) [6]**

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 56-75cm, 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 esperaban 30 segundos para iniciar el ensayo en el siguiente cuadrante, siguiendo el orden de N, O, S y E durante 5 días consecutivos. 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.

- **Cuantificación de proteínas totales [7]**



El anión del colorante Coomassie reacciona electrostáticamente con el grupo  $\text{NH}_3^+$  de las proteínas, la unión del anión a la proteína causa un cambio en la absorción del colorante de 465-620 nm. Las proteínas totales fueron cuantificadas por el método de Sedmak y Grossberg [14]. Las proteínas se cuantificaron en 2  $\mu\text{L}$  del sobrenadante contenido en 498  $\mu\text{L}$  de agua y 500  $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{g}$ ), la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo.

- **Cuantificación de nitritos por el Método de Griess**

Este método realizado como lo reporta [8] 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 ( $\text{NO}_2^-$ ) en los sobrenadantes de cerebro utilizando el método de Griess. El reactivo de Griess se compone de volúmenes iguales de dihidrocloruro de n-1naftiletilendiamino 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 540nm. La concentración de ( $\text{NO}_2^-$ ) se determinó interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de  $\text{NaNO}_2$  (0.5 a 10 $\mu\text{M}$ ), la cual se determinó paralelamente en cada ensayo.

- **Cuantificación de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4-HDA) [9]**

Los niveles de MDA y 4-HDA fueron cuantificados 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 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante del cerebro, se le adicionaron 650  $\mu\text{L}$  de la solución 1 (compuesta de N-metil-2-fenilindol a una concentración de 10.3Mm 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 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  $\mu\text{M}$ ), la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo.

### 3. RESULTADOS

Los resultados muestran que los niveles de nitritos no variaron en ninguna dosis utilizada en todas las regiones estudiadas (Fig. 1). Sin embargo, la lipoperoxidación incrementó en la dosis de 0.5 mg/kg, siendo para corteza cerebral de 2066  $\pm$  585.8%, para cerebelo de 1032%  $\pm$  28.3%, para núcleos subcorticales de 928  $\pm$  37.6% y para tallo cerebral de 1256%  $\pm$  541.7% (Fig.1).

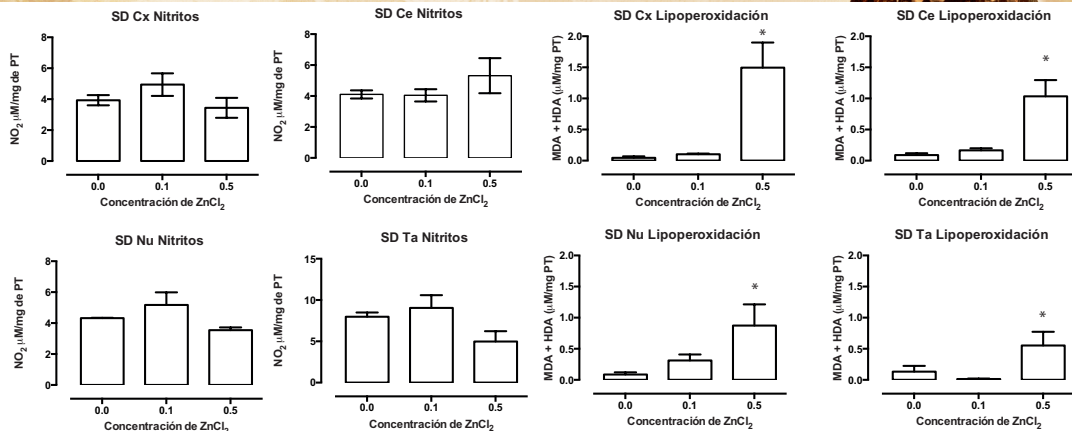


Fig. 1. Efecto de la administración crónica de zinc sobre el estrés nitrosativo en ratas macho Sprague-Dawley (SD). Los nitritos fueron determinados por el método de Griess y la lipoperoxidación (MDA+HDA) por medio del método de Gerard-Monnier. Los valores son la media  $\pm$  SEM de  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$ , t de Student.

La concentración de 0.5 mg/kg causó un incremento de la latencia al encontrar la plataforma en la evaluación de la memoria de largo plazo. La dosis óptima de un infante es de 8 mg/día (aproximadamente de 0.25 mg/kg), la dosis de 0.1 mg/kg se encuentra por debajo de lo requerido no causó daño y mejoró la memoria, mientras que la dosis de 0.5 mg/kg causó lipoperoxidación y falla en la memoria de largo plazo, siendo la dosis reportada tolerable de 0.71 mg/kg (Fig. 2).

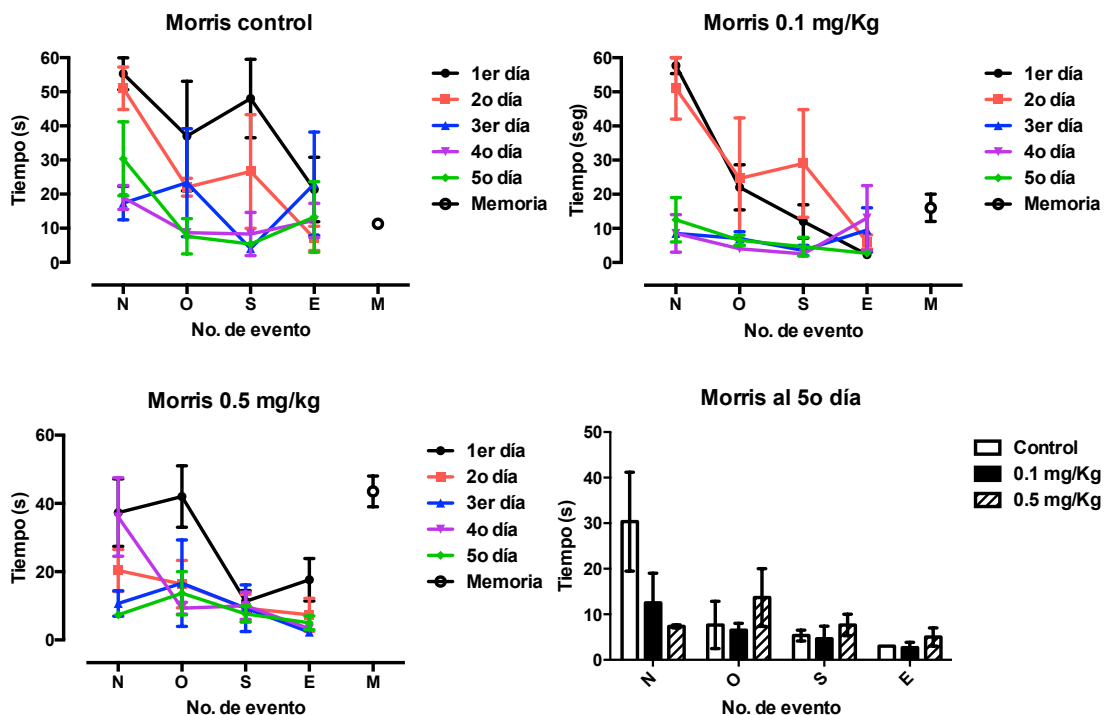


Fig. 2. Efecto de la administración crónica de zinc sobre el aprendizaje y memoria en ratas macho Sprague-Dawley (SD). El aprendizaje se realizó sometiendo a los animales al Laberinto acuático de Morris durante 5 días con 4 eventos. La memoria fue analizada 7 días después del último día de aprendizaje.

Estos resultados muestran la administración de 0.1 mg/kg en ratas infantiles durante 14 días mostró efectos positivos sobre el aprendizaje desde el tercer día, sin embargo a una concentración de 0.5 mg/kg causó una pérdida de la memoria y un incremento del estrés





nitrosativo. Estos resultados muestran que el efecto benéfico del zinc depende de la concentración y el tiempo de administración. El zinc ha tenido efectos en disminuir la diarrea y mejorar el peso en niños [10]. Además, la suplementación de zinc, vitamina A y yodo tuvieron un efecto benéfico sobre la memoria a corto plazo [11]. Además, la suplementación ha mostrado mejorar el desarrollo motor e incrementar la actividad funcional en infantes [12].

#### 4. CONCLUSIONES

La administración crónica de zinc en concentraciones tolerables (0.5 mg/kg) causó daño celular y pérdida de las funciones cognitivas, la concentración óptima de zinc fue de 0.1 mg/kg favoreciendo el aprendizaje y la memoria sin causar estrés nitrosativo.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Bodes, J. I. R., & López, M. P. (2011). La actividad física y el zinc: una revisión. *Archivos de medicina del deporte: revista de la Federación Española de Medicina del Deporte y de la Confederación Iberoamericana de Medicina del Deporte*, (141), 36-44.
2. Yamasaki, S., Sakata-Sogawa, K., Hasegawa, A., Suzuki, T., Kabu, K., Sato, E., ... & Hirano, T. (2007). Zinc is a novel intracellular second messenger. *The Journal of cell biology*, 177(4), 637-645.
3. Matsushita, K., Kitagawa, K., Matsuyama, T., Ohtsuki, T., Taguchi, A., Mandai, K., ... & Matsumoto, M. (1996). Effect of systemic zinc administration on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. *Brain research*, 743(1), 362-365.
4. Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 11(1), 47-60.
5. Levenson, C. W., & Morris, D. (2011). Zinc and neurogenesis: making new neurons from development to adulthood. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 2(2), 96-100
6. Sedmak, J. J., & Grossberg, S. E. (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical biochemistry*, 79(1), 544-552.
7. Blanco-Alvarez, V. M., Lopez-Moreno, P., Soto-Rodriguez, G., Martinez-Fong, D., Rubio, H., Gonzalez-Barrios, J. A., ... & Leon-Chavez, B. A. (2013). 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
8. Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J. C., & Chaudière, J. (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical research in toxicology*, 11(10), 1176-1183.
9. Boroujeni, S. T., Naghdi, N., Shahbazi, M., Farrokhi, A., Bagherzadeh, F., Kazemnejad, A., & Javadian, M. (2009). The effect of severe zinc deficiency and zinc supplement on spatial learning and memory. *Biological trace element research*, 130(1), 48-61.
10. Mayo-Wilson, E., Imdad, A., Junior, J., Dean, S., & Bhutta, Z. A. (2014). Preventive zinc supplementation for children, and the effect of additional iron: a systematic review and meta-analysis. *BMJ open*, 4(6), e004647.
11. Khor, GL, y Misra, S. (2012). Intervenciones de micronutrientes sobre el rendimiento cognitivo de los niños de 5-15 años en los países en desarrollo. *revista Asia Pacífico de la nutrición clínica*, 21 (4), 476.
12. Bhatnagar, S., & Taneja, S. (2001). Zinc and cognitive development. *British journal of nutrition*, 85(S2), S139-S145.