



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

## Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del benzoato de estradiol sobre la expresión de las interleucinas 6 y 10 en el modelo de isquemia cerebral global aguda en la rata, determinado por biosensores ópticos basados en matrices planares de silicio

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Omar Montes Narvárez

Codirectores:

Dr. Marcos García Juárez

Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2024





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

## Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del benzoato de estradiol sobre la expresión de las interleucinas 6 y 10 en el modelo de isquemia cerebral global aguda en la rata, determinado por biosensores ópticos basados en matrices planares de silicio

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

**Omar Montes Narváez**

Comité Tutorial

**Dr. Marcos García Juárez**

**Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil**

**Dr. Oscar González Flores**

**Dr. Kurt Leroy Hoffman**

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2024

## FINANCIAMIENTO

El proyecto de investigación de la presente tesis se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA) perteneciente a la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx) y en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Este trabajo estuvo financiado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) mediante la convocatoria Ciencia de Fronteras en el año 2023 con el proyecto CF-2023-G-289 y mediante la beca de Doctorado para Omar Montes Narváz No. CVU-930329. El Doctorado en Ciencias Biológicas está registrado en el Sistema Nacional de Posgrados del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (SNP- CONAHCyT).



# CARTA AUTORIZACIÓN DE TESIS



Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (CTBC)  
Doctorado en Ciencias Biológicas  
Proceso: Posgrado CTBC  
Registro: Carta Autorización de Impresión de Tesis

Código: 503-RGE-25

Revisión: 03

## COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Omar Montes Narváez** realiza para la obtención del grado de **Doctor en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **"Efecto del benzoato de estradiol sobre la expresión de las interleucinas 6 y 10 en el modelo de isquemia cerebral global aguda en la rata, determinado por biosensores ópticos basados en matrices planares y cilíndricas de silicio"**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., A 08 DE OCTUBRE DEL 2024

DR. OSCAR GONZÁLEZ FLORES

DR. KURT LEROY HOFFMAN

DRA. GEORGINA BELTRÁN PÉREZ

DR. VALENTÍN LÓPEZ GAYOU

DR. CARLOS EDMUNDO AGUILAR PÉREZ



## CARTA NO PLAGIO

# *Universidad Autónoma de Tlaxcala*

CENTRO DE INVESTIGACION EN REPRODUCCIÓN ANIMAL  
(C.I.R.A.)

Apdo. Postal 62. Tlaxcala, Tlax. 90000 México

### **Comité Académico Posgrado En Ciencias Biológicas**

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por el estudiante Omar MontesNarvárez titulada “Efecto del benzoato de estradiol sobre la expresión de las interleucinas 6 y 10 en el modelo de isquemia cerebral global aguda en la rata, determinado por biosensores ópticos basados en matrices planares de silicio” para optar por su grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

El documento de la tesis de Omar Montés Narvárez fue revisado por mí como director de tesis antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente a los exámenes tutorales, los miembros de su comité tutorial realizaron también sus respectivas observaciones. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. En el mes de diciembre, el documento final de la tesis fue procesado con el programa Turnitin marcando poco texto con similitudes (3%). Los textos detectados con similitud fueron corregidos por el estudiante. Se volvió a procesar el documento y volvió amarrar 3%; sin embargo, examinando los detalles de la búsqueda se observó que las similitudes están marcadas abreviaturas a lo largo del documento. Otras similitudes se observaron en la sección del índice y la metodología, correspondiendo a lenguaje técnico común, por lo que esta similitud no podría ser considerada como plagio.

Por lo anterior, confirmo que la estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE

Tlaxcala, Tlax., a 2 de diciembre del 2023.

  
Dr. Marcos García Juárez

**Director de tesis**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx) por permitirme realizar mis estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el soporte económico mediante la beca de Doctorado con No. CVU-930329 y el financiamiento a través del proyecto CF-2023-G-289.

A los miembros de mi comité tutorial, asesores y sinodales de examen de grado, en primer instancia a mis codirectores de tesis el Dr. Marcos García Juárez y el Dr. Raúl J. Delgado Macuil quienes han sido mis guías a lo largo de este proceso y han brindado todo su conocimiento y experiencia para que este proyecto sea concluido, a mis asesores el Dr. Oscar González Flores y el Dr. Kurt Leroy Hoffman de quienes he aprendido mucho por su gran trayectoria, liderazgo y por siempre tener la disponibilidad de ayudarme en todo lo que he necesitado, también quisiera agradecer a los miembros sinodales que formaron parte de mi examen de grado que siempre han ofrecido su tiempo y apoyo a lo largo del posgrado, a la Dra. Georgina Beltrán Pérez, Dr. Valentín López Gayou y Dr. Carlos Edmundo Aguilar Pérez, a todos de nuevo y sinceramente muchas gracias.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Al Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA) de la (UATx) por otorgarme la posibilidad de desarrollar mi protocolo experimental isquémico.

Al laboratorio de física óptica del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) por concederme la oportunidad de realizar mis procesos experimentales mediante el desarrollo de biosensores.

A mis amigos y compañeros de ambos laboratorios por siempre ayudarme cuando los he necesitado.

Por último, quisiera agradecer a mi familia por acompañarme en todo este camino y darme la motivación para conseguir este logro.



## **DEDICATORIA**

A mi familia por su apoyo incondicional.

## RESUMEN

Los Accidentes Cerebro-Vasculares (ACV) han sido referidos como una de las principales causas de muerte e incapacidad permanente a nivel mundial, afectando alrededor de 15-17 millones de personas en el mundo cada año, se estima que 1 de cada 4 personas se verá afectada por esta enfermedad a lo largo de su vida, lo que la convierte en una patología de relevancia en la salud pública, igualmente resulta de interés para los gobiernos por los enormes costos económicos que genera. Los ACV se caracterizan por una disminución o interrupción abrupta del flujo sanguíneo que irriga el cerebro y de acuerdo a su clasificación existen dos principales tipos de ACV; los hemorrágicos y los isquémicos, los primeros son los más mortales pero menos comunes, representan alrededor del 15% del total de casos, estos episodios se ocasionan por una lesión vascular que provoca una extravasación del contenido hemático al cerebro. El segundo es el tipo de ACV menos mortal pero más común, con un 85% del total de casos, estos episodios son originados por una obstrucción del lumen vascular que impide el flujo de sangre a las estructuras encefálicas. Los mecanismos moleculares y celulares desencadenados por esta patología han sido denominados como cascada isquémica la cual finaliza con la muerte neuronal. Dentro de la gran diversidad de procesos que se desencadenan durante esta casada, algunas proteínas como las interleucinas (ILs) han sido reportadas como agentes de especial interés en la investigación científica, esto debido a su aplicabilidad clínica por ser biomarcadores moleculares y predictores del daño celular. Algunas ILs han sido descritas como moduladores de los procesos neuroinflamatorios, la IL-6, por ejemplo, es ampliamente conocida por ser un facilitador de la respuesta inflamatoria, principalmente durante la fase aguda, propiciando la muerte celular, por contrario, otras ILs como es el caso de la IL-10, poseen efectos antiinflamatorios. Las concentraciones plasmáticas de ambas (IL-6 e IL-10) en individuos que padecieron un ACV de tipo isquémico, están íntimamente asociadas con un peor o mejor pronóstico de sobrevivida respectivamente. Es así que la regulación negativa o positiva en la síntesis de estas proteínas cobra especial interés en los tratamientos farmacológicos administrados a pacientes isquémicos. Uno de los fármacos que ha demostrado regular la expresión de estas ILs es el benzoato de estradiol (BE). Esta hormona ha mostrado ser un agente neuroprotector al disminuir las concentraciones de IL-6 y aumentar las de IL-10 en pacientes

con ACV, lo que a su vez modula la neuroinflamación y decrece los procesos necróticos y apoptóticos. Por esta razón en el presente trabajo estudiamos las concentraciones de estas dos ILs en ratas macho *Sprague Dawley* con distintos horarios post-isquemia expuestos a un tratamiento farmacológico con BE a dosis de 4/mgkg, esto con la intención de determinar si existen fluctuaciones en las concentraciones de estas dos ILs y en general de la síntesis proteica a distintos horarios post-isquemia (0,2,4,6,12 y 24h). La implementación del proceso isquémico se realizó mediante el método de oclusión de los 4 vasos sanguíneos, posteriormente se obtuvo el suero sanguíneo mismo que fue utilizado para su medición. La detección de IL-6 e IL-10 se realizó mediante una técnica experimental novedosa conocida como Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier en modo Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR), y mediante el diseño de biosensores ópticos (BO) que permitieron medir las concentraciones de estas ILs de forma eficiente y a un bajo coste. Los resultados de nuestro estudio mostraron una mayor concentración proteica y expresión de IL-6 en la fase isquémica hiperaguda en animales sin tratamiento, en contraparte, los animales que tuvieron el tratamiento neuroprotector con BE limitaron la expresión proteica durante esta fase e incrementó la expresión de IL-10 en la fase subaguda isquémica (4-6h). Estos hallazgos sugieren que el BE tiene un efecto neuroprotector al limitar la respuesta inflamatoria disminuyendo las concentraciones de IL-6 y promoviendo la producción de IL-10. La detección de estas proteínas fue posible mediante la ATR-FTIR. Las perspectivas de este trabajo incluyen la medición en muestras humanas, así como la adaptación de nuestros dispositivos biosensores para realizar la detección de estas proteínas en tiempo real.

Palabras Clave:

- Isquemia Cerebral.
- Espectroscopía de infrarrojo.
- Interleucinas.

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

ACV: Accidente Cerebro-Vascular.

AIT: Ataque Isquémico Transitorio.

ATR-FTIR: Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier en modo Reflectancia Total Atenuada.

BE: Benzoato de Estradiol.

BHE: Barrera Hematoencefálica.

BO: Biosensores Ópticos.

CA: Cuerno de Among.

CMM: Células Madre Mesenquimales.

E: Estradiol.

ELISA: Enzimo inmunoanálisis de adsorción.

FNT- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$ .

FSH: Hormona Folículo Estimulante.

GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotropinas.

h: Horas.

ICGA: Isquemia Cerebral Global Aguda.

ILs: Interleucinas.

IL-6: Interleucina-6.

IL-10: Interleucina-10.

LCR: Líquido Ceforraquídeo.

LH: Hormona Luteinizante.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

PCA: Análisis de Componentes Principales.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SNP: Sistema Nervioso Periférico.

u.a: Unidades Arbitrarias

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	-1-
1.1 Clasificación de los ACV	-4-
1.1.1 Accidente cerebro-vascular isquémico	-4-
1.1.2 Accidente cerebro-vascular hemorrágico	-5-
1.2 Factores de riesgo del ACV	-5-
1.3 Biosíntesis del estradiol	-8-
1.3.1 Funciones asociadas al estradiol	-10-
1.3.2 Estradiol e inflamación	-11-
1.4 Citocinas	-13-
1.5 Proceso inflamatorio	-16-
1.5.1 Inflamación a nivel clínico	-20-
<b>2. ANTECEDENTES</b>	-22-
2.6 Interleucina 6 (IL-6)	-22-
2.6.1 Interleucina 6 en el Accidente Cerebrovascular	-24-
2.6.2 Citocinas en sangre	-27-
2.6.3 Receptores de citocinas	-29-
2.6.4 Interleucina 10 (IL-10)	-30-
2.6.5 Interleucina 10 en el Accidente Cerebrovascular	-31-
2.7 Medición de suero por ATR-FTIR	-33-
2.7.1 Biosensores ópticos (BO)	-34-
2.7.2 Clasificación de los Biosensores	-35-
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	-37-
<b>4. HIPÓTESIS</b>	-38-
<b>5. OBJETIVOS</b>	-39-
5.1 Objetivo General	-39-
5.2 Objetivos Específicos	-39-
<b>6. METODOLOGÍA</b>	-40-
6.1 Características de los animales	-40-
6.1.1 Grupos experimentales	-40-
6.2 Asepsia quirúrgica	-41-
6.3 Electrocauterización de arterias vertebrales	-43-
6.4 Exposición de arterias carótidas comunes	-44-
6.5 Isquemia Cerebral Global Aguda	-45-
6.6 Obtención de muestras	-47-
6.7 Medición de suero por FTIR	-48-
6.8 Construcción del biosensor	-50-
<b>7. RESULTADOS</b>	-60-
<b>8. DISCUSIÓN</b>	-95-
<b>9. CONCLUSIONES</b>	-105-
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	-106-
<b>11. REFERENCIAS</b>	-108-
<b>12. PUBLICACIONES</b>	-122-
<b>13. ANEXOS</b>	-128-

## 1. INTRODUCCIÓN

Los ACV son actualmente una de las patologías de mayor relevancia en la salud pública por la alta incidencia y tasas de muerte e incapacidad permanente que generan en poblaciones de todo el mundo, de acuerdo a la clasificación etiológica de estos episodios, pueden diferenciarse 2 principales tipos de ACV; los de tipo hemorrágico y los isquémicos, los últimos también conocidos como infartos cerebrales son los más comunes representando un 85% del total de los casos, su principal característica es una disminución abrupta del flujo sanguíneo que irriga al cerebro, esta falta de irrigación cerebral produce una limitación en el aporte de glucosa y oxígeno que son esenciales para el metabolismo celular, esta privación provoca en los pacientes isquémicos procesos moleculares y celulares llamados (cascada isquémica), que culminarán con la muerte neuronal por necrosis, apoptosis o necroapoptosis. Dentro de los mecanismos de la cascada isquémica, participan algunas proteínas como las ILs en la promoción y limitación del daño cerebral por modulación de la respuesta inflamatoria.

Las ILs son proteínas solubles de bajo peso molecular sintetizadas por diversas células principalmente las del sistema inmune, como células B, células T, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, entre otras, estas citocinas participan en la comunicación celular al ser mensajeros químicos. Las acciones asociadas a estas proteínas son diversas, algunas de ellas incluso poseen funciones duales como es el caso de la IL-6, esta IL en condiciones fisiológicas homeostáticas participa en los procesos hematopoyéticos, así como en la modulación de eventos inflamatorios leves, sin embargo, en condiciones patológicas que involucran procesos inflamatorios moderados / exacerbados sin importar su etiología, la IL-6 facilita los mecanismos moleculares y celulares que mantienen e incrementan la respuesta inflamatoria y por ende el daño celular generado por la misma, en contraste, otras ILs son descritas como factores de protección neural al regular la proliferación de otras ILs, tal es el caso de la IL-10, esta citocina ha sido destacada por modular negativamente aquellos factores moleculares asociados a la inflamación.

En enfermedades neurodegenerativas como la isquemia cerebral global aguda (ICGA) se propician procesos neuroinflamatorios que, de no ser controlados, culminarán en un daño neural irreversible, por tal motivo se han implementado distintos tratamientos farmacológicos en individuos isquémicos con la intención de limitar la proliferación de factores proinflamatorios como la IL-6 y en cambio, favorezcan el aumento en la síntesis de agentes antiinflamatorios como es el caso de la IL-10. La administración de BE ha sido utilizada en modelos de ICGA donde ha probado poseer efectos neuroprotectores decreciendo la muerte neural y en otros modelos de investigación se le ha asociado con la modulación negativa y positiva de la IL-6 e IL-10 respectivamente. En distintos estudios se ha demostrado que estas dos ILs funcionan como predictores de gravedad al relacionarse altas concentraciones de IL-6 con un peor pronóstico, por contrario, concentraciones elevadas de IL-10 están correlacionadas con una mejor tasa de supervivencia y recuperación, por ello, la detección de estas proteínas tiene importancia en la práctica clínica, sin embargo, en la actualidad las técnicas utilizadas para la detección de estas ILs es a través de procesos moleculares como el ensayo de inmunoadsorción mejor conocido como (ELISA) por su acrónimo en inglés, en este tipo de ensayos un antígeno inmovilizado se une a su anticuerpo que se encuentra enlazado a una enzima que generará un subproducto que puede ser detectado, este tipo de procedimientos fue sugerido como una alternativa a los radioinmunoensayos que resultan peligrosos por el manejo de materiales radiactivos (Voller et al. 1978); no obstante, este tipo de técnicas presentan algunas desventajas como elevados costes, tiempos largos de detección, entre otras; por eso en el presente trabajo de tesis se tuvo el propósito de evaluar la modulación en las concentraciones proteicas, así como de las interleucinas 6 y 10, en el suero sanguíneo de ratas macho de la cepa *Sprague Dawley* expuestas a un proceso de ICGA. Estos sujetos de estudio recibieron un tratamiento farmacológico de BE con una concentración de (4mg/kg) de acuerdo al protocolo propuesto por (Wappler et al. 2010), administrado 30 minutos previo a la inducción de un episodio isquémico basado en el modelo propuesto por (Pulsinelli y Brierley 1979). La muestra sanguínea de los individuos de experimentación fue obtenida en distintos horarios post-isquemia (0,2,4,6,12 y 24h) con la intención de estudiar la modulación en las concentraciones proteicas y específicamente de dos citocinas bioindicadoras IL-6 e IL-10, asociadas a este padecimiento.

En este estudio se propone una nueva metodología de análisis médico centrado en la ATR-FTIR en modo macro y micro mediante la medición directa de suero, así como el desarrollo de BO basados en matrices planares de silicio cristalino que sean específicos para la detección de estas dos ILs. Este modelo nos permitió tener una aproximación más fehaciente en el estudio de la expresión proteica y de estas dos ILs, así como un acercamiento al desarrollo de dispositivos comerciales que pueden ser empleados en la práctica clínica de distintas patologías, ya que como se mencionó previamente, estas dos ILs se encuentran íntimamente asociadas a los procesos inflamatorios sin importar el agente etiológico que los genere y por ende con los pronósticos de muerte y recuperación.

En el estudio de ciertas enfermedades crónico-degenerativas como los ACV, se ha demostrado que existe una gran cantidad de proteínas asociadas a esta enfermedad que se inducen mediante la expresión de biomoléculas. En algunos casos la presencia de estas proteínas únicamente se puede inferir o probar por medio de técnicas moleculares que son costosas en tiempo y recursos; sin embargo, en la última década, sobre todo en el campo de las neurociencias, se han desarrollado diversas herramientas asociadas a la espectroscopía, con la finalidad de estudiar la actividad molecular con una alta especificidad no alcanzada por las técnicas convencionales. La espectroscopía aplicada a sistemas biológicos es una tecnología que es utilizada con la intención de determinar las modificaciones moleculares que puedan existir en una muestra y de esta forma caracterizar su espectro o también llamado “huella dactilar” muestral.

Los ACV son todas aquellas neuropatologías caracterizadas por una disminución del flujo sanguíneo y por ende de sus nutrientes, principalmente oxígeno y glucosa hacia el cerebro. Los ACV son catalogados como un síndrome clínico, debido a su gran diversidad etiológica, tienen como característica un desarrollo veloz de las lesiones que propician (Chen et al. 2021).

La clasificación internacional de enfermedades define a los ACV como el desarrollo rápido de signos clínicos de afectación focal o global de las funciones cerebrales, con síntomas que duran por lo menos 24h, conduciendo a la muerte, sin otra causa aparente que no sea el origen vascular (Krishnamurthi et al. 2020).



En los países desarrollados los ACV son considerados como la tercera causa de muerte más frecuente, antecedido únicamente por las cardiopatías y cáncer (Climent et al. 2020). Esta incidencia se ha mantenido más o menos constante durante al menos las últimas tres décadas, generando altas tasas de incapacidad permanente.

### **Clasificación de los ACV**

Existen varios tipos de clasificación para los ACV tomando en cuenta diversos aspectos propios de la enfermedad; sin embargo, de acuerdo a su etiología pueden ser clasificados en dos grupos: hemorrágicos e isquémicos, representando un 20% y 80% respectivamente del total de casos. A su vez los isquémicos se subdividen en dos grupos acorde al área cerebral que hayan afectado, ya sea en focales o globales, los primeros afectan un área cerebral específica y los segundos se presentan cuando todo el cerebro se ve involucrado (Boursin et al. 2018).

### **Accidente cerebro-vascular isquémico**

Se produce cuando un vaso sanguíneo se ve obstruido de forma total o parcial propiciando un déficit en el aporte sanguíneo nutricional. Estos bloqueos vasculares ocurren principalmente de dos formas, trombótica y embólica. El ACV trombótico ocurre cuando se desprende un coágulo de sangre que viaja a través de los vasos sanguíneos hasta llegar a un sitio donde impide la circulación. Estos coágulos son generados por una excesiva producción plaquetaria, lesiones endoteliales, arterioesclerosis o estenosis vascular.

El ACV embólico se genera cuando una sustancia que puede ser endógena, exógena, sólido, líquido o gas, interrumpen el correcto flujo sanguíneo a través de los vasos. Agujas, grasas, objetos extraños, burbujas de dióxido de carbono, pueden generar un émbolo (Jatene y Bernardo 2003).

## **Accidente cerebro-vascular hemorrágico**

Este tipo de ACV es menos común que el isquémico, tiene como principal característica una ruptura de los vasos sanguíneos que irrigan al cerebro, produciendo hemorragia. Las causas atribuibles a este tipo de patología son los aneurismas, deformaciones venosas, presión arterial alta y contusiones. Algunos autores subdividen a este grupo en otros dos, subaracnoideos e intracerebrales. De tal clasificación los ACV hemorrágicos subaracnoideos se caracterizan por una hemorragia en la superficie del cerebro, en la parte medial de las meninges que recubren al mismo, mientras que los ACV hemorrágicos intracerebrales o también llamados intrahemisféricos ocurren por una hemorragia a nivel interno del cerebro.

## **Factores de riesgo del ACV**

Los factores de riesgo son todas aquellas variables, circunstancias, características personales o ambientales propias de un individuo o un grupo de individuos que se encuentran asociadas con una mayor probabilidad de padecer determinadas enfermedades, y funcionan como predictores estadísticos de estas (Putala 2020). Para poder ser considerados como factores de riesgo, deben poseer los postulados de causalidad que a continuación se enlistan:

- Intensidad de la asociación.
- Coherencia (con lo conocido sobre la historia natural y la biología).
- Especificidad (una causa-un efecto).
- Temporalidad (la causa antecede al efecto).
- Relación dosis-respuesta o gradiente biológico.
- Verosimilitud o plausibilidad biológica.
- Consistencia (en diferentes circunstancias).
- Experimentación (relacionada con la hipótesis).
- Analogía (con otras hipótesis probadas).

Los factores de riesgo que predisponen a los ACV se dividen en dos grupos llamados modificables y no modificables, definidos así por el hecho de que algunos pueden ser evitados o controlados y otros no (JJ y Román 2021).

Dentro de los factores de riesgo modificables encontramos:

- **Tabaquismo:** Este hábito daña a los vasos sanguíneos haciéndolos más rígidos comprometiendo su funcionalidad aún en fumadores pasivos.
- **Diabetes:** La diabetes junto con el consumo excesivo de bebidas azucaradas pueden elevar a más del doble la probabilidad de un ACV.
- **Colesterol:** El colesterol elevado incrementa las probabilidades de una obstrucción en los vasos sanguíneos, este fenómeno está estrechamente correlacionado con otros dos factores de riesgo que son el sedentarismo y la obesidad.
- **Enfermedad arterial:** Cualquier tipo de enfermedad que esté asociada a una de las principales cuatro arterias que irrigan el cerebro (carótidas y vertebrales) o bien capilares sanguíneos pueden inducir un ACV.
- **Ataques isquémicos transitorios (AIT):** Diagnosticar y tratar los AIT es de vital importancia para evitar ACV futuros, se ha comprobado que las personas que han sufrido un AIT tienen 50% más probabilidad de sufrir un ACV posteriormente, principalmente durante las siguientes dos semanas posteriores al AIT. Este tipo de episodios presentan los signos patognomónicos de la ICGA pero los mismos desaparecen durante las 24h posteriores.
- **Cardiopatías:** Los problemas cardíacos son muy variados, un mal funcionamiento cardíaco puede conllevar a un ACV ya que si las estructuras que componen el corazón

y que se encargan de realizar el gasto cardíaco no funcionan de manera adecuada pueden ocasionar aglutinamiento sanguíneo y coagulación en las cavidades del corazón.

- Trastornos sanguíneos: Algunas alteraciones en la sangre como un elevado conteo de glóbulos rojos puede predisponer la aparición de coágulos, de igual manera patologías como la anemia falciforme puede ocasionar que estas células se adhieran a las paredes vasculares ocasionando una estenosis del lumen vascular.
- Alcoholismo: El consumo cotidiano y exacerbado de bebidas embriagantes pueden generar hipertensión o una congestión alcohólica que pueden derivar en un ACV.
- Consumo de drogas ilegales: Algunas drogas ilegales como la ketamina, cocaína, éxtasis, heroína, entre otras, se han asociado con un mayor riesgo de padecer ACV.

Dentro de los factores de riesgo no modificables encontramos:

- Sexo: Los hombres tienen mayor probabilidad de padecer cualquier tipo de ACV en edades tempranas en comparación con las mujeres, sin embargo, se sabe que la incidencia en mujeres en edades post-menopausia igualan e incluso incrementan con respecto a las de los hombres.
- Genética: Todas aquellas personas cuyos parientes de consanguinidad directa han sufrido un ACV tienen una mayor predisposición a sufrir ACV, de igual manera las personas de raza negra son más propensas a sufrir este tipo de patologías comparados con las personas de raza caucásica.
- Edad: A pesar de que los ACV afectan a personas de todas las edades, es claro que la tendencia a padecer estas patologías se incrementa drásticamente a medida que las personas tienen mayor edad, siendo las personas geriátricas las más susceptibles a este

tipo de episodios, no obstante, estos procesos son cada vez más comunes en jóvenes incluso infantes.

- Medio ambiente: Las personas que viven en localidades o trabajan en sitios en los que se encuentran expuestos a contaminantes como metales pesados pueden padecer de procesos cerebrovasculares.

Por lo descrito anteriormente los ACV son una patología que tradicionalmente se ha correlacionado principalmente con personas de edad avanzada, y se prevé que para el año 2030, la incidencia, discapacidad y muerte por este tipo de enfermedades se verá duplicado a nivel mundial como lo pronostica (Béjot et al. 2019). En países en vías de desarrollo también se encuentran catalogados como la segunda causa más común de mortalidad en adultos jóvenes y como la primera en invalidez. Los pronósticos acerca de esta patología no son alentadores, ya que la tendencia a padecer estas patologías continúa en ascenso debido a la mayor esperanza de vida. Además, la relación edad/ACV se cree, puede estar influenciada por la ausencia en la producción de hormonas gonadales, principalmente estradiol (E) y progesterona (P), esto explicaría el aumento en la incidencia de esta enfermedad en mujeres postmenopáusicas como lo explica (Wafa et al. 2018).

### **Biosíntesis del estradiol**

El (E) es una hormona sexual femenina de origen esteroideo, su biosíntesis ocurre principalmente en las gónadas sexuales femeninas (ovarios), aunque también se conoce que dicha hormona puede sintetizarse en otros órganos como la placenta y en células gliales del sistema nervioso central (SNC) así como en las células de Schwann del sistema nervioso periférico (SNP) (Ventura y Hernández 2019).

Las biomoléculas esteroideas poseen una estructura química que consiste básicamente en el ciclo pentanoperhidrofenantreno. El E está constituido por 18 átomos de carbono, el colesterol que es el precursor obligado de las hormonas esteroideas les confiere a todas estas hormonas una configuración molecular similar.

El colesterol se sintetiza en el retículo endoplásmico liso y se obtiene desde el plasma. Los productos de la degradación del colesterol pueden ser secretados como hormonas o servir como precursores de otras hormonas.

La etapa limitante en el ovario es el paso de colesterol a pregnenolona y está regulada por la hormona luteinizante. Los estrógenos se forman por aromatización del anillo A de los andrógenos (estradiol desde testosterona, estrona desde androstenediona). El estriol se produce como producto final desde el estradiol. Los estrógenos se metabolizan principalmente en hígado y tracto gastrointestinal, los niveles de estrógenos son medibles en sangre completa, suero, plasma e incluso moco cervical, saliva, y fluido folicular y peritoneal.

Estos procesos de síntesis ocurren en sitios específicos del ovario durante el ciclo menstrual y en hembras en su equivalente el ciclo estral. Los folículos terciarios (ya dependientes de gonadotrofinas), están compuestos por los ovocitos, rodeados por células de la granulosa y su membrana basal que las separa de las células de la teca. En las células de la granulosa se sintetizan estrógenos, estimulados por la FSH. Para ello necesitan de precursores androgénicos que llegan por difusión simple a través de la membrana desde las células de la teca que son estimuladas por LH. Durante la fase folicular la FSH induce la expresión de sus receptores en la granulosa, lo que aumenta los niveles de estrógenos y estos a su vez inducen la expresión de receptores para LH en la teca, aumentando la eficiencia de este sistema.

Durante la biosíntesis esteroidea participan: el citocromo P50 scc (enzima desramificante del colesterol), citocromo P50 17- $\alpha$ -hidroxilasa, la P50 aromatasasa y la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ HSD). Estas enzimas participan en la regulación de la conversión del colesterol en pregnenolona, de la pregnenolona a progesterona y finalmente en la conversión de andrógenos a estradiol como lo describe (Schiffer et al. 2019).

Con el uso de técnicas como la hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica, se ha conseguido dilucidar la distribución cerebral de las enzimas que intervienen en la biosíntesis esteroideogénica en una amplia variedad de animales, sin importar el género; dichas enzimas han sido localizadas en la corteza cerebral, cerebelo, amígdala, bulbo olfatorio, cuerpo estriado, septum e hipocampo. De igual manera se ha localizado al receptor para E en neuronas del hipotálamo, amígdala, septum, cerebelo, corteza cerebral e hipocampo (Dietrich et al. 2015, Schiffer et al. 2019). El E produce efectos plásticos en el SNC, pues interviene en la formación, maduración, diferenciación y funcionalidad de las células nerviosas (Kramár et al. 2013). La producción hormonal del ovario está circunscrita al eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Tanto la FSH como la LH se producen en respuesta a distintos patrones pulsátiles de secreción de GnRH por parte del hipotálamo y están íntimamente modulados por los niveles de estrógenos y otras hormonas producidas en el ovario.

### **Funciones asociadas al Estradiol**

Las hormonas gonadales además de las bien sabidas funciones reproductivas en las que están involucradas, también poseen múltiples efectos en otros órganos que no son los reproductivos como el cerebro, donde ejercen acciones de suma importancia desde la etapa gestacional hasta la senescencia. Estos compuestos hormonales actúan en áreas del cerebro que no necesariamente se involucran con las conductas sexuales o reproductivas como lo son el prosencéfalo basal, el hipocampo, el rafe del mesencéfalo, el tronco encefálico, el putamen caudado entre otros. Es debido a esto que múltiples grupos de investigación han trabajado en el estudio de los efectos estrogénicos y han descubierto que están íntimamente relacionados por procesos de memorización, envejecimiento celular y enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, tanto las progestinas como los estrógenos modulan la sinaptogénesis en la región CA1 del hipocampo, así mismo, la creación de nuevas sinapsis excitatorias se induce por E involucrando receptores N-metil-D-aspartato (NMDA).

## **Estradiol e inflamación**

Las hormonas esteroideas gonadales, es decir, aquellas cuya principal síntesis se realiza a nivel de ovarios y testículos, en hembras y machos respectivamente, utilizando como sustrato el colesterol, han sido históricamente asociadas única y exclusivamente a la mediación de las respuestas fisiológicas vinculadas con la reproducción, específicamente con la conducta sexual, los ciclos estrales, la gestación, el parto y la lactancia; sin embargo, actualmente es bien conocido como estas hormonas son producidas en otros órganos periféricos e incluso ya se ha demostrado su síntesis a nivel SNC.

El descubrimiento de la producción a nivel cerebral de hormonas como el estradiol, la testosterona o la progesterona, así como la biodisponibilidad de sus receptores en áreas del encéfalo que no están relacionadas directamente con las funciones a las que comúnmente se les asocia, despertó en los investigadores diversos cuestionamientos que llevaron finalmente al entendimiento de que estas moléculas poseen múltiples y variadas funciones que no son exclusivas para la reproducción. De tal forma que actualmente podemos aseverar que varias funciones del SNC se encuentran influenciadas o directamente orquestadas por las hormonas esteroideas (Compagnone y Mellon 2000). Uno de los factores que propician las acciones de hormonas esteroideas gonadales a nivel SNC tiene que ver con la facilidad que poseen estas sustancias para atravesar la barrera hematoencefálica y de esta forma lograr la unión a sus receptores en sus células diana, conformando complejos neuroactivos (Mellon y Griffin 2002). No obstante, las funciones activadas por hormonas gonadales a nivel SNC no son propiciadas únicamente por las hormonas procedentes del sistema periférico que logran atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), ya que la producción de estas puede llevarse a cabo *de novo* por células neuronales y de la microglía, incluso se ha reportado la presencia de sus metabolitos a nivel cerebral en altas cantidades como el caso de la alopregnanolona (Marx et al. 2006). Es debido a esto que el consenso científico actual manifiesta que los efectos de las hormonas esteroideas gonadales son indistinguibles independientemente de los órganos o células donde hayan sido generados; sin embargo, pueden clasificarse como neuroesteroides si son



sintetizados a nivel SNC o esteroides gonadales si fueron producidos en órganos sexuales (Charalampopulos et al. 2006).

Una de las principales funciones asociadas específicamente a los neuroesteroides tiene que ver con la neuroprotección ante el deterioro celular en neuronas de individuos expuestos a condiciones patológicas neurodegenerativas, tales como el Parkinson, Alzheimer o la Isquemia Cerebral. Aunque los mecanismos moleculares desencadenados por los neuroesteroides así como las vías de señalización involucradas en las respuestas neuroprotectores no han sido dilucidadas en su totalidad, si han sido reportados hallazgos que permiten tener una mayor claridad de como ejecutan esta neuroprotección.

En un estudio realizado en aves se determinó que, ante una lesión cerebral, una menor inhibición de la enzima aromataasa y el reemplazo estrogénico, propiciaron un daño cerebral menor, así como la extensión del mismo (Pedersen et al. 2017).

El sistema nervioso central (SNC) es considerado un órgano inmune privilegiado, dada la existencia de su BHE que interviene en el paso de células inflamatorias y mediadores químicos entre los capilares sanguíneos al parénquima cerebral. En la actualidad se cuestiona el grado de aislamiento del SNC mediante la BHE. Se conoce la activación del sistema inmune y se ha descrito la presencia de un número muy reducido de linfocitos (1-3 mm) en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes sanos.

Existen en el SNC células inflamatorias propias de la microglía y los macrófagos, los cuales están involucrados en la recepción y propagación de información inflamatoria. En los últimos años se ha descrito que el sistema inmune y el proceso inflamatorio participan de forma activa en la pérdida neuronal descrita en enfermedades del SNC agudas (por ejemplo, infarto cerebral) y crónicas (esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer) (Moonen et al. 2023). La respuesta inflamatoria en el SNC está dada por la activación de células de la microglía y astrocitos, expresión de mediadores inflamatorios, con una invasión controlada de células inflamatorias periféricas. Este proceso podría estar facilitado por la rápida inducción de la expresión de

mediadores inflamatorios, como las citocinas y prostaglandinas que regulan las moléculas de adhesión y aumentan la permeabilidad de la BHE, promoviendo el paso de células inflamatorias periféricas, con la consecuente liberación de moléculas potencialmente tóxicas para las neuronas cerebrales. En el daño cerebral isquémico agudo aumenta la permeabilidad de la BHE y las células inflamatorias entran en contacto con los antígenos del SNC en el cerebro y en la periferia (Yang et al. 2019).

## **Citocinas**

Se puede definir a las citocinas como proteínas pequeñas, es decir, de bajo peso molecular (15-20KDa) aproximadamente, con una vida media corta y de vital importancia en los tres tipos de señalización celular, autocrina, endocrina y paracrina. Estas proteínas están ampliamente involucradas en las funciones fisiológicas relacionadas con el desarrollo inmunológico, por ejemplo; así como en su propio funcionamiento (Gandhi et al. 2016). Las citocinas son agrupadas en familias, esto dependiendo de su composición estructural y de su especificidad, esta especificidad definirá las funciones fisiológicas de las citocinas que incluso pueden ser opuestas o reguladas positiva y negativamente entre ellas mismas. Este tipo de proteínas (citocinas) necesitan de la unión a complejos de receptores multinuméricos en los que habitualmente suele hallarse alguna subunidad que puede interactuar con algunas otras citocinas (Spangler et al. 2015).

Se denomina citocinas a los más de 100 péptidos diferentes desde el punto de vista genético y estructural, que actúan mediante la unión a receptores específicos de la superficie celular. Las citocinas son sintetizadas por diferentes tipos celulares, y reciben diferentes nombres: linfocinas si son secretadas por linfocitos y monocinas, si son producidas por macrófagos. Muchas citocinas comparten funciones por ser pleiotrópicas, ya que actúan sobre diferentes tipos de células. Poseen vida media corta y actúan de forma paracrina y endocrina. La mayoría de las reacciones inflamatorias son mediadas por citocinas que pueden aumentar el daño producido por un infarto isquémico. En el cerebro existen muchos tipos celulares capaces de secretar

citocinas (microglía, astrocitos, células endoteliales y neuronas). Las citocinas circulantes están involucradas en la inflamación cerebral. Monocitos, linfocitos T, células NK y polimorfonucleares pueden contribuir a la inflamación del SNC. Las principales citocinas que actúan en el proceso de inflamación son: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), que son proinflamatorias, y dentro de las antiinflamatorias la interleucina 10 (IL-10) según lo reportado por (Becher et al. 2017).

La isquemia aumenta la expresión de citocinas proinflamatorias y quimiocinas capaces de inducir reactividad glial y atraer diferentes tipos de leucocitos hacia la zona de lesión. Se sabe que en las primeras horas después del inicio de la isquemia se libera factor de necrosis tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ), interleucinas (ILs) y distintos tipos de interferón (IFN) (Li et al. 2001), así como quimiocinas. Las concentraciones de citocinas también aumentan en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo, según se ha demostrado en animales de experimentación y en pacientes de ictus. Así, concentraciones sanguíneas elevadas de IL-6 y del FNT- $\alpha$  se correlacionan con deterioro neurológico (Vila et al. 2003). Sin embargo, la administración intracerebral de IL-6 tiene efectos neuroprotectores en animales (Loddick et al. 1998), y también se reconoce el papel dual del FNT- $\alpha$  (Hallenbecj et al. 2002), en función del receptor sobre el cual actúa. La concentración, el lugar y el tiempo de acción de las citocinas puede desempeñar un papel determinante en estos efectos aparentemente contradictorios. En cambio, concentraciones bajas de la citocina antiinflamatoria IL-10 en pacientes se relaciona con mal pronóstico, lo que concuerda con resultados experimentales que muestran efectos beneficiosos de la IL-10 (Ooboshi et al. 2005). Debido a la relevancia que tendrán las IL-6 y 10 para el presente proyecto, sólo se ampliará la información en relación a éstas.

La IL-6 es una glucoproteína secretada por macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Su liberación está inducida por IL-1 y aumenta en respuesta al TNF- $\alpha$ , su función activa la formación de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B.

La IL-6 puede contribuir al daño provocado por la inflamación en el cerebro, y está implicada en la regulación de la apoptosis neuronal (Herrmann et al. 2003). Diversos estudios sugieren que la IL-6 está sobrerregulada después de la isquemia cerebral (Wang et al. 1994), postulándose que posee efectos perjudiciales en la misma. En otro estudio se encontró que los pacientes cuyos niveles de IL-6 son mayores a 5pg/ml tienen una probabilidad 25 veces mayor de desarrollar un nuevo evento vascular y una probabilidad 19 veces mayor de fallecer por un problema de origen vascular. En consecuencia, los niveles elevados de IL-6 podrían ser un buen indicador de deterioro neurológico temprano, y niveles elevados de IL-6 se asocian a un mayor volumen de infarto y a un mal pronóstico (Castillo y Rodríguez 2003, CJ 2004). Así, se ha demostrado una asociación entre los niveles plasmáticos de IL-6 y el deterioro neurológico precoz, que es independiente del tamaño inicial, la topografía o el mecanismo de infarto.

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria secretada por linfocitos y monocitos. Actúa mediante la inhibición de los efectos de IL-1 y FNT- $\beta$  mediante la supresión de la expresión y de la activación de sus receptores. La IL-10 es sintetizada por el SNC y se encuentra sobreexpresada en infartos cerebrales experimentales (Strle et al. 2001). Se han detectado concentraciones altas de IL-10 en el LCR de pacientes con infarto agudo (Tarkowski et al. 1997). Pacientes con bajos niveles de IL-10 presentan un mayor riesgo de infarto, lo que sugiere un efecto protector de la citocina (Van et al. 2002). Por todo esto se ha propuesto a la IL-10 como un potencial blanco terapéutico antiinflamatorio para el infarto cerebral. La administración exógena de IL-10 podría constituir un posible tratamiento para reducir el daño producido por el infarto cerebral, esta teoría ya se ha realizado con éxito en animales, mostrando efectos benéficos (Spera et al. 1998).

## **Proceso Inflamatorio**

La inflamación es descrita como un amplio y multivariado conglomerado de procesos tanto de tipo fisiológico como patológico. Se han detallado un sin número de eventos necesarios para el desencadenamiento de la inflamación, su prolongación e inhibición. Los procesos inflamatorios que han sido estudiados de forma clásica (infección y lesión tisular) fueron de los primeros detonantes de conocimiento que explicaron el reclutamiento de leucocitos, así como el de proteínas plasmáticas incluidas las interleucinas en las áreas o tejidos afectados (Medzhitov et al. 2008).

Si bien una respuesta inflamatoria prolongada o excesiva puede resultar en un daño celular o tisular de consideración y en casos extremos incluso con la muerte de un individuo, debemos entender que la inflamación es un factor complejo pero en extremo necesario como respuesta ante estímulos biológicos, químicos o físicos que funciona como una alerta hacia el Sistema Nervioso Central de que existe algún problema y que sus efectos benéficos o perjudiciales dependen de su duración, severidad y área que hayan afectado.

Se conoce que en la fase aguda (24h) en la respuesta inflamatoria, diversas células, así como proteínas asociadas con funciones del sistema inmunológico, realizan una migración a través del suero sanguíneo hasta los sitios donde ha ocurrido la lesión. Estos eventos orquestados cronológicamente y a veces expresados de forma sincrónica son facilitados por distintos tipos de citocinas. Si la lesión es leve, por ejemplo, un ligero traumatismo que únicamente lesionó piel, la respuesta inflamatoria aguda puede ser suficiente para desencadenar los procesos de sanación de forma adecuada; sin embargo, en estadios de inflamación persistente que resultan de una exposición continua ante agentes proinflamatorios se puede conducir a un estadio de inflamación crónica en la que generalmente el daño suele ser mayor, esto no quiere decir que la inflamación crónica sea siempre más dañina que la aguda.

Debemos recordar que el área de afección también es un factor importante al momento de determinar qué tan dañino es o no un proceso inflamatorio, por ejemplo, en los procesos

patológicos en los que existe neuro inflamación, una respuesta inflamatoria hiperaguda (segundos o minutos) puede culminar con la muerte de neuronas y esto desencadenar a su vez la muerte de un individuo sin que llegue a dar tiempo a pasar a un estadio de inflamación crónica.

Actualmente se conoce que los complejos celulares y moleculares que participan en la respuesta inflamatoria son los mismos sin importar su origen, de esta forma es que ahora el enfoque que están tomando los investigadores al momento de abordar la investigación de la inflamación, está avocada a determinar la presencia y/o función de los distintos mecanismos y sus componentes que funcionan como inmunomoduladores activos o pasivos de la misma. Se ha dilucidado que, si bien estos componentes son los mismos en los diversos tipos de inflamación, si existen cambios en la dinámica hematológica expresada en los factores del complemento y las citocinas, por ello, ahora se busca hacer la correlación individual de estos biomarcadores inflamatorios con eventos patológicos específicos con la intención de determinar si  $x$  o  $y$  citocina es más o menos común en determinada patología, de esta forma podrían instaurarse protocolos clínicos más específicos y con un impacto positivo mayor como lo menciona (Germolec et al. 2018).

Los procesos neuro-inflamatorios han sido tradicionalmente asociados a prácticamente todas las enfermedades de tipo neurodegenerativo entre las que se incluyen las más mortales y con mayor morbilidad como; el Alzheimer, enfermedad de Parkinson, Esclerosis Amiotrófica, Arterioesclerosis, Isquemia Cerebral, etc. Todas y cada una de ellas culminando con una disfunción o muerte neuronal. En ese sentido se entiende por enfermedad inflamatoria aquella patología que se conforme de componentes estructurales como los macrófagos o células linfoides, de un daño endotelial que disminuirá su funcionalidad y una respuesta de lesión que resulta en una cascada de eventos moleculares que involucra mecanismos humorales (citocinas y factores de crecimiento) y celulares (aumento de los procesos quimiotáxicos, migración, adherencia e infiltración celular). Cada fase del proceso inflamatorio posee sus propios componentes y vías de señalización destacando moléculas de adhesión, expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6 y el FNT- $\alpha$ , así como algunos ligandos fagocitarios. En las enfermedades inflamatorias donde se ve involucrado el SNC, particularmente en la isquemia cerebral, se ha demostrado que existen marcadas elevaciones en las concentraciones

de marcadores inflamatorios a nivel sistémico, detectando aumentos de la proteína C reactiva plasmática, el fibrinógeno, la IL-6, factores del complemento entre otras. La evidencia científica ha demostrado un rol fundamental de los procesos inflamatorios en la isquemia, se espera que los resultados de estos estudios arrojen luz acerca del desarrollo e implementación de nuevas estrategias terapéuticas que prevengan y disminuyan la incidencia y gravedad de esta enfermedad mediante la inducción natural de mecanismos antiinflamatorios o bien inhibiendo los elementos pro inflamatorios por vías selectivas (Gonzalez et al. 2002).

La investigación de la neuro-inflamación durante la ICGA es de vital importancia si tomamos en cuenta que su incidencia se da en 350 personas por cada 100.000 habitantes, representando la 1er-3er principal causa de muerte e incapacidad permanente en adultos jóvenes alrededor del mundo, no importando la economía o raza de las poblaciones. Si bien se ha logrado entender una amplia gama de eventos celulares y moleculares que participan activamente durante la neuro-inflamación y que son necesarios para su desarrollo, así como para su atenuación; sin embargo, los protocolos y tratamientos clínicos que son usados en la actualidad aún son ineficientes. Se ha comprendido que la respuesta cerebral experimental y clínica ante la lesión isquémica se verá asociada con un evento inflamatorio caracterizado por la activación de complejos celulares gliales, producción masiva de citocinas e infiltración leucocitaria y monocitaria, pero no se ha determinado en qué nivel estos procesos inflamatorios post-isquemia pudieran también estar contribuyendo a la recuperación neural mediante la facilitación de plasticidad cerebral (Kriz y Lalancette 2009).

## **Fases del proceso inflamatorio**

Los procesos inflamatorios abarcan un amplio número de fenómenos celulares y moleculares; sin embargo, pueden agruparse de forma genérica en 5 fases:

1.- Liberación de mediadores: Esto hace referencia a la salida de distintas moléculas hacia torrente sanguíneo, estas sustancias son producidas por los mastocitos y liberadas por ellos mismos ante estímulos de lesión.

2.- Consecuencia de los mediadores: Al ser liberados los mediadores y llegar a su sitio diana que en muchos casos es el propio endotelio vascular, producirán efectos de tipo quimiotáctico que permitirán, a su vez, una facilitación para el arribo de moléculas y células del sistema inmunológico al sitio inflamatorio. Es importante recalcar que los mediadores inflamatorios son los responsables de las manifestaciones clínica de la inflamación.

3.- Atracción de moléculas y células inmunológicas al foco inflamatorio: Estas sustancias llegan al área de lesión principalmente del sistema sanguíneo, pero también de algunos órganos adyacentes al lugar donde se presentó la lesión.

4.- Modulación inflamatoria: Esta es probablemente la fase más crítica del proceso inflamatorio debido a que la regulación o no del mismo, puede ser determinante al momento de predecir la posible gravedad del evento. Hay que recordar que la inflamación es una respuesta inmunológica natural y que los componentes que la conforman tienen benéficas acciones en estadios homeostáticos; sin embargo, cuando se elevan estas concentraciones y se prolongan en tiempo, es cuando desencadenan múltiples afecciones. Las moléculas pro y antiinflamatorias poseen un sistema de autorregulación que únicamente se ve alterado en estadios patológicos.

5.- Reparación y/o recuperación: Este último estadio consiste en una serie de fenómenos que resultarán, en condiciones normales, en la reparación tisular total que se haya visto afectada posterior al evento inflamatorio.



## **Inflamación a nivel clínico**

Los eventos inflamatorios son comprendidos como una amplia y diversa gama de respuestas fisiológicas y en ocasiones fisiopatológicas representadas en interacciones moleculares y celulares producto de la respuesta ante alguna lesión que esté ocasionando un daño al organismo. Dicha lesión puede tener múltiples etiologías muy distintas una de otra, por ejemplo, un traumatismo, infecciones bacterianas y/o víricas, tumoraciones cancerígenas, quemaduras, desórdenes inmunológicos e incluso puede ser originada por condiciones de obesidad, diabetes o accidentes cerebrovasculares por mencionar algunos.

Dependiendo del tiempo que haya transcurrido desde que inició el estadio inflamatorio, éste puede ser clasificado como inflamación aguda para aquellos procesos inflamatorios que duraron poco tiempo (minutos, horas o días) desde que inicio hasta que se recuperó la homeostasis, y crónicos para aquellos procesos inflamatorios cuya duración sea medida en semanas, años e incluso permanentes. Dependiendo el área o los órganos que se estén viendo involucrados en la inflamación también se le puede catalogar como: inflamación local para eventos que se presentan en un área u órgano muy específico, regional para aquellas inflamaciones que abarquen un área que involucre varios órganos y sistémica para los eventos inflamatorios que involucren a todo el organismo o a la gran mayoría de los órganos y aparatos. Finalmente dependiendo de la severidad del daño generado por la inflamación puede ser considerada como leve, moderada o grave.

A nivel clínico, los profesionales de la salud se valen de lo que se conoce como los puntos cardinales de la inflamación, que son un conjunto de signos y síntomas observables por el médico o manifestados por el paciente, que ayudan a diferenciar una inflamación de un edema. De tal forma para poder tener certeza de que se trata de un proceso inflamatorio se debe cumplir con lo siguiente:

1.- Rubor: El tejido debe observarse enrojecido, esto es debido a la vascularización característica de la inflamación, en el caso de edemas no existe dicho enrojecimiento. Este punto aplica solo

de forma macroscópica ya que no es observable a nivel microscópico, su equivalente sería la presencia de un gran número de capilares, vasos sanguíneos y tejido hemático.

2.- Tumor: Debe ser observable un aumento de tamaño en el tejido o células afectadas.

3.- Calor: Aumento de la temperatura en área afectada.

4.- Dolor: Únicamente percibido y manifestado por el paciente.

5.- Pérdida o disminución de la función: Este último punto fue el de más reciente adhesión y fue propuesto por Virchow quien detalló que todas las células, tejidos, aparatos, órganos o sistemas que estén envueltos en un proceso inflamatorio tendrán una pérdida parcial o total de su propia fisiología, es decir, que no podrán realizar sus procesos celulares y bioquímicos de forma adecuada.

Por lo antes descrito la implementación de nuevas metodologías y el desarrollo de nuevos dispositivos que permitan evaluar las modificaciones en la expresión proteica y en particular de analitos de interés, es de especial importancia al permitir tener una mejor comprensión del desarrollo fisiopatológico de enfermedades como la ICGA y también provee aproximaciones al desarrollo comercial de estos dispositivos para su uso práctico.

## 2. ANTECEDENTES

### **Interleucina 6 (IL-6)**

A la familia que pertenece la IL-6 tradicionalmente se la ha atribuido diversas funciones, incluida la activación de las células de tipo B así como la inducción de hepatocitos. También a esta familia de citocinas se la han dotado variadas funciones de tipo metabólico y neurotrófico. Estudios con anticuerpos monoclonales neutralizadores del receptor a IL-6 propiciaron su utilización a nivel global como un tratamiento efectivo en enfermedades de tipo autoinmune (Tanaka et al. 2014).

Este tipo de citocinas (IL-6) y otras moléculas como el factor inhibidor de la leucemia, el factor neurotrófico ciliar u otras citocinas como la cardiotrofina, se han catalogado como importantes mediadores en la señalización celular en diversos procesos patológicos, como infecciones virales o lesiones traumáticas que producen inflamación (principalmente en la fase aguda). Otro tipo de funciones relacionadas a la IL-6 tiene que ver con la hematopoyesis, neuroregeneración, fertilidad y un correcto desarrollo embrionario, todo esto en condiciones de homeostasis; no así en los procesos patológicos donde es un activador de la cascada de citocinas proinflamatorias. Si bien la inflamación es un mecanismo natural de respuesta inmunológica, se ha demostrado que altas concentraciones de IL-6 en plasma sanguíneo están directamente relacionadas con un mayor nivel de daño como el ocasionado por distintos tipos de cáncer, debido a que son de las principales citocinas que pueden ser halladas en los diversos microambientes tumorales. La sobreexpresión de IL-6 ha sido reportada en prácticamente todos los tipos de tumoraciones conocidos médicamente. Estas elevadas concentraciones de IL-6 en prácticamente todos los tipos de cáncer incluidos los que producen tumoraciones, podrían estar relacionados con el estadio crónico de inflamación involucrando células, tejidos e incluso aparatos y sistemas (Kumari et al. 2016).

También la IL-6 ha sido descrita como promotora de la tumorigénesis, lo cual se cree logra a través de la regulación de distintos tipos de vías de señalización molecular, incluyendo aquellos que desencadenan la apoptosis celular, la supervivencia de células cancerígenas, la hipervascularización, invasividad y metástasis, además, la IL-6 ha sido un factor determinante en la protección al daño de DNA en células cancerígenas, facilitando la regeneración de vías que actúan como señal para funciones antioxidantes y antiapoptóticas. Es así que bloquear la señalización de la IL-6 o disminuir sus concentraciones está íntimamente asociada a las terapias anticáncer.

De manera más reciente y en una patología de especial importancia en la actualidad, la IL-6 ha sido estudiada en su rol durante el desarrollo del SARS-CoV-2. Los estudios han documentado que los niveles de IL-6 se ven significativamente incrementados en aquellos pacientes que han tenido un cuadro severo de Covid-19. Estos niveles se vieron incrementados hasta casi 3 veces más que en aquellos sujetos que no padecían la enfermedad o que tuvieron un cuadro leve. La elevada concentración de IL-6 en pacientes con Covid-19 está directamente relacionada con cuadros clínicos adversos y pronósticos reservados. Es así que se ha propuesto la inhibición de la IL-6 como un tratamiento para pacientes que han sido ingresados en los centros hospitalarios por cuadros severos de SARS-CoV-2 (Coomes y Haghbayan 2020).

Todas las enfermedades con cursos proinflamatorios, incluidas tanto las de fase aguda como las crónicas, están íntimamente correlacionadas con un incremento en el riesgo de padecer un accidente cerebrovascular. Esto podría estar sugiriendo que la mayor predisposición a padecer ACV al tener alguna patología que involucre inflamación, se explica en el entendido de que la cascada de citocinas proinflamatorias es la misma independientemente de la patología o agente patógeno que la esté provocando.

Estas teorías también podrían ser validadas en el entendido de que se han realizado estudios con biomarcadores inmunológicos de inflamación como lipoproteínas o la IL-6 donde se ha demostrado que altas concentraciones de estos biomarcadores funcionan como predictores de

una mayor probabilidad de padecer un accidente cerebrovascular, un mayor daño neural y una menor tasa de supervivencia y recuperación (Esenwa y Elkind 2016).

El entendimiento de la base molecular en la que se producen los procesos inflamatorios, ha logrado la identificación de diversos biomarcadores que pueden funcionar como novedosos blancos terapéuticos en todas aquellas patologías o procesos de pérdida homeostática en los que indistintamente su etiología se produzcan las cascadas de citocinas proinflamatorias. Incluso se ha demostrado como niveles elevados en las concentraciones de IL-6 se correlaciona directamente con un mayor riesgo de parto prematuro inminente (Chaemsaihong et al. 2016).

### **Interleucina 6 en el Accidente Cerebrovascular**

Los principales agentes moleculares que modulan de manera positiva los procesos neuroinflamatorios en el accidente cerebrovascular y que han sido descritos como los objetivos potenciales primordiales terapéuticos son el TNF- $\alpha$ , así como las interleucinas 1 y 6, siendo esta última la de mayor importancia por sus acciones duales. Estas 3 citocinas son conocidas por tener la capacidad de modular el tamaño de volumen de infarto isquémico en modelos de isquemia focal, es conocido también el aumento de estas en líquido cefalorraquídeo (LCR) y conductos sanguíneos después de presentarse un cuadro isquémico en humanos (Allan et al. 2005). La evidencia científica pone de manifiesto que el TNF- $\alpha$ , así como la IL-1 en los cerebros de animales que sufrieron una lesión a causa de un ACV, son producidas por células de la microglía, así como por macrófagos infiltrantes derivados de monocitos, en tanto que la IL-6 además de las antes mencionadas también es producida por células neurales, sin embargo, pese a que han sido de las moléculas más ampliamente estudiadas tanto en humanos como en modelos experimentales de isquemia en animales, aún se desconoce su biodisponibilidad así como sus mecanismos de acción en los cerebros de pacientes en las distintas fases post-isquemia, siendo de mayor importancia la fase temprana o aguda que se encuentra dentro de las primeras 24h, dentro de este periodo específicamente entre las 4-6 h post-isquemia ya que es considerado el

periodo de ventana crítico para disminuir el daño neural ante la implementación de tratamientos farmacológicos (Buttini et al.1994, Suzuki et al. 1999, Ginsberg 2008).

Es por ello que antes de establecer un tratamiento terapéutico o farmacológico para atacar estas ILs en pacientes isquémicos, se debe conocer la biodisponibilidad de las mismas. Se ha reportado el aumento de estas ILs hasta 40-60 veces en el cerebro dentro de las primeras 24h posteriores al inicio del accidente cerebrovascular en modelos animales experimentales (Hill et al. 1999). Estos hallazgos se relacionan directamente con los efectos y evolución del daño isquémico, contribuyendo a la hipótesis de que un aumento considerable y múltiple de los niveles de citocinas proinflamatorias provocarán un daño mayor y peores efectos en los individuos durante el primer día posterior al evento isquémico, sin embargo, existe evidencia que no concuerda del todo con los aumentos de las citocinas pro inflamatorias, ya que se conoce que el tiempo de evolución del infarto isquémico no coincide con los aumentos en la producción de ARNm para las mismas, en modelos de isquemia cerebral focal. Para modelos de isquemia cerebral global, se sabe que el volumen del infarto cerebral alcanza casi su totalidad varias horas antes que la concentración de citocinas alcance su máximo. Estos datos pudieran aportar información acerca de los mecanismos moleculares que continúan ocurriendo incluso a nivel sistémico en horas, incluso días después de haber sufrido un accidente cerebrovascular. Estos efectos patológicos que ocurren incluso antes de que se alcancen los niveles máximos de estas citocinas, pudieran ser explicadas por el hecho de que se ha reportado aumentos de las concentraciones de glutamato en las hendiduras sinápticas durante los primeros minutos del evento isquémico, lo que estaría potenciando los efectos de las citocinas que incluso en condiciones homeostáticas se encuentran presentes en el parénquima cerebral tanto de humanos como de roedores. Esta hipersensibilización glutámica hacia las neuronas expuestas a un Stroke sería la causante de que el daño celular por acción de ILs sea exacerbado incluso sin que estas hayan alcanzado sus niveles máximos. Es así que conocer los procesos de producción celular de interleucinas proinflamatorias tanto en cerebros normales como en aquellos con patologías isquémicas es crucial para comprender los mecanismos a través de los cuales mantiene su interacción con las neuronas y de esta forma poder establecer los mejores tratamientos clínicos (Breder et al. 1993).

En investigaciones realizadas en seres humanos se ha logrado demostrar que en pacientes con ACV agudos, aumentan los niveles de FNT- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 tanto en sangre como en LCR, estas citocinas han sido medidas en suero sanguíneo y están íntimamente asociadas a la expresión modificada de diversos genes con funciones inflamatorias en las células sanguíneas según (Denes et al. 2011). Es debido a estos nuevos descubrimientos que la interleucina 6 se ha convertido en un marcador biológico de daño neural en el ACV y su estudio está enfocado en mejorar el diagnóstico, pronóstico y las terapias de rehabilitación. Dado que estas ILs tienen la capacidad de modulación de daño isquémico es que han adquirido especial relevancia en su asociación con el pronóstico clínico como lo menciona (Emsley et al. 2007).

Existen algunos trabajos donde se encontraron niveles elevados de IL-6 en el LCR de pacientes con ICTUS, y estos mismos estudios correlacionaron las concentraciones elevadas de esta interleucina con un daño de mayor gravedad y un peor pronóstico terapéutico. Esto también es apoyado por varios estudios contemporáneos donde se demostró una correlación de tipo positiva entre las concentraciones de IL-6 en el LCR a las 6h así como el tamaño de la lesión a las 24h post-isquemia (Beridze et al. 2001). Por contrario, en un estudio donde se analizaron las concentraciones de IL-6 en LCR de pacientes con isquemia multifocal con áreas de infarto pequeñas, no se observaron cambios significativos en la misma, lo que podría estar indicando que la IL-6 es una molécula mayormente asociada a lesiones graves como las observadas en la isquemia cerebral global, esto a su vez podría ser explicado por la ampliamente conocida función dual de esta citocina (Montaner et al. 2003).

Es importante enfatizar que la mayoría de los estudios que se han realizado para explorar las concentraciones de ILs proinflamatorias en pacientes que sufrieron un accidente isquémico han sido limitados a un punto temporal específico, lo que resulta en una problemática ya que en tiempos anteriores o posteriores a los establecidos por los investigadores existe una laguna de conocimiento que de descifrarse podría conllevar a un mejor entendimiento desde el punto de vista fisiopatológico, no obstante, es interesante que independientemente de los periodos de temporalidad establecidos por los distintos grupos experimentales la mayoría concuerda en que se encuentra más consistentemente aumentada en líquido cefalorraquídeo la IL-6, entre otros

factores pudiera ser asociada a que esta interleucina puede ser producida tanto por células de la microglía como por las mismas neuronas.

### **Citocinas en sangre**

El estudio de las concentraciones de citocinas en muestras sanguíneas ha sido reportado para reflejar de forma indirecta la producción de las mismas a nivel central; sin embargo, a diferencia de las mediciones realizadas en líquido cefalorraquídeo de estas moléculas, existen estudios que difieren en los cambios inducidos por accidentes cerebrovasculares dependiendo de si los análisis fueron realizados en muestras plasmáticas o de suero. De tal forma que algunas investigaciones han reportado no observar cambios en los niveles de estas citocinas posteriores al accidente cerebro vascular, por ejemplo, en un estudio donde se utilizaron imágenes de resonancia magnética no se encontraron cambios significativos de las concentraciones de IL-6 y TNF- $\alpha$  en pacientes isquémicos, en tanto, otros autores notifican que si existen aumentos de las mismas citocinas aunque con picos en distintos horarios posterior a un evento cerebro vascular y con diferencias en la gravedad del daño neural.

Hablando particularmente de la IL-6, parece existir un acuerdo generalizado entre los distintos grupos de investigación acerca de que las concentraciones de esta citocina se ven aumentadas en pacientes isquémicos, independientemente de si fueron muestras obtenidas de suero o plasma, incluso en individuos con una semana posterior al STROKE. Cabe hacer mención que el punto en donde existen resultados diversos tiene que ver con la hora pico de máxima producción de esta citocina, así como la correlación de esta con la gravedad del daño cerebral.

Algunos autores han reportado los picos máximos de producción para IL-6, hasta 72h posteriores al evento isquémico (Perini et al. 2001), algunos otros autores hacen mención que el pico máximo de la misma ocurre en algún momento durante la primera semana posterior al ACV como lo describe (Smith et al.2004). Estos hallazgos difusos en las concentraciones de suero y plasma de la Interleucina-6 en días posteriores al evento isquémico, podrían explicarse en el



entendido de que las concentraciones de la misma en ventanas de tiempo más cortas (minutos-horas) son las que tienen una mayor correlación con la gravedad de daño cerebral así como con los pronósticos terapéuticos, aunque otro estudio realizado en 66 pacientes con ACV (focal o multifocal) se reportó una correlación negativa entre los niveles tempranos de la IL-6 y el tamaño de la lesión cerebral así como con el pronóstico final de los pacientes, lo que pareciera indicar que los niveles tempranos de esta citocina están más asociados con efectos neuroprotectores, más que un predictor de la progresión final de la enfermedad. Cabe destacar que estos resultados no han sido corroborados en pacientes con procesos isquémicos globales. Debemos recordar que la IL-6 posee una función dual, actuando en condiciones homeostáticas o de inflamaciones leves como un factor de regeneración celular, es hasta que se presentan condiciones patológicas potentes que esta adquiere un papel relevante en la facilitación de los procesos inflamatorios independientemente de su etiología (Fassbender et al. 1994, Sotgiu et al. 2006).

Como hemos hecho mención anteriormente, otras citocinas como la IL-1 tienen una importancia indiscutible en los estudios experimentales de ICTUS, sin embargo, en los trabajos realizados para analizar las concentraciones de esta misma interleucina, por lo general no se reportan niveles elevados de la misma ni en suero ni plasma en pacientes isquémicos, esto probablemente por su rol a nivel localizado y no sistémico. Es debido a esto que la IL-6 pareciera ser el objetivo prioritario al momento de correlacionar concentración vs daño cerebral, debido a que es la molécula que se comporta de forma más homóloga tanto a nivel local como sistémico.

Podemos aseverar que existe poca homogeneidad en los resultados obtenidos acerca de las concentraciones periféricas de las citocinas proinflamatorias en horarios posteriores al evento cerebro-vascular en humanos y modelos animales. En estudios realizados con células sanguíneas extraídas de pacientes isquémicos, tampoco hay claridad en la liberación de estas citocinas por inducción de lipopolisacáridos, puesto que algunos grupos de investigación han reportado que estas células en esas condiciones patológicas liberan altas cantidades de estas interleucinas (Ferrarese et al. 1999). En tanto, otros grupos de investigación describieron exactamente lo contrario, ya que en estas mismas células reportaron niveles bajos para estas ILs.

Uno de los factores atribuibles a las diferencias obtenidas en los resultados de estos estudios en humanos, podrían ser las distintas condiciones medio ambientales a las que han estado expuestos a lo largo de su vida, así como las comorbilidades que pudieran padecer.

### **Receptores de Citocinas**

Actualmente se conoce que las neuronas tienen la capacidad de expresar receptores a interleucinas como el receptor (R) de IL-6, el R-IL-1 y R-FNT, esto es especialmente importante si tomamos en consideración el hecho de que para que puedan desencadenarse los eventos moleculares con funciones proinflamatorias, es necesario la unión de los receptores a sus ligandos para la activación de dichos mecanismos. La IL-6 logra ejercer sus funciones a través de la unión a su receptor que no tiene mecanismos de señalización por sí mismo; sin embargo, al unirse a su ligando conforma homodímeros de gp130 asociados a proteínas quinasas, esto permite la activación del transductor de señal, así como el inicio de la transcripción (Heinrich et al. 2003). A este proceso se la ha denominado como transeñalización y ha sido utilizado para explicar los múltiples efectos de esta citocina en distintos tipos celulares, esto a pesar de la escasa expresión de su receptor (Scheller y Rose et al. 2006).

En un trabajo realizado en el 2016 se planteó el objetivo de determinar los principales predictores moleculares de daño neural a corto plazo en pacientes jóvenes que habían sufrido un ACV isquémico por primera ocasión. Los autores de este trabajo recabaron historias clínicas en donde se detallaban los datos neurológicos y de laboratorio de los individuos sujetos a estudio. El análisis estadístico de los datos recabados hizo notar que las áreas cerebrales isquémicas (determinadas por tomografías computarizadas) así como las concentraciones para la IL-6 fueron predictores importantes para los resultados obtenidos en la escala del National Institute of Health Stroke Score (NIHSS). Este estudio también determinó que la reducción de los niveles de IL-6 podrían estar disminuyendo el daño durante las primeras instancias del accidente cerebrovascular (Fahmi y Elsaid 2016).

## **Interleucina 10 (IL-10)**

Existe una familia de citocinas dentro de la que se incluyen a las ; IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 e IL-26, las cuales pueden ser catalogadas por su conformación estructural como helicoidales, puesto que pertenecen a la clase  $2\alpha$ . De todas las citoquinas antes mencionadas, la IL-10 es considerada la que posee una respuesta más potente en términos de efectos antiinflamatorios, esto ha sido demostrado en todo tipo de enfermedades o etiologías antiinflamatorias y actualmente se conocen algunos de los mecanismos mediante los cuales logra conferir estos efectos y que básicamente están implicados en la limitación y regulación negativa de las respuestas inmunitarias como lo menciona (Wei et al. 2019).

La IL-10 también conocida como factor inhibidor de síntesis de interleucinas, desempeña un rol esencial como modulador negativo de las respuestas inmunitarias inflamatorias, mecanismos comúnmente utilizados por el organismo ante antígenos como los microbianos o incluso aquellos de índole no biológica como el polvo. Una disminución en las concentraciones plasmáticas de IL-10 resulta en el desenvolvimiento espontáneo de enfermedad inflamatoria, consecuencia de una respuesta inmunitaria excesiva. De tal forma que la IL-10 es capaz de ser sintetizada en prácticamente la totalidad de las células inmunitarias entre las que se incluyen las células T, células B, macrófagos y células dendríticas. El correcto funcionamiento de esta interleucina es vital dado que de ella dependerá el mantener un sensible equilibrio entre una inmunidad eficiente que dará como resultado una protección tisular y una respuesta inflamatoria exagerada que traerá consigo consecuencias negativas, entonces, resulta evidente que debe ser estrictamente regulada por el propio sistema inmunológico (Rutz y Ouyang 2016).

## **Interleucina 10 en el Accidente Cerebrovascular**

Se ha reportado que los accidentes cerebrovasculares representan en la actualidad la principal causa de incapacidad permanente en adultos jóvenes, así como la patología con mayor mortalidad a nivel mundial (GBD 2017). Es un síndrome de relevancia prioritaria a nivel clínico debido a su íntima relación con múltiples factores de riesgo tanto de tipo modificable como no modificable. Un claro ejemplo de estos factores de riesgo es la relación existente entre la inflamación crónica, aunque sea de bajo grado, así como la activación de los mecanismos moleculares del sistema inmunológico innato con una mayor incidencia de STROKE (Boehme et al. 2017). Una variada cantidad de genes y moléculas han sido relacionados con las acciones proinflamatorias y antiinflamatorias en la fisiopatología de STROKE, una de las principales moléculas asociadas a la protección celular durante el accidente cerebrovascular isquémico es la IL-10 de acuerdo a (Liesz et al. 2009). Esta interleucina es una citocina con actividad antiinflamatoria al modular la función de muchas células que intervienen en la inmunidad, teniendo la capacidad de suprimir las funciones de macrófagos y células T (Fortis et al. 1996).

Un estudio realizado en 349 pacientes con ingreso reciente posterior a STROKE, tuvo el objetivo de determinar factores asociados al pronóstico del daño por lesión isquémica y determinaron que los pacientes con evento cerebrovascular isquémico progresivo poseían niveles significativamente más altos de IL-10 en comparación a su grupo control (no isquémicos) y se demostró una correlación positiva en pacientes con STROKE isquémico (Rong et al. 2020).

En otro estudio se realizó el transecto de genes asociados a IL-10 hacia Células Madre Mesenquimales (CMM) mediante un vector de virus adenoasociado y estudiaron el área de lesión cerebral, así como las concentraciones de diversas citoquinas proinflamatorias (FNT- $\alpha$  e IL-6) después de una lesión isquémica transitoria inducida. Los autores de este estudio lograron demostrar que una sobreexpresión de la IL-10 mejora significativamente los procesos neuroprotectores desencadenados por las CMM posterior a un evento isquémico focal agudo y manifiestan que la IL-10 es una citocina antiinflamatoria esencial suprimiendo la expresión de

citocinas inflamatorias (IL-1, IL-2, IL-6, FNT- $\alpha$ ). Igualmente, los estudios en medios de cultivo celular *in vitro*, mostraron que la IL-10 reduce la apoptosis de células neurales posterior a la privación de glucosa y oxígeno modulando la expresión de proteínas antiapoptóticas. Así mismo tal y como los autores esperaban, sus resultados manifestaron que las CMM tenían una sobreexpresión de IL-10 disminuyeron el volumen de infarto y logaron una mejoría en la recuperación motora evaluada 72h y 7 días post-isquemia. En las CMM sobreexpresadas de IL-10 evidenciaron los niveles más reducidos de citocinas proinflamatorias en el tejido cerebral. Esta interleucina logró también reducir de forma significativa el daño neural cortical como lo reportó (Nakajima et al. 2017).

En un modelo experimental animal de isquemia fueron evaluados los efectos sobre el daño funcional 14 días posteriores al evento isquémico en ratones con deficiencias en los receptores a la IL-10. En dicho estudio se demostró que los individuos que carecían del receptor a IL-10 poseían tamaños de infarto cerebral significativamente más elevados durante los días 3 y 7 post-isquemia, así como atrofia cerebral exacerbada y un mayor deterioro neurológico en el día 14 de evaluación. En los tejidos cerebrales isquémicos de estos individuos se determinó que al recibir tratamiento intracerebral con IL-10 recombinante se obtenía una regularización positiva de los linfocitos (Piepke et al. 2021).

Otros estudios han enfocado su atención en la correlación que existe entre las concentraciones de la IL-10 en individuos que han sufrido un ataque isquémico y los estadios depresivos que presentan los mismos en semanas posteriores al STROKE. En un trabajo de estas características se ha determinado que 1/3 del total de individuos evaluados poseían niveles más deteriorados de esta citocina 4 semanas después de haber sufrido el evento isquémico, concordantemente este mismo conjunto de individuos presentó mayores volúmenes de infarto así como peor pronóstico de recuperación terapéutica, peores puntajes en los récords de actividades psicomotoras y estadios depresivos marcados en comparación con el grupo control (sujetos no isquémicos) y con los individuos que pese a sufrir el evento isquémico no vieron disminuidos sus concentraciones plasmáticas de IL-10 acorde a (Chi et al. 2021).

## **Medición de suero por Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier en modo reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)**

La Espectroscopía FTIR tiene la capacidad de medir la absorbancia de la radiación infrarroja en las moléculas, esto nos proporciona información que posibilita el análisis de diversos grupos funcionales, tipos de enlace y conformaciones moleculares (Kowalska et al. 2012). Los electrones que conforman las moléculas no se encuentran inertes, se mantienen en una vibración constante con respecto a su posición de equilibrio. Las frecuencias de estas vibraciones varían acorde a diversos factores que las pueden alterar como la longitud y fuerza de sus enlaces, así como su masa atómica. Estas vibraciones moleculares pueden ser estimuladas por los enlaces que absorben la misma frecuencia que su frecuencia natural de vibración, (esto generalmente se logra en la región del mediano infrarrojo). Los estímulos vibracionales generados por la radiación infrarroja generan movimientos moleculares distinguidos en dos categorías: Vibraciones de tensión y flexión (Liang et al. 2016). La primera (tensión) propicia cambios continuos entre la distancia interatómica a lo largo del eje de enlace entre dos átomos. La segunda (flexión) se caracteriza por propiciar modificaciones en el ángulo entre dos enlaces y existen 4 tipos: tijereteo, balanceo, aleteo y torsión. Cualquier compuesto molecular conformado por dos o más átomos pueden sufrir cualquier tipo de vibración y pueden mantener interacciones o acoplamientos vibracionales según (Barraza et al. 2013).

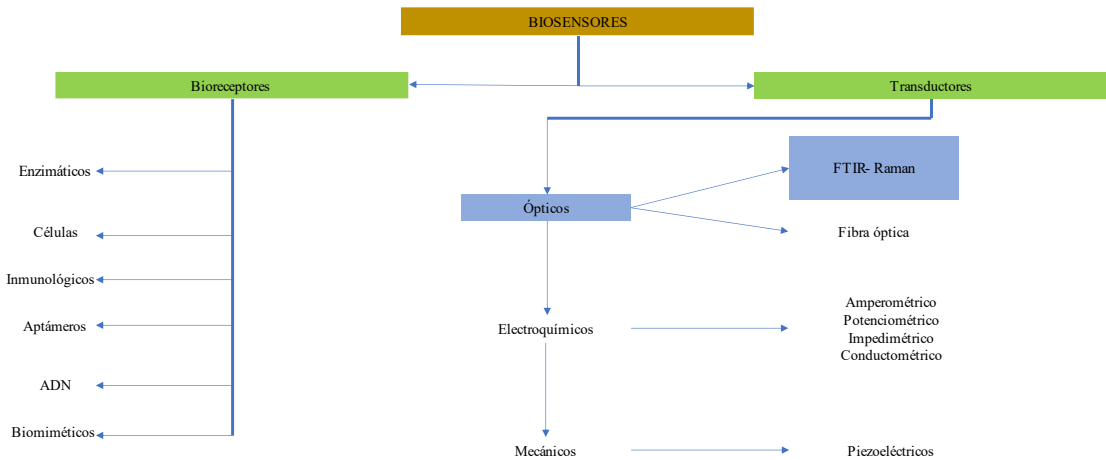
## **Biosensores ópticos (BO)**

Los biosensores según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) son dispositivos que sirven para detectar compuestos y/o moléculas en tejidos, en tiempos recientes también se les ha definido como artefactos analitos al que se le añaden materiales de índole biológico como; anticuerpos, ácidos nucleicos, biomoléculas conjugadas, proteínas entre otros de acuerdo a (Damborský et al. 2016). En resumen, un biosensor se compone de una base sustrato o soporte en el cual mediante reacciones químicas se modifica su arreglo molecular para poder interactuar con el elemento de reconocimiento biológico que se desee medir.

Los biosensores son dispositivos que han adquirido recientemente gran relevancia en el estudio de sistemas biológicos para su aplicación clínica, existen diversos tipos acorde a los materiales con los que son fabricados, sin embargo, lo más comunes son los BO. Este tipo de biosensores ofertan amplias ventajas comparados con las técnicas de detección convencionales, por ejemplo, son capaces de detectar sustancias con alta especificidad y en tiempo real, no necesitan de personal especializado para su uso, son fáciles de fabricar, económicos y no necesitan gran cantidad de muestra para realizar la detección. Debido a estas ventajas los BO han tenido un amplio uso en los últimos años para la investigación en salud pública y medio ambiente, aunque inicialmente eran utilizados principalmente en las industrias biotecnológicas y alimentarias (Lazcka et al. 2007).

# Clasificación de los Biosensores

La clasificación general de los Biosensores puede realizarse acorde a los elementos estructurales que lo componen (bioreceptores y transductores) así como por los métodos de marcaje como se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Clasificación genérica de los distintos tipos de biosensores, divididos en 6 diferentes categorías y los transductores en 3. (Adaptada de Velusamy et al. 2010).



Los biosensores ópticos (BO) son lo que mayor desarrollo han tenido, debido a las ventajas que ofrecen, medición en tiempo real, inmune a ruido electrónico, fácilmente escalables, entre otras (Damborsky P.; Svitel J.; Katrlík J. 2016). En la actualidad, diversos grupos de trabajo han desarrollado dispositivos biosensores ópticos para medir muestras biológicas, por ejemplo (González León et.al en el 2020) desarrollaron un dispositivo biosensor para determinar la presencia de kipeptina en cerebro de rata por medio de espectroscopia de transmisión e infrarroja. En el 2021 (Delgado Macuil et. al.) utilizaron un biosensor basado en fibra de periodo largo para determinar neuropsina 5 (Opn5) en tejido cerebral de rata. Soni et al. presentaron en el 2022 una revisión sobre la aplicación de los biosensores ópticos basados en péptidos para la detección de cáncer en estadios tempranos.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los ACV representan uno de los síndromes de mayor incidencia y mortalidad en todo el mundo, siendo la principal causa de incapacidad permanente en adultos jóvenes y generando grandes pérdidas económicas a los gobiernos, esto debido a que afecta alrededor de 15-17 millones de personas cada año, de las cuales 5 millones fallecen y 5 millones padecerán secuelas de por vida. La importancia de esta patología en la salud pública ha generado la necesidad de realizar investigación científica con diversos abordajes, esto con la finalidad de mitigar el daño generado por la misma, sin embargo, existen múltiples limitantes que no han permitido dilucidar por completo el comportamiento de los procesos moleculares fisiopatológicos que se desencadenan en esta enfermedad, ni la modulación farmacológica de estos con fines neuroprotectores. Por tal motivo en el presente proyecto se propuso el desarrollo de nuevas técnicas experimentales basadas en la espectroscopia de infrarrojo, que permitan mediante la implementación de BO observar la modulación proteica y expresión de IL-6 e IL-10 por acción del BE en el suero de ratas macho con un proceso isquémico a distintos horarios. Los resultados y conclusiones de este estudio tienen un importante enfoque clínico que permite tener un mejor entendimiento en el desarrollo natural de esta enfermedad, así como del efecto neuroprotector del BE.

#### **4. HIPÓTESIS**

Mediante la generación de BO y técnicas de espectroscopía de infrarrojo será posible determinar la modulación proteica, así como la expresión de IL-6 e IL-10 en el suero sanguíneo de ratas macho expuestos a un proceso de ICGA con y sin tratamiento farmacológico de BE.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo General

- Desarrollar biosensores ópticos utilizando como elemento de reconocimiento biológico anticuerpos de (IL-6 e IL-10) y como matriz soporte obleas de silicio cristalino para su determinación en suero de ratas macho expuestos a un proceso de ICGA.

### Objetivos Específicos

- Caracterizar los biosensores generados mediante técnicas espectroscópicas y morfológicas en cada una de las diferentes etapas del ensamblado y detección.
- Instaurar un proceso de ICGA en modelo murino rata, con y sin tratamiento farmacológico de BE.
- Determinar de manera cualitativa la presencia de IL-6 e IL-10 por medio del sistema biosensor óptico desarrollado.
- Determinar por medio de la correlación entre ATR-FTIR en modo macro y micro, tiempos de expresión de proteínas en distintos horarios post-isquemia.
- Generar un protocolo experimental para determinar la presencia de IL-6 e IL-10, en modelo murino isquémico, por medio de un BO basado en anticuerpos como elemento de reconocimiento biológico.

## 6. METODOLOGÍA

### Características de los animales

En el presente estudio se utilizaron 108 ratas macho jóvenes e intactos de la cepa *Sprague Dawley* con un peso de 350gr y 3.5 meses de vida promedio, estos animales fueron obtenidos de la colonia del Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA), CINVESTAV perteneciente a la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx). Los animales se mantuvieron a una temperatura de  $23 \pm 2$  °C, con un ciclo invertido de luz-obscuridad (14:10, la luz se apaga a las 10:00h) y fueron alimentados con nutricubos Purina (Purina, México) y agua a libre acceso. El manejo de los animales y los procedimientos experimentales se apegaron a los protocolos de la ley mexicana de protección animal.

### Grupos experimentales

La n de cada subgrupo experimental es de 6 individuos asignados de la siguiente forma:

Tabla 1. Conglomerados grupales experimentales y sus respectivos subgrupos.

SHAM #1(0h) n=6	Isquémicos #1 (0h) n=6	Isquémicos+BE #1 (0h) n=6
SHAM #2 (2h) n=6	Isquémicos #2 (2h) n=6	Isquémicos+BE #2 (2h) n=6
SHAM #3 (4h) n=6	Isquémicos #3 (4h) n=6	Isquémicos+BE #3 (4h) n=6
SHAM #4 (6h) n=6	Isquémicos #4 (6h) n=6	Isquémicos+BE #4 (6h) n=6
SHAM #5 (12h) n=6	Isquémicos #5 (12h) n=6	Isquémicos+BE #5 (12h) n=6
SHAM #6 (24h) n=6	Isquémicos #6 (24h) n=6	Isquémicos+BE #6 (24h) n=6

## **Asepsia quirúrgica**

Es una técnica de prevención infecciosa que intenta evitar la transmisión de microorganismos patógenos a los tejidos manipulados durante los procesos operatorios, actuando sobre los tejidos mediante productos químicos llamados antisépticos, los cuales logran una condición tisular libre de microorganismos que producen enfermedades o infecciones. La asepsia quirúrgica consiste en varios pasos que involucran al cirujano, el material y equipo, así como el propio paciente.

El primer paso de la asepsia quirúrgica utilizada en nuestro protocolo consistió en la desinfección del área operatoria, instrumental y equipo. Una vez garantizada la inocuidad en la utilización de la mesa quirúrgica, se realizó la preparación del cirujano, comenzando con el lavado de manos con agua y jabón quirúrgico. Una vez concluido el lavado de manos se procedió a la colocación cuidadosa de guantes, cubrebocas y bata al cirujano, siendo muy importante evitar su contaminación durante el acto. Posteriormente se colocó cuidadosamente a las ratas y se les introdujo en la cámara anestésica con ventilación al 60% de Sevoflurano para conseguir que el animal entrara en un plano pre-quirúrgico, esto sirve para facilitar la manipulación del paciente, de esta forma se logra disminuir su estrés y la posibilidad de daño físico. Con el animal sedado se hizo una tricotomía con máquina en las regiones anatómicas de nuca y cuello para la electrocauterización de arterias vertebrales o la exposición de arterias carótidas comunes respectivamente. Acto seguido se procedió al lavado del área rasurada y su periferia con agua y jabón, posteriormente con Benzalconio y finalmente se retiró el exceso de líquido con gasas. Una vez concluida la asepsia quirúrgica se posiciona al animal y se procede a la realización de las distintas técnicas quirúrgicas que se describen enseguida.



**Figura 2.** *Equipo y material quirúrgico necesarios para la realización del protocolo isquémico.*

### **Electrocauterización de arterias vertebrales**

La primera cirugía preparatoria que se realizó es la electrocauterización de arterias vertebrales. En esta cirugía se ocluyó de forma permanente el flujo sanguíneo proyectado por estas arterias sin que se indujera un proceso isquémico propiamente. Para realizar este procedimiento el animal fue colocado en una posición decúbito ventral y fijado por el tren superior con ayuda de un aparato estereotáxico. Acto seguido fue realizada una incisión con hoja y mango de bisturí sobre la línea media dorsal con una longitud de 1cm aproximadamente a nivel de la cruz. Inmediatamente después con un separador tisular mecánico (blefaróstato) y pinzas curvas de exploración, se hizo la desunión de los músculos esplénicos cervicales y se localizó el foramen vertebral. Utilizando un microscopio quirúrgico, así como un lápiz de electrocauterio, se cauterizaron las arterias vertebrales. Por último, se realizó una sutura con hilo catgut crómico 000 haciendo puntos simples continuos. Los animales se mantuvieron en recuperación 15 días antes de continuar con la segunda cirugía preparatoria

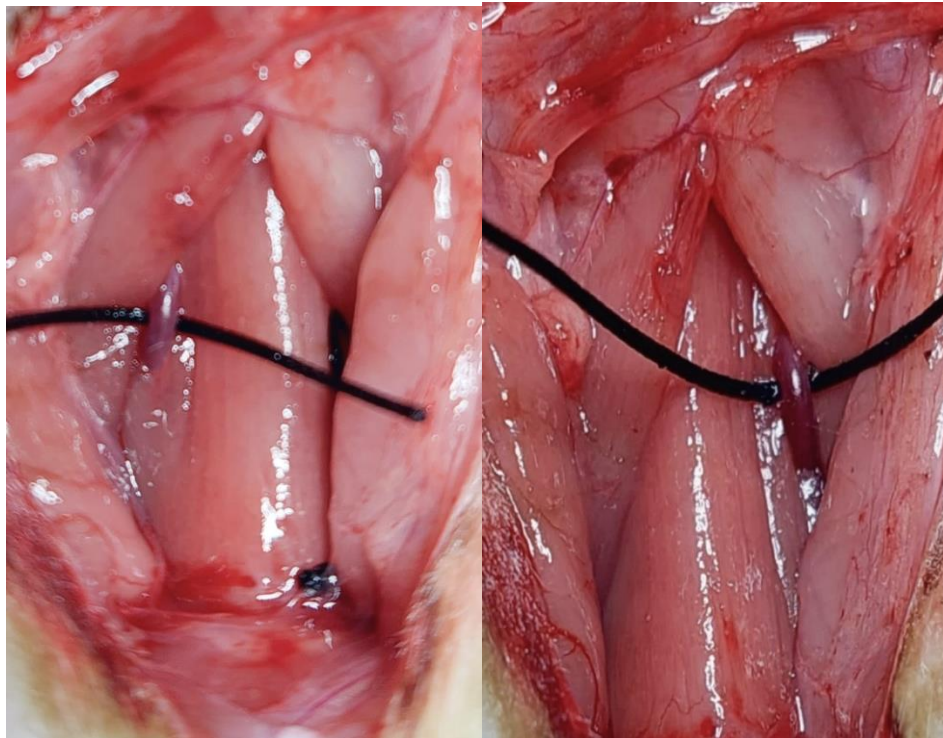


**Figura 3.** *Cirugía de electrocauterización de arterias vertebrales*



## Exposición de arterias carótidas comunes

La exposición de arterias carótidas comunes fue la segunda cirugía preparatoria que se realizó previo al proceso isquémico. Esta cirugía se practicó con la finalidad de localizar y exaltar las arterias carótidas comunes para ser más fácil su ubicación, retracción y oclusión durante el evento isquémico. En primera instancia se procedió a colocar al animal decúbito dorsal y se realizó una incisión en piel de 1.5 cm aproximadamente con hoja y mango de bisturí a través de la línea media ventral a nivel del canal vertebral cervical. Posteriormente con micro-pinzas de exploración y haciendo uso de un microscopio quirúrgico se localizaron los vasos de interés y fueron separados cuidadosamente del nervio vago. Una vez que se liberó el vaso, este se abrazó sin ser anudado con sutura no absorbible tipo nylon 000 de forma bilateral. Finalmente, se realizó una sutura en piel con puntos simples continuos y como material de sutura seda negra 000.



**Figura 4.** Cirugía de exposición de arterias carótidas comunes bilateral, se aprecia el vaso ya separado del nervio vago y abrazado con un hilo de sutura no absorbible.

## **Isquemia Cerebral Global Aguda (ICGA)**

Posteriormente a la realización de las 2 cirugías preparatorias (electrocauterización de arterias vertebrales y exposición de arterias carótidas comunes) se prosiguió a ejecutar el protocolo isquémico. Este protocolo tiene como propósito inducir un déficit en el suministro sanguíneo al cerebro por oclusión de los principales vasos que lo irrigan asemejando los ACV que se presenta en humanos.

El proceso inició con la inducción anestésica del animal a plano pre-quirúrgico mediante una exposición inhalatoria de Sevoflurano al 60%. De forma inmediata se colocó al animal decúbito dorsal para retirar la sutura de la cirugía anterior. Con auxilio de micro-pinzas para exploración se expusieron las arterias carótidas comunes por retracción de los hilos posicionados previamente. Al retraer cada uno de los hilos, fueron colocados 4 clips quirúrgicos en posiciones anteriores y posteriores para ocluir las arterias carótidas comunes, que sumado al proceso de electrocauterización ocluyó los cuatro vasos. Con la colocación de los 4 clips inicia propiamente el proceso de isquemia cerebral global. Quince minutos después de haber colocado los clips quirúrgicos se hizo el retiro de los mismos, y si al menos 20 minutos posteriores a la reperusión el animal permanecía sin recuperar el reflejo de enderezamiento ni poseer movimientos voluntarios, entonces fue considerado para el estudio. Otros factores a considerar para ingresar o descartar a los animales en el protocolo de investigación, fueron la pérdida de peso no mayor a 30 gr entre cada una de las cirugías y la manifestación clínica de los signos patognomónicos isquémicos, como la piloerección, asimetría de miembros torácicos y pélvicos, hiperextensión o hipercontracción falángica, movimientos rotatorios de cauda, ataxia, espasmos musculares, movimientos de acicalamiento, respiración abdominal, movimientos masticatorios o de pedaleo, entre otros.



**Figura 5.** Signos clínicos patognomónicos isquémicos en rata hembra de la cepa Sprague Dawley. En esta figura se puede apreciar algunos signos clínicos propios de la ICGA como lo son: la torsión de columna, piloerección, asimetría de miembros torácicos y pélvicos.

## Obtención de las muestras

Una vez que los animales cumplieron con los requisitos para ser considerados dentro del protocolo isquémico como lo son los signos patognomónicos y el tiempo de inconsciencia post-isquemia no menor a 20 minutos; los individuos fueron sometidos a eutanasia por decapitación con ayuda de una guillotina manual a diferentes tiempos: 0, 2, 4, 6, 12 y 24h post-isquemia e inmediatamente se obtuvieron muestras del suero sanguíneo mismos que se almacenaron en tubos EDTA y se dejaron reposar por un lapso de 1 hora para que se formara el coágulo sanguíneo y se separara del suero, mismo que fue extraído con ayuda de micropipetas y centrifugado durante 15min/3.000 r.p.m. para decantar la porción sólida y proceder a extraer el suero purificado que fue ultracongelado hasta su utilización.

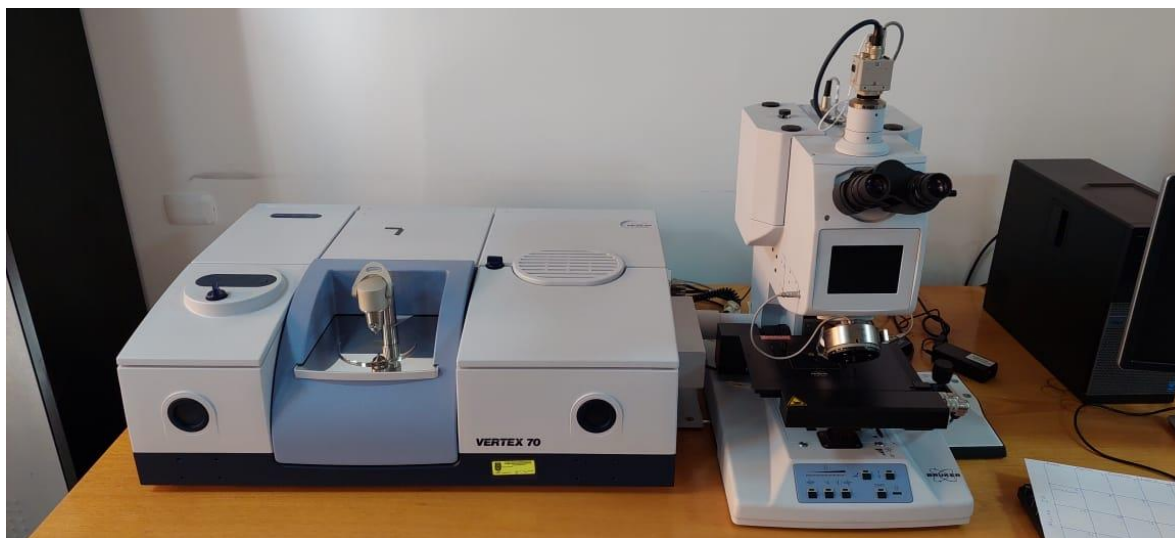


**Figura 6.** *Muestra sanguínea centrifugada donde se puede apreciar la porción sólida separada del suero que fue utilizado para las mediciones.*

## Medición de suero por FTIR

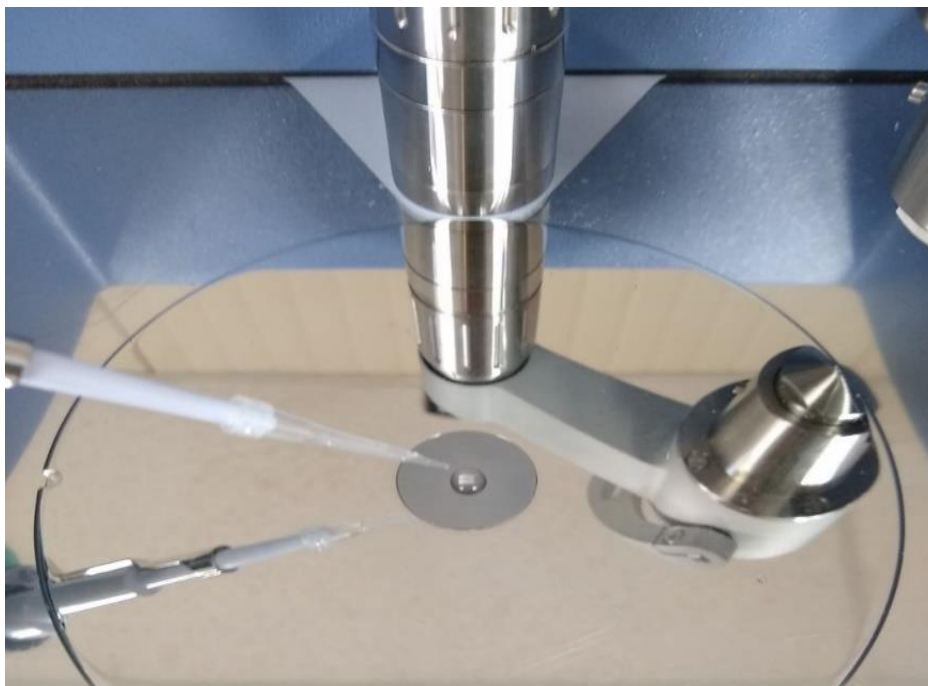
Para realizar las mediciones directas del suero obtenido de los sujetos de experimentación, se utilizó un Espectrómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) marca Bruker Vertex 70 de fabricación alemana en modo Reflexión Total Atenuada (ATR). Este espectrómetro fue equipado con el accesorio MIRacle ATR y una placa de muestreo con cristal de diamante de Pike Technologies (*Wisconsin, USA*).

Para la caracterización de las distintas fases del armado del biosensor se utilizó el espectrómetro antes descrito con el que se aplicaron dos técnicas de medición, uno en modo ATR y otro en micro reflectancia, este último con ayuda de un microscopio Hyperion 3000 en la zona del mediano infrarrojo ( $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) (Figura 7), realizando escaneos en todas las fases del proceso de construcción del biosensor tomando 60 mediciones de la línea base y 120 escaneos de la cada muestra. La región de medición fue establecida en los rangos de la huella dactilar biológica debido a que es la región utilizada para estudiar las vibraciones moleculares de los enlaces en moléculas de interés biológico.



**Figura 7.** Espectrómetro FTIR (izquierda) conectado al microscopio Hyperion 3000 (derecha).

Las alícuotas de 200 $\mu$ l de los sueros fueron descongelados de forma gradual y una vez que se encontraban completamente líquidos inmediatamente se procedió a su agitación con ayuda de un (*Agitador Vortex-Genie II Mixer SI-0236*) a velocidad baja durante 10 segundos (este paso se repitió por cada fracción medida de cada muestra), esto con la intención de que la muestra se encontrara completamente homogénea, posteriormente con ayuda de una micropipeta calibrada se extrajeron 15 $\mu$ l de la muestra y se depositó en la superficie del cristal detector, las muestras eran medidas en 120 ocasiones durante un lapso de 2 minutos, por cada muestra se repitió este procedimiento en 10 ocasiones para obtener el espectro promedio de estas, a fin de garantizar la robustez y fiabilidad de los datos obtenidos. En total por cada individuo se obtuvieron 1,200 mediciones, por cada subgrupo 7,200, por cada conglomerado grupal 43,200 y finalmente por el total de los 108 individuos que se utilizaron en este estudio se obtuvieron 129,600 mediciones lo que garantiza una robustez de los datos y por ende una mayor fiabilidad de los resultados y su interpretación.



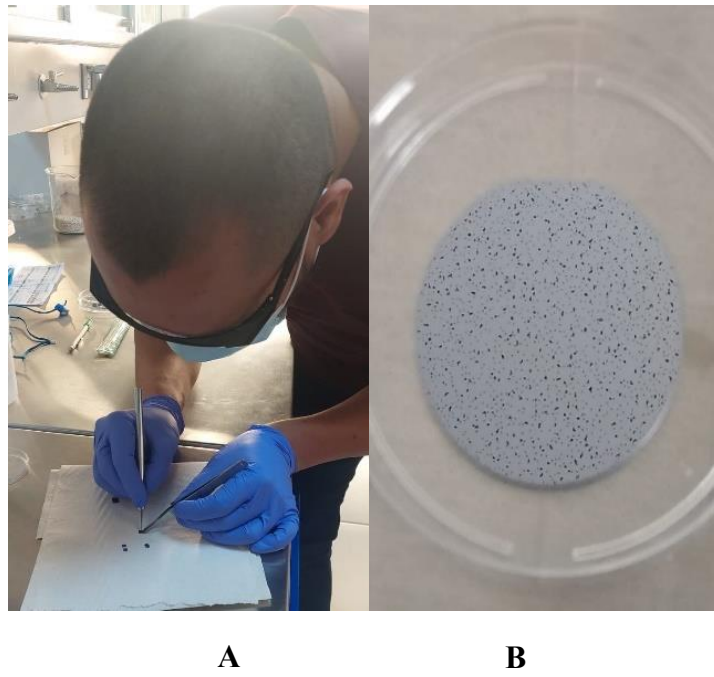
**Figura 8.** *Deposición en el cristal de 15 $\mu$ l de muestra de suero sanguíneo para su medición.*

## **Construcción del biosensor**

Los biosensores fueron elaborados a partir de obleas de silicio cristalino de 2 pulgadas de diámetro con 250 micras de espesor, pulidas de un solo lado. Las obleas fueron cortadas en cuadrados de 0.5x0.5 cm aproximadamente. Los pasos para su fabricación se describen a continuación.

### **FASE 1: Corte y limpieza de los soportes:**

La primera fase para la generación de los biosensores consistió en seccionar la oblea de silicio con ayuda de un cortador de vidrio manual a fin de obtener soportes homogéneos en tamaño. Es importante no dañar la superficie de los soportes durante el corte ni manipular los mismos sin guantes para mantener su integridad y pulcritud. Una vez que se cortaron y seleccionaron los soportes, se prosiguió a colocarlos de forma vertical sobre una caja Coplin de vidrio para ser enjuagados durante 5 ocasiones con agua desionizada. Inmediatamente después fueron secados a través del flujo continuo de nitrógeno y dispuestos en otra caja Coplin de vidrio seca con las caras pulidas hacia la porción externa, es decir, hacia arriba, esto con la finalidad de evitar su daño o contaminación.



**Figura 9.** Podemos apreciar el proceso de corte manual de los soportes que servirán para el armado del biosensor obtenidos de una oblea de silicio cristalino.

- A) Proceso de corte manual de los soportes para el armado del biosensor.*
- B) Oblea de silicio cristalino de la cual son obtenidos los soportes.*



## **FASE 2: Hidroxilación de los soportes:**

El proceso de hidroxilación comprende la segunda fase para la conformación de los biosensores y tiene como función agregar grupos hidroxilo que son afines a los grupos silano a la superficie de los soportes. En esta etapa se colocó una caja de vidrio Coplin grande dentro de una campana extractora y se preparó una solución compuesta de 15 ml de metanol, 15 ml de agua desionizada y 0.840 gr de Hidróxido de Potasio (HP). Se tuvo que agitar levemente la solución para asegurar la disolución de las cápsulas de HP. Posteriormente con unas pinzas de disección de punta fina y curva se sostuvieron los soportes de las porciones laterales y cuidadosamente fueron colocados equidistantemente dentro de la caja Coplin con la solución ya preparada. Se debe tener especial cuidado para evitar que los soportes queden juntos o encimados y es muy importante verificar que la cara pulida del soporte sea la que se encuentre expuesta a la solución. Se tapó la caja Coplin y se dejaron interactuar a los soportes con la solución durante 1h. Es importante el uso de mascarilla para evitar la inhalación de los gases desprendidos.

Al concluir el tiempo de interacción de la solución con los soportes, estos fueron enjuagados 3 veces con agua desionizada e inmediatamente secados bajo el flujo de nitrógeno y colocados con la cara pulida expuesta en otra caja Coplin grande de vidrio seca y limpia.



**Figura 10.** Soportes dentro de la caja Coplin con la solución de HP, metanol y H<sub>2</sub>O desionizada.

### **FASE 3: Funcionalización por fase gaseosa:**

Con la intención de evitar que los soportes se contaminaran o perdieran las propiedades químicas adquiridas durante la hidroxilación, se realizó de manera inmediata la tercera fase para el armado del biosensor que es la funcionalización gaseosa. Para la ejecución de esta fase se utilizó el método descrito por Wang et al (2008). Esta fase tuvo la función de enlazar los grupos metilo a los grupos silano de los soportes dejando los grupos amino expuestos para la inmovilización con el anticuerpo.

Es necesario que 45 minutos antes de finalizar la fase de hidroxilación se precaliente una mufla a 140 °C, dentro de la mufla colocamos un frasco de vidrio con rosca para atemperar gradualmente los materiales. Los soportes (máximo 6) fueron colocados con la cara expuesta en cajas de aluminio e introducidos hasta el fondo del frasco de vidrio. Con auxilio de una micropipeta se cargaron y vertieron en la porción frontal del frasco 100µl de 3-Aminopropiltrimetoxisilano (3-APTMS) evitando verterlo directamente sobre los soportes.

Cuidadosamente se cerró el frasco y la mufla dejándolos interactuar durante 24h. Al concluir el tiempo referido se extrajo el frasco de la mufla utilizando guantes de carnaza y se trasladó a una campana extractora donde se desenroscó el frasco y se dejaron escapar los vapores que emanan del mismo. Una vez que el frasco redujo su temperatura para que pudiera ser manipulado, se retiró la caja de aluminio con los soportes y se transfirieron a una caja de vidrio seca y limpia para su almacenamiento.

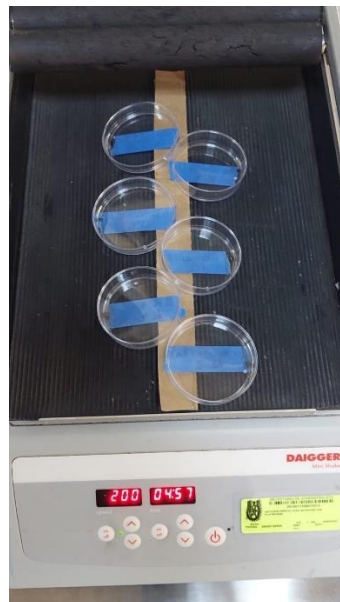


Figura 11. Imagen de la mufla con el frasco de vidrio donde han sido introducidos los soportes en cajas de aluminio con la cara expuesta.

#### FASE 4 Activación

Los compuestos de reticulación y marcaje activados por los esteres de N-hydroxisuccinamida (NHS) que a su vez son una clase de grupos reactivos constituidos por la activación de moléculas de carboxilato por N-3-Dimetilaminopropil (EDC), reaccionan con aminas primarias en condiciones de moderada alcalinidad para constituir enlaces amidas estables. Es así que el EDC posibilita que los péptidos y proteínas se conjuguen fácilmente ya sea entre sí o con cualquier otro compuesto aún sea sólido, que contenga grupos amino o carboxilo.

Para la ejecución de esta cuarta fase se mezclaron 5mg de NHS y 1ml de buffer de fosfato (PBS) con pH 7.2. Posteriormente se adicionaron 5mg de EDC y 1ml de PBS, para conjugar ambas soluciones. Posteriormente se colocaron los soportes en cajas Petri en las que se agregaron en cada una 100ml de la solución resultante de la mezcla de EDC y NHS, estas cajas fueron colocadas en un agitador (*thermo scientific*) a 200 r.p.m. durante 1h, una vez concluidos los 60 minutos, los soportes fueron retirados, cuidadosamente enjuagados con PBS y secados inmediatamente mediante el flujo de nitrógeno.



**Figura 12.** Etapa de activación, se observan las cajas Petri con la solución compuesta de NHS y EDC sobre el agitador interactuando con los soportes.

## FASE 5: Inmovilización del anticuerpo

Para la realización de esta fase del armado del biosensor, se utilizaron cajas Petri de 4 pulgadas y un agitador (*mini shaker*) programado a 100 r.p.m. En las cajas Petri se colocaron 5ml de la solución del anticuerpo adicionando 95ml de PBS con (pH 7.4) y se mezcló la solución 10 veces con una micropipeta calibrada a 100ml. Posteriormente se colocaron las cajas Petri sobre el agitador y dentro de ellas se posicionaron los soportes con la cara pulida expuesta. Con la micropipeta se vertió la solución sobre toda la superficie de los soportes dejándolos en agitación durante 1 hora. Una vez culminados los 60 minutos de interacción se retiraron los soportes mismos que se colocaron en una toalla absorbente con la cara pulida expuesta para retirar el exceso de solución e inmediatamente se pusieron a interaccionar con la muestra.

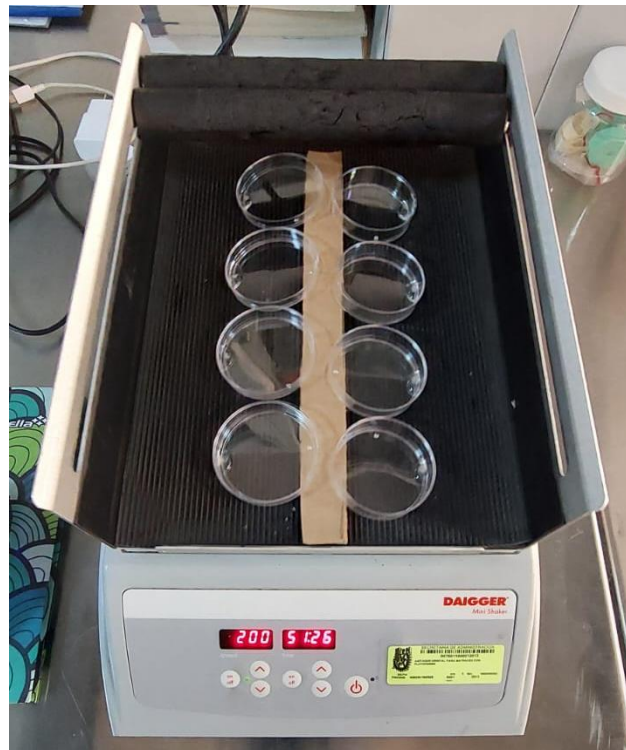
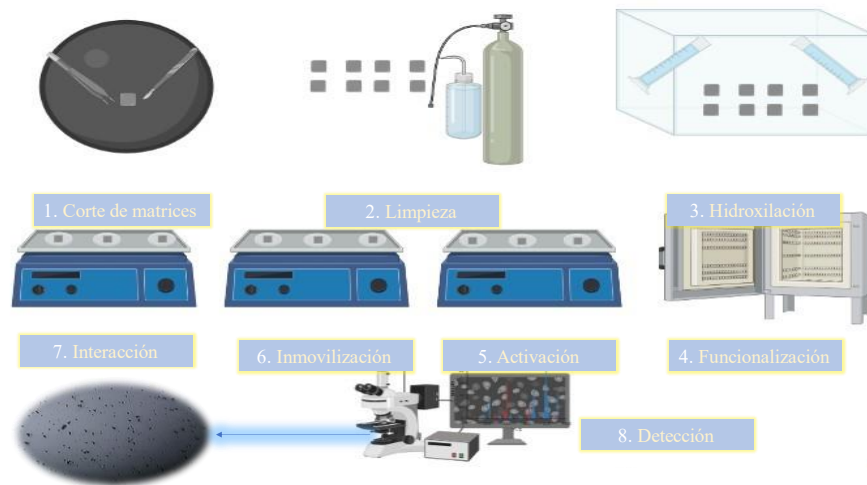


Figura 13. Esquema de proceso de inmovilización del anticuerpo.

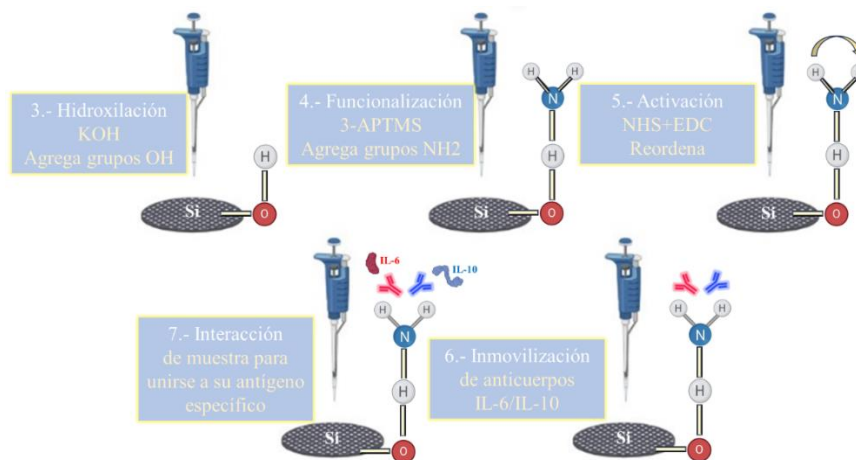
## FASE 6: Interacción del biosensor con suero sanguíneo

Posterior a la fase de inmovilización del anticuerpo se procedió a la interacción del biosensor ya ensamblado con las muestras sanguíneas obtenidas de los individuos de experimentación. Para esta fase se repitió el procedimiento de la fase previa con la particularidad de que ahora se colocó el suero sanguíneo sobre la cara pulida de los soportes y se dejaron en agitación durante 15 minutos. Posteriormente los soportes fueron enjuagados con solución de PBS y secados inmediatamente mediante el flujo de nitrógeno.

A



B



**Figura 14.** **A** Representación esquemática de las distintas fases del armado del biosensor y **B** muestra las modificaciones moleculares que se generan en la superficie de los mismos.

## **Diseño experimental**

Los animales pertenecientes a los grupos (Sham 0,2,4,6,12, y 24h) fueron individuos que recibieron las dos cirugías preparatorias (electrocauterización de arterias vertebrales y exposición de arterias carótidas comunes) pero no fueron expuestos al proceso isquémico.

Los animales pertenecientes a los grupos (Isquémicos 0,2,4,6,12 y 24h) fueron individuos que recibieron las dos cirugías preparatorias y el proceso isquémico pero ningún tratamiento farmacológico.

Los animales pertenecientes a los grupos (Isquémicos+BE 0,2,4,6,12 y 24h) fueron individuos que recibieron las dos cirugías preparatorias y un tratamiento farmacológico de BE vía intraperitoneal a dosis de (4mg/kg) 30 minutos antes de ingresar al protocolo isquémico.

### ***Experimento 1.*** Expresión temporal de las IL-6 e IL-10 después de un episodio de ICGA.

El protocolo para este experimento consiste en la inducción de la ICGA y la obtención de muestras de suero sanguíneo a los tiempos mencionados previamente. Posteriormente se implementaron BO utilizando estándares de referencia para observar el comportamiento espectral por medio de las técnicas de espectroscopía de macro y micro infrarrojo. Una vez que los biosensores fueron optimizados y caracterizados, se procedió a determinar la expresión de la IL-6 e IL-10 en las muestras de suero sanguíneo de los animales que fueron sometidos a ICGA

**Experimento 2.** Efecto de la administración del BE sobre la expresión de las IL-6 e IL-10 después de un episodio de ICGA.

El protocolo para este experimento consiste en la inducción de la ICGA y la obtención de muestras de suero sanguíneo a los horarios mencionados previamente. Posteriormente las muestras fueron procesadas por las técnicas de espectroscopía de macro y micro infrarrojo. Una vez que los biosensores fueron optimizados y caracterizados, se procedió a la detección de la IL-6 e IL-10 en las muestras de suero sanguíneo de los animales que fueron sometidos a ICGA. El tratamiento con BE (*4 mg/kg*) se administró 30 minutos antes de la isquemia por vía interperitoneal de acuerdo con el protocolo de (Wappler et al. 2010).

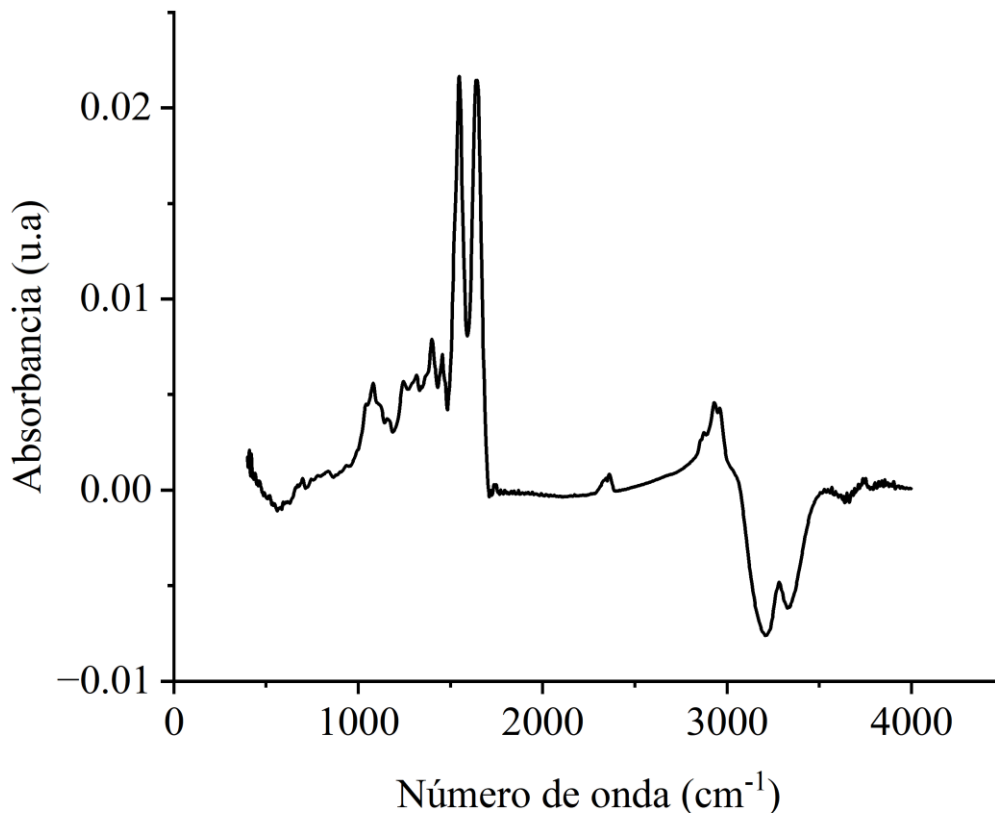
### **Asepsia, cirugías preparatorias e inducción de la isquemia cerebral global**

Los animales fueron sometidos al proceso de ICGA de acuerdo a la metodología propuesta por (Pulsinelli y Brierley, 1979), la cual consiste en la oclusión de las cuatro arterias principales que irrigan el cerebro (arterias vertebrales y arterias carótidas) mediante la implementación de dos cirugías preparatorias, denominadas electrocauterización de arterias vertebrales y exposición de arterias carótidas comunes. Estos procedimientos se realizaron bajo una asepsia rigurosa, variando únicamente el área anatómica según correspondió en cada caso, optimizando la recuperación de los animales, dicho proceso se describe a continuación.



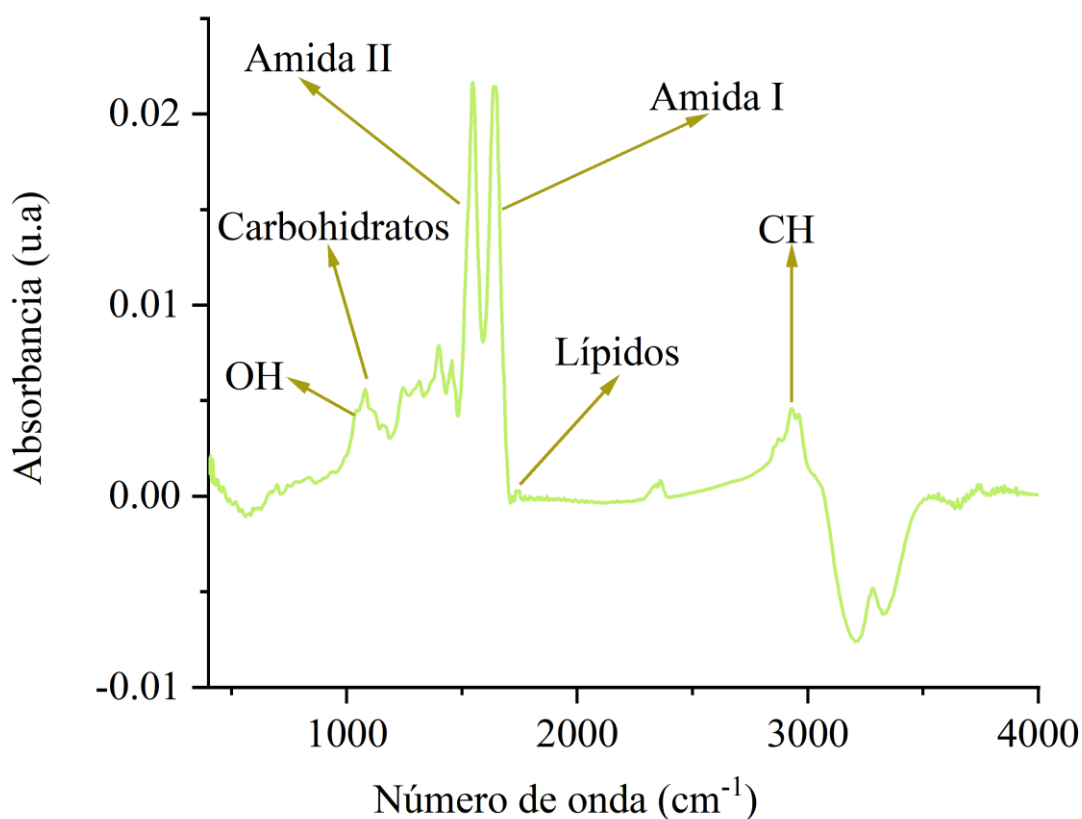
## 7. RESULTADOS

En la figura 15, se presenta el espectro de infrarrojo característico del suero sanguíneo de las muestras de animales sanos e intactos tomada en la región del mediano infrarrojo (400-4000  $\text{cm}^{-1}$ ). El espectro no sufrió ningún tratamiento matemático o de suavizado para mejorarlo, por lo cual, a este tipo de espectros que son presentados tal cual fueron obtenidos del programa del equipo se les llama espectros crudos. Para lograr observar con mayor detalle las contribuciones de los componentes no acuosos del medio, se decidió tomar como línea base el espectro de agua desionizada, por tal motivo el espectro de infrarrojo presenta dos valles en la región por arriba de los 3000  $\text{cm}^{-1}$ .



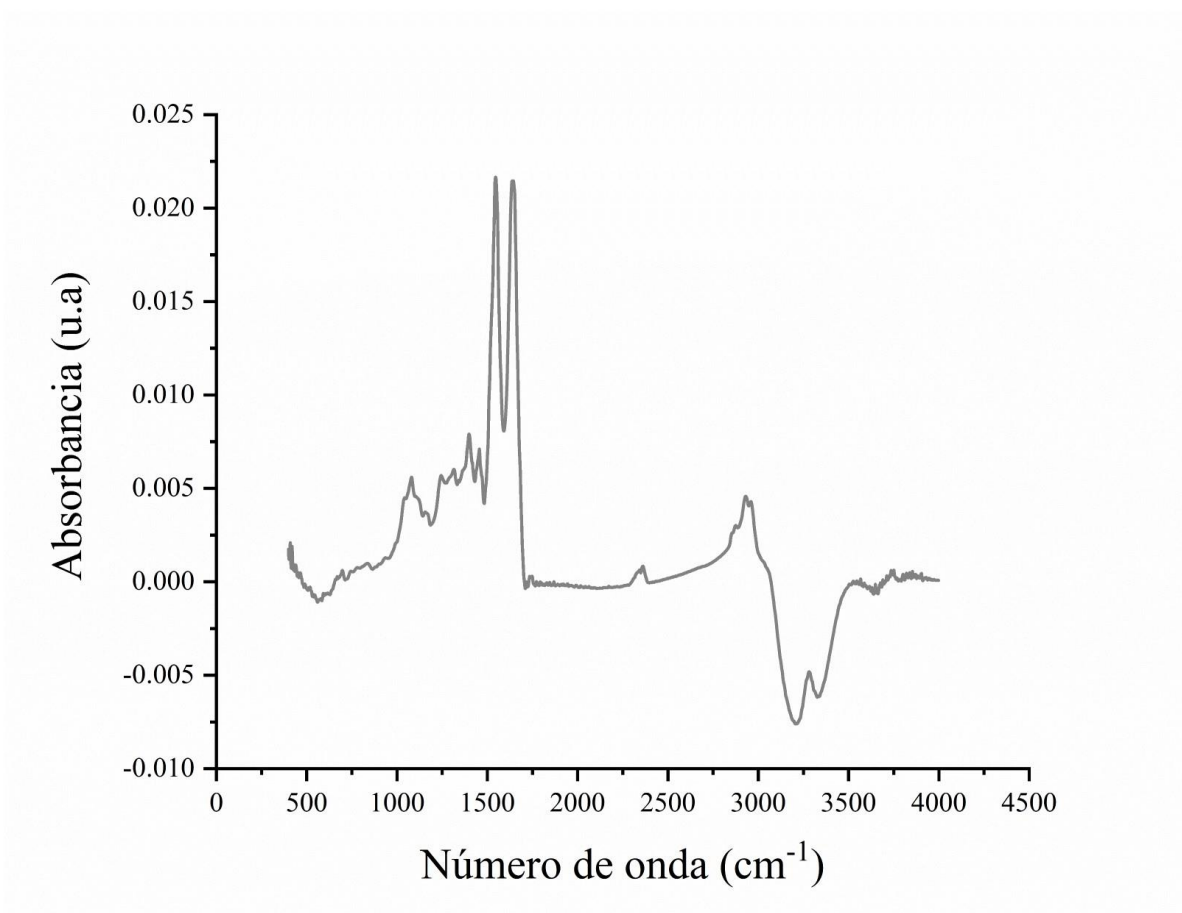
**Figura 15.** Espectro de infrarrojo de los datos crudos del promedio obtenido de mediciones mediante ATR-FTIR en el suero sanguíneo de animales sanos e intactos.

En la figura 16 se destacan las bandas asociadas a los enlaces que son de interés en el estudio de muestras biológicas. La región entre ( $950\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ) corresponde a las vibraciones de los enlaces C-O, dos bandas muy intensas se observan entre los ( $1500$  y los  $1700\text{ cm}^{-1}$ ) las cuales están asociadas a los grupos funcionales Amida I y II de las proteínas; una banda poco intensa pero muy importante es la de los lípidos, la cual se encuentra en  $1740\text{ cm}^{-1}$ , finalmente la banda entre los ( $2800$  y los  $3000\text{ cm}^{-1}$ ), está relacionada a las vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico de los enlaces C-H.

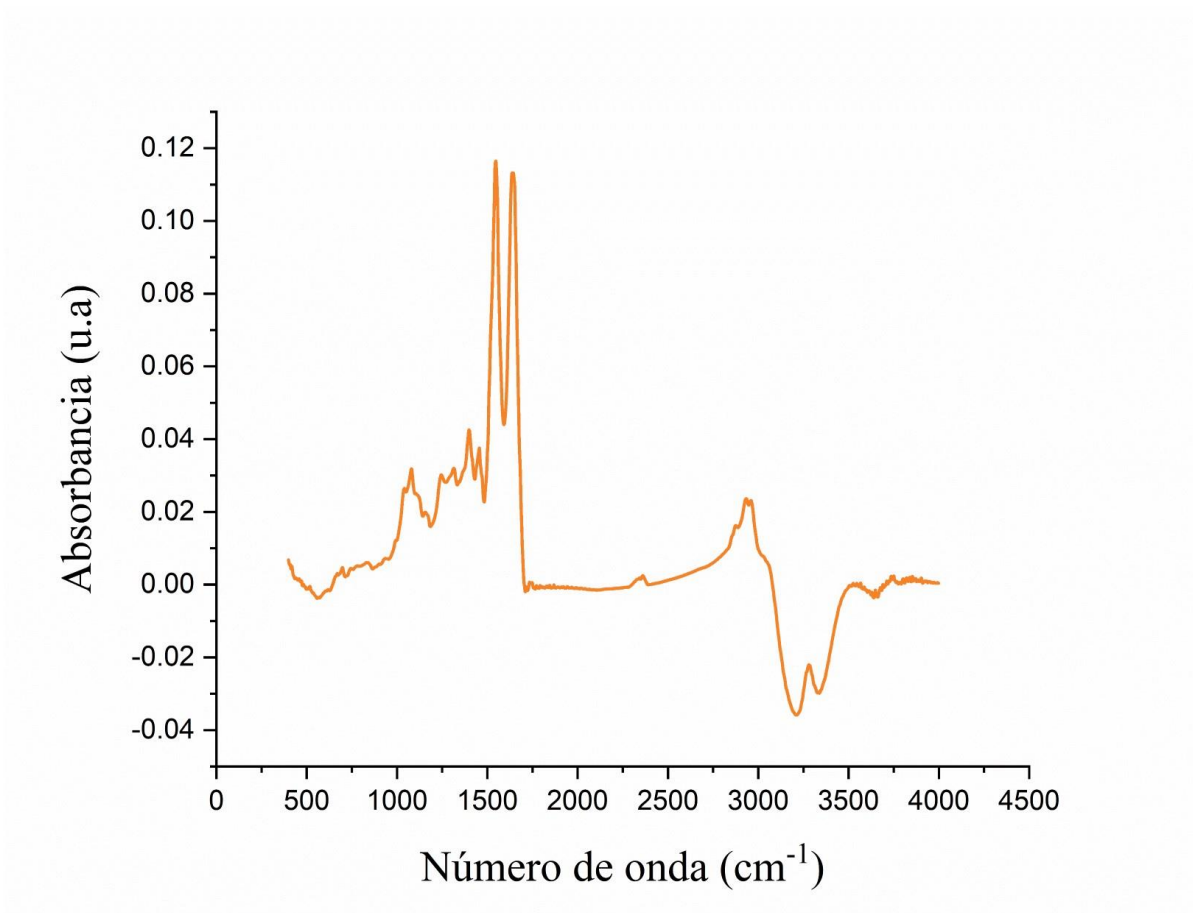


**Figura 16.** En esta figura podemos observar un espectro en crudo destacando los rangos de onda que son de particular interés biológico por su asociación con biomoléculas.

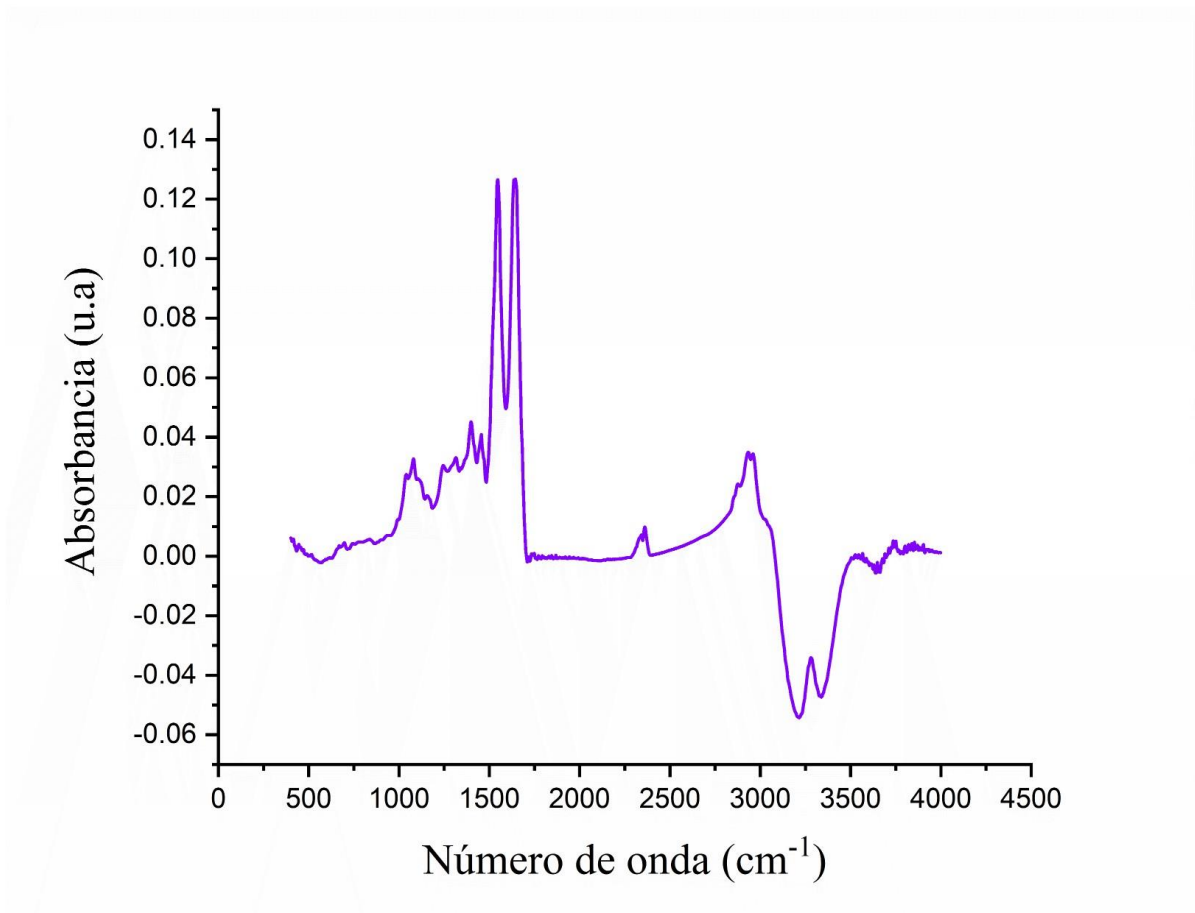
En la anterior imagen en el eje x se muestra la región de la huella biológica (400-4000  $\text{cm}^{-1}$ ), en el eje y se observa la intensidad de la absorbancia representada en u.a. De izquierda a derecha se señala donde se encuentran los enlaces O-H, Carbohidratos, grupos funcionales Amida II, Amida I, Lípidos y enlaces C-H. Las figuras 17,18 y 19 ilustran la respuesta espectral de las muestras obtenidas de los diferentes grupos, las cuales corresponden a los espectros de suero sanguíneo de animales Sham, Isquémicos e Isquémicos+BE, respectivamente. Estas figuras muestran las regiones señaladas en la figura 16.



**Figura 17.** Se muestra el espectro en crudo medio obtenido a través de ATR-FTIR por mediciones del suero sanguíneo de animales Sham en todos los horarios post-isquemia (0,2,4,6,12 y 24h).



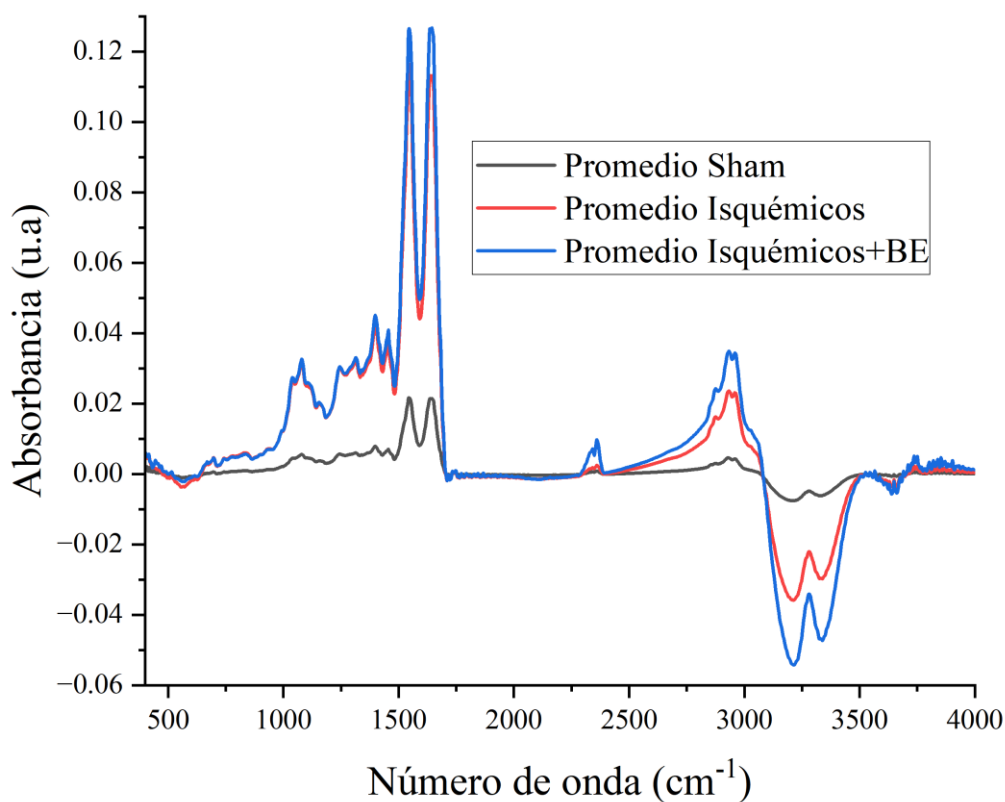
**Figura 18.** Se muestra el espectro en crudo medio obtenido a través de ATR-FTIR por mediciones del suero sanguíneo de animales isquémicos en todos los horarios post-isquemia (0,2,4,6,12 y 24h).



**Figura 19.** Se muestra el espectro en crudo medio obtenido a través de ATR-FTIR por mediciones del suero sanguíneo de animales isquémicos+BE en todos los horarios post-isquemia (0,2,4,6,12 y 24h).

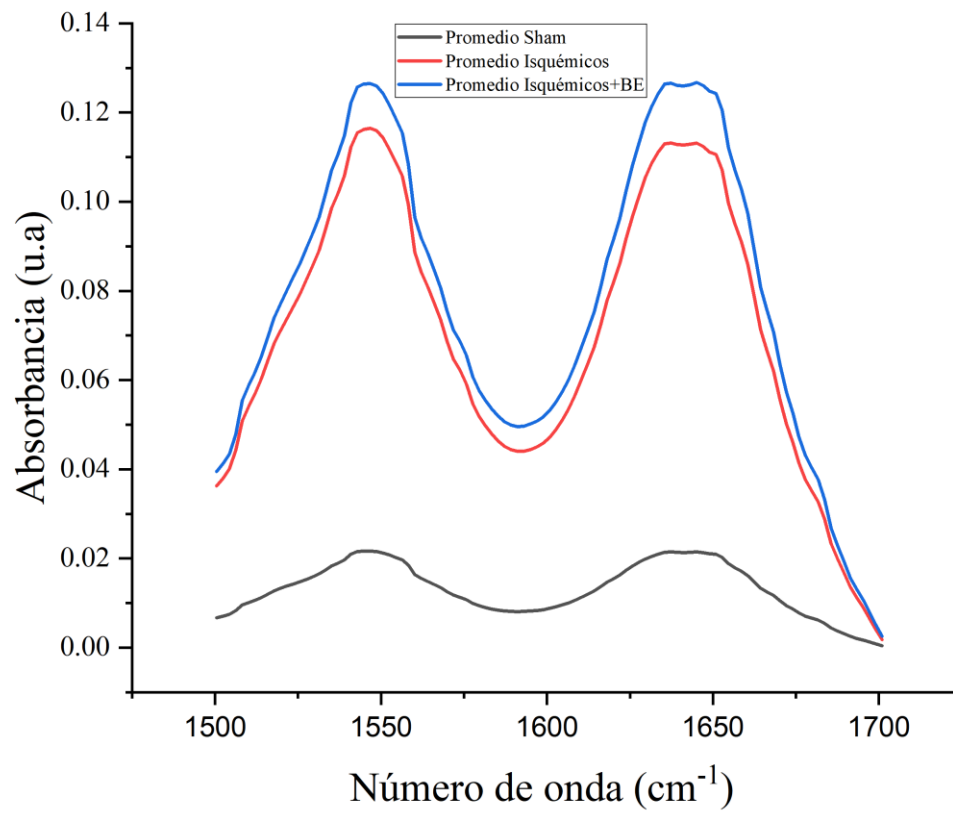
En el eje x de las figuras 17, 18 y 19 se muestra la región de la huella biológica (400-4000 cm<sup>-1</sup>), en el eje y se observa la intensidad de absorbancia representada en u.a.

En la figura 20 se presenta una comparativa de los espectros medios superpuestos obtenidos de los distintos grupos (Sham, Isquémicos e Isquémicos+BE). Como se puede observar, los tres grupos comparados mantienen el mismo patrón; sin embargo, la región proteica del grupo Isquémicos+BE es la más alta seguida de Isquémicos y la más baja es la de los animales Sham.

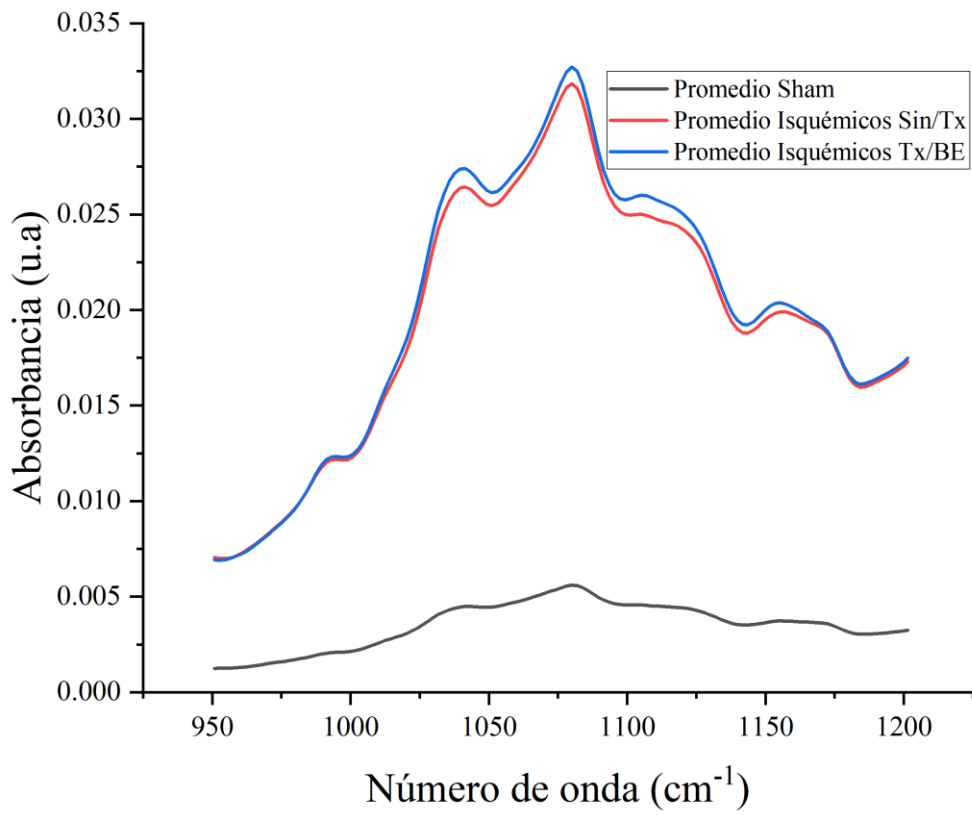


**Figura 20.** Espectros medios obtenidos mediante ATR-FTIR en muestras de suero de animales sham (línea negra), isquémicos (línea roja) e isquémicos+BE (línea azul), en todos los horarios post-isquemia (0,2,4,6,12 y 24h). Región huella biológica.

Las figuras 21, 22 y 23 muestran las regiones de interés para este estudio en un acercamiento. Estas regiones corresponden a las bandas situadas entre (1500-1700 cm<sup>-1</sup>) ya que son las correspondientes a los grupos funcionales Amida II y I situadas entre (1500-1600 cm<sup>-1</sup> y 1600-1700 cm<sup>-1</sup>), respectivamente. La figura 21 muestra como la respuesta espectral de los tres grupos presentan diferencias en el comportamiento espectral siendo muy notables los cambios en la intensidad de absorbancia.

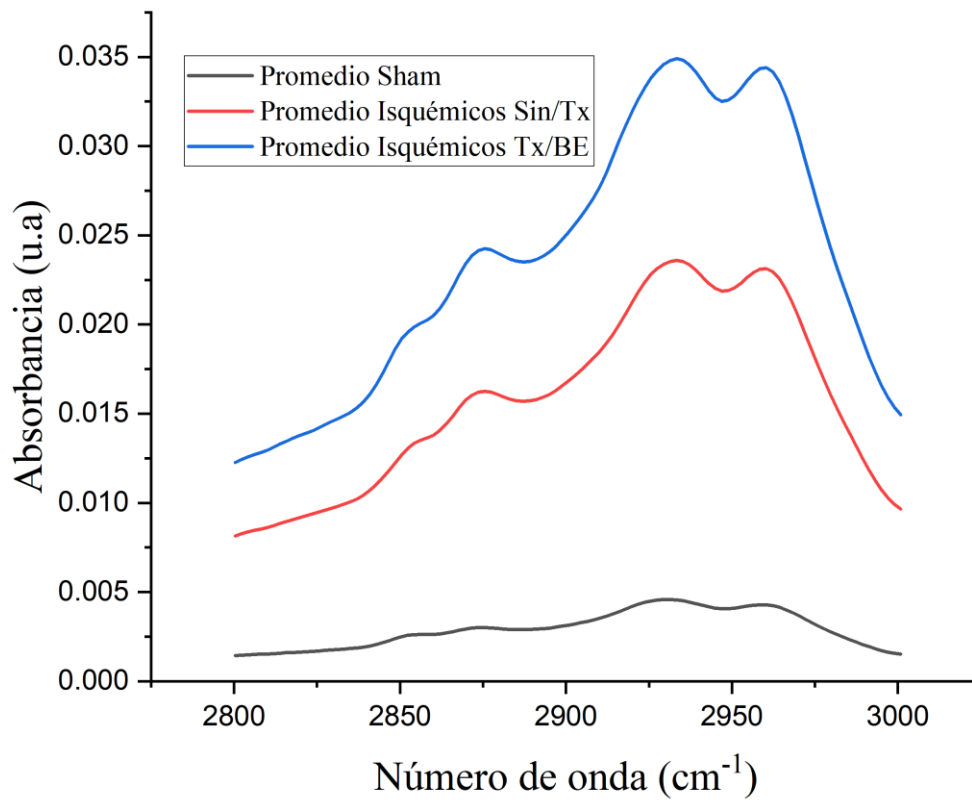


**Figura 21.** Ploteos de los espectros medios obtenidos mediante ATR-FTIR en muestras de suero de animales Sham (línea negra), Isquémicos (línea roja) e Isquémicos+BE (línea azul), en todos los horarios post-isquemia (0,2,4,6,12 y 24h). Región de proteínas.



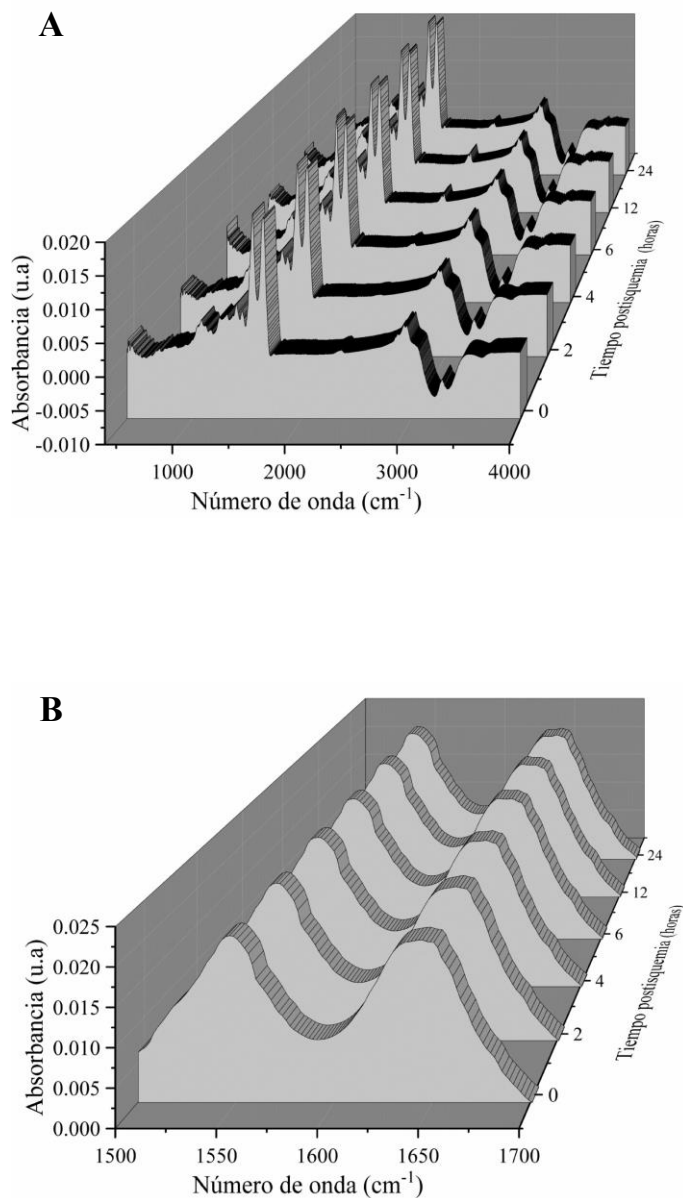
**Figura 22.** Acercamiento del rango donde se expresan los enlaces O-H. En negro se pueden observar las ondas de los promedios obtenidos de muestras pertenecientes de animales Sham en (negro) animales Isquémicos sin tratamiento en (rojo) y en (azul) animales Isquémicos+BE.





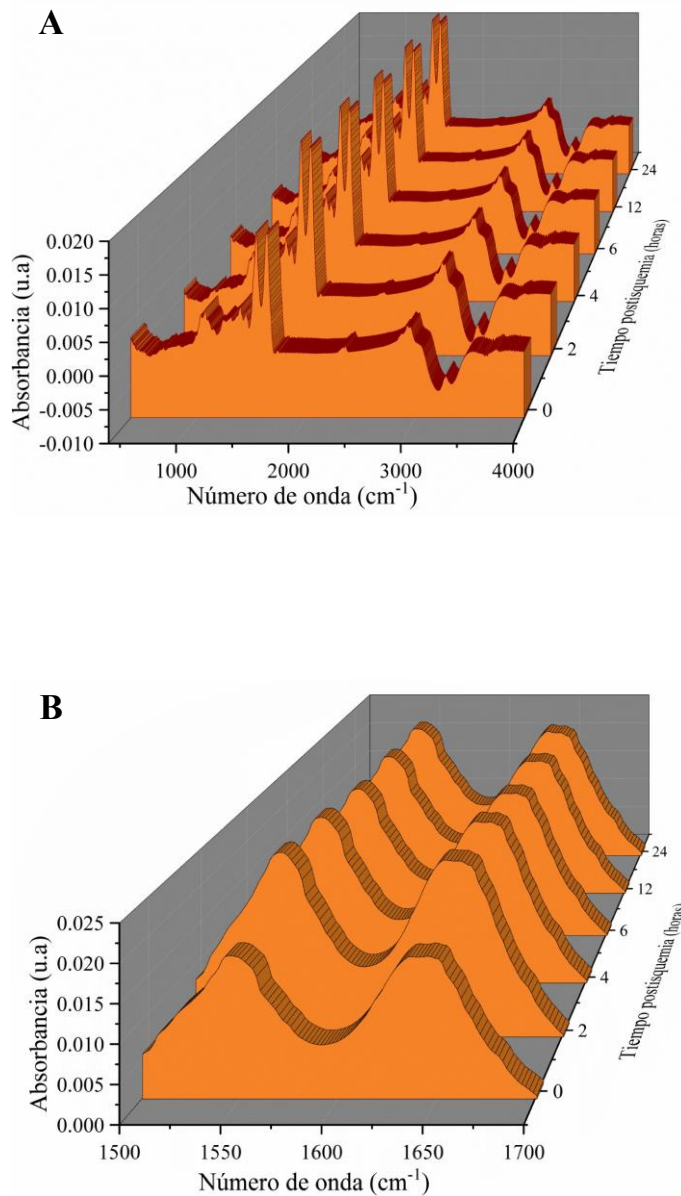
**Figura 23.** Acercamiento del rango donde se expresan los enlaces C-H, se puede observar las ondas de los promedios obtenidos de muestras provenientes de animales Sham (negro) Isquémicos sin tratamiento (rojo) e Isquémicos+BE (azul).

Posteriormente procedimos a realizar la misma comparativa antes descrita en las figuras 20 y 21 pero ahora en ploteos en cascada y haciendo la comparación entre los distintos subgrupos que conformaron los 3 conglomerados grupales, esto con la intención de determinar si el tiempo post-isquemia influía en las concentraciones proteicas. En las figuras 24,25 y 26 se observan los espectros promedio de los subgrupos que conformaron los conjuntos grupales; Sham, Isquémicos e Isquémicos+BE respectivamente. En estas figuras podemos apreciar como en los subgrupos (Sham) independientemente del horario asignado el comportamiento espectral fue homogéneo, sin embargo, este patrón no fue de la misma forma para los subgrupos de los grupos Isquémicos e Isquémicos+BE, donde existió una clara diferencia espectral dependiendo del tiempo post-isquemia al que fueron asignados los animales, esto denota que el tiempo posterior al evento isquémico así como el tratamiento con BE modulan la expresión proteica observada en la variación en las concentraciones de proteínas presentes en el suero. El patrón espectral y la intensidad de absorbancia son muy similares en el grupo Sham, independientemente del esquema post-isquemia asignado. En los animales isquémicos, el patrón espectral y la intensidad de absorbancia son diferentes; estas variaciones están íntimamente asociadas al tiempo post-isquémico porque estos sujetos recibieron el proceso isquémico. En los animales Isquémicos+EB, el patrón espectral y la intensidad de absorbancia son diferentes; estas variaciones están estrechamente asociadas con el tiempo post-isquémico y el tratamiento neuroprotector con EB.



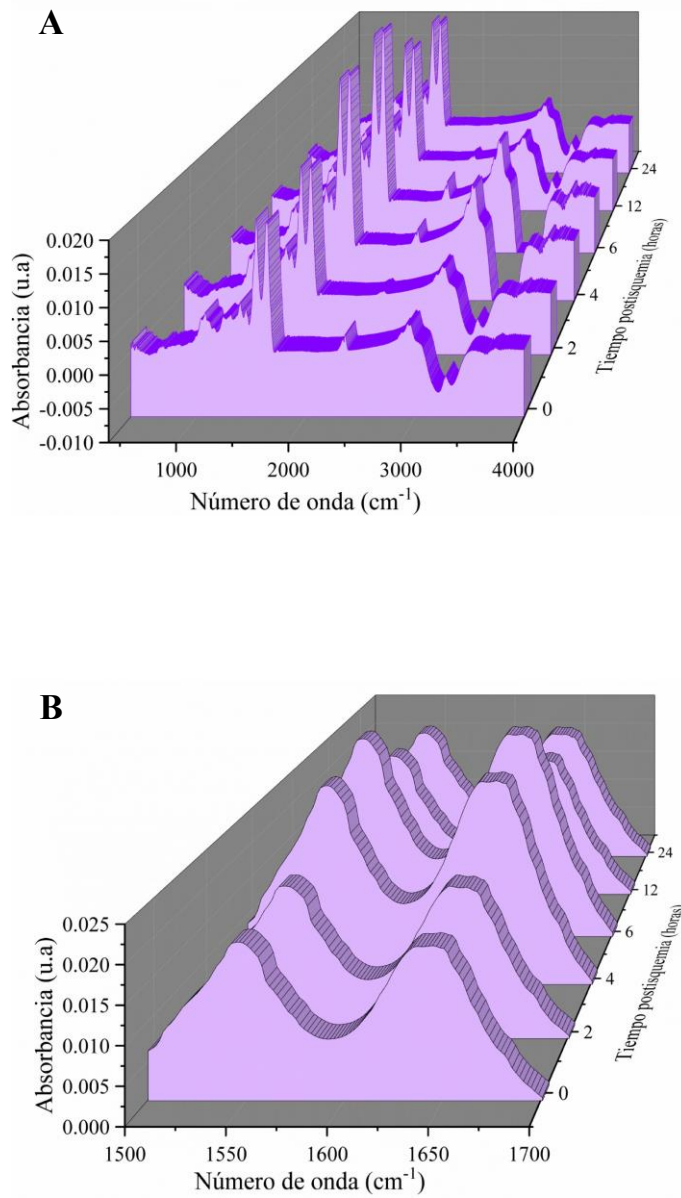
**Figura 24.** Patrón espectral e intensidad de absorbancia de las muestras de animales (Sham). **A)** Región de la huella biológica: 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . **B)** Región proteica: 1500-1700  $\text{cm}^{-1}$ .

En la figura anterior en el eje Z de los paneles A y B muestra los esquemas post-isquemia asignados a los animales sometidos a cirugía simulada, el eje X del panel A muestra la región de la huella biológica, y el eje X del panel B muestra la región de la proteína, mientras que el eje Y de ambos paneles A y B muestra la intensidad de absorbancia. El patrón espectral y la intensidad de absorbancia son muy similares independientemente del esquema post-isquemi asignado.



**Figura 25.** Patrón espectral e intensidad de absorbancia de las muestras de animales isquémicos. **A)** Región de la huella biológica: 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . **B)** Región proteica: 1500-1700  $\text{cm}^{-1}$ .

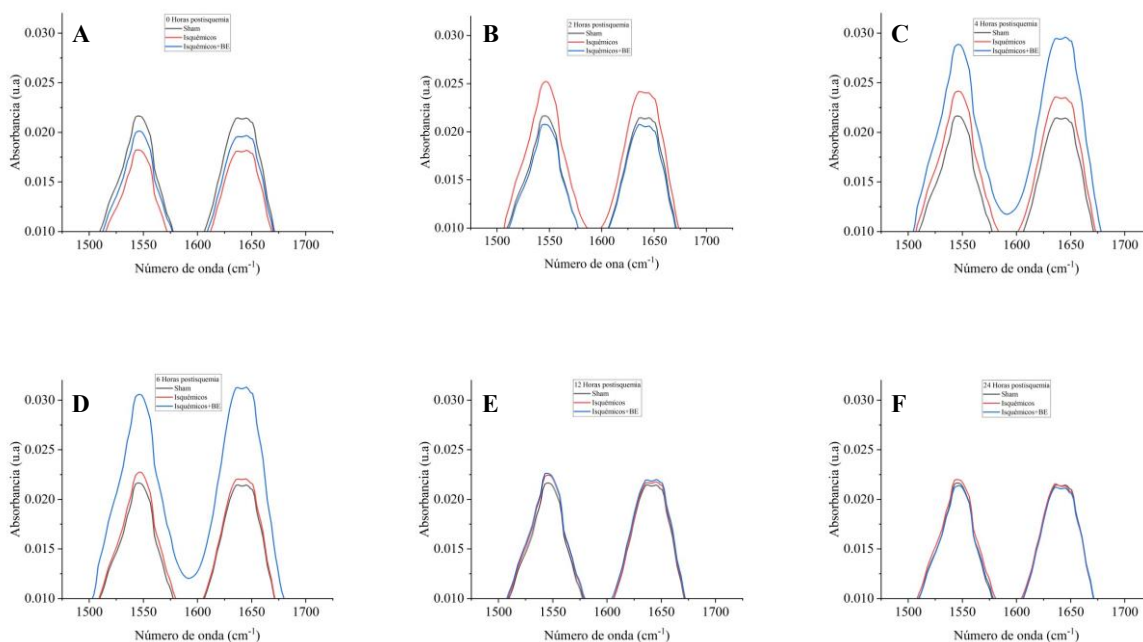
La figura 25 en el eje Z de los paneles A y B muestra los horarios post-isquemia asignados a los animales isquémicos, el eje X del panel A muestra la región de la huella biológica, y el eje X del panel B muestra la región de la proteína, mientras que el eje Y de ambos paneles (A y B) muestra la intensidad de absorbancia. En los animales isquémicos, el patrón espectral y la intensidad de absorbancia son diferentes; estas variaciones están íntimamente asociadas al tiempo post-isquémico porque estos sujetos recibieron el proceso isquémico.



**Figura 26.** En la imagen se muestra el patrón espectral e intensidad de absorbancia de las muestras de animales isquémicos+BE. **A)** Región de la huella biológica: 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . **B)** Región proteica: 1500-1700  $\text{cm}^{-1}$ . en el eje Z de los paneles A y B, se observan los horarios post-isquemia asignados a los animales Isquémico+EB.

En el eje X del panel A de la figura 26, se muestra la región de la huella biológica, y en el eje X del panel B, la región de las proteínas, mientras que el eje Y de ambos paneles (A y B) muestra la intensidad de absorbancia. En los animales Isquémicos+EB, el patrón espectral y la intensidad de absorbancia son diferentes; estas variaciones están estrechamente asociadas con el tiempo post-isquémico y el tratamiento neuroprotector con EB.

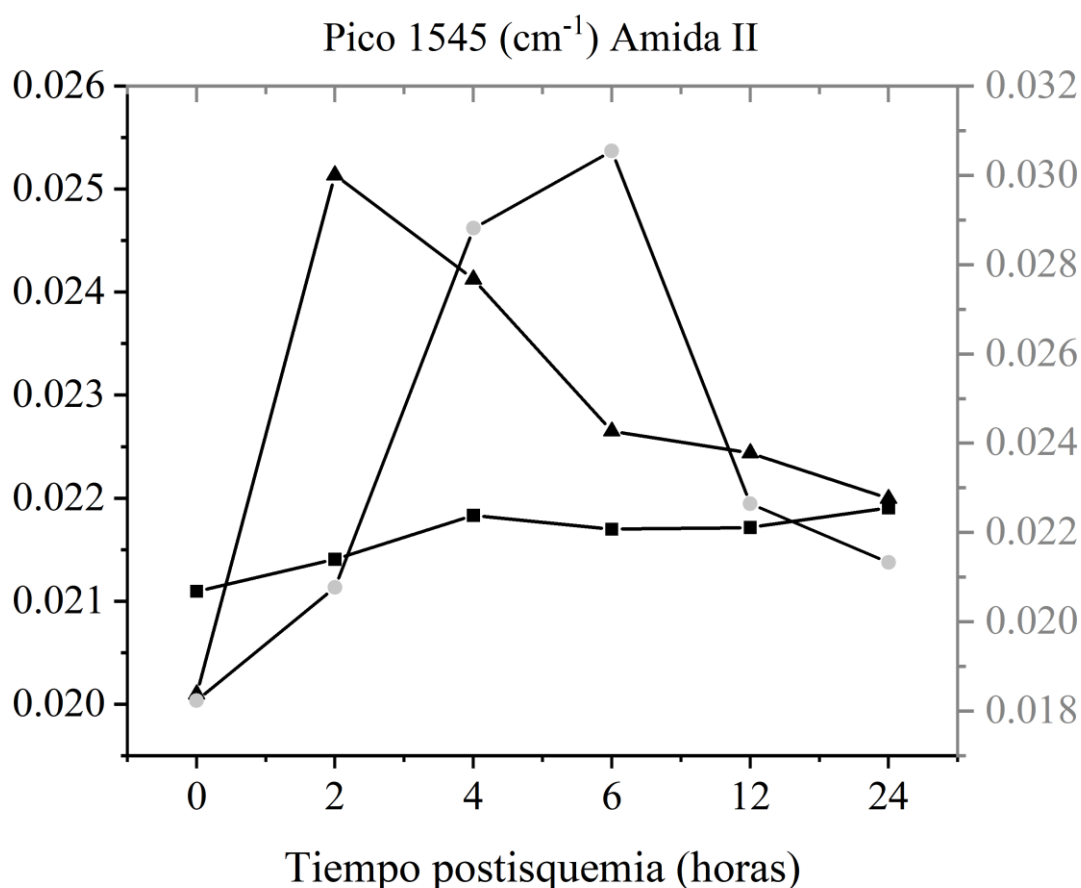
La figura 27 muestra el ploteo lineal en la región de las proteínas que compara el comportamiento espectral por hora entre los distintos grupos, en esta figura se muestra la modulación de las concentraciones proteicas entre los distintos subgrupos y horarios post-isquemia.



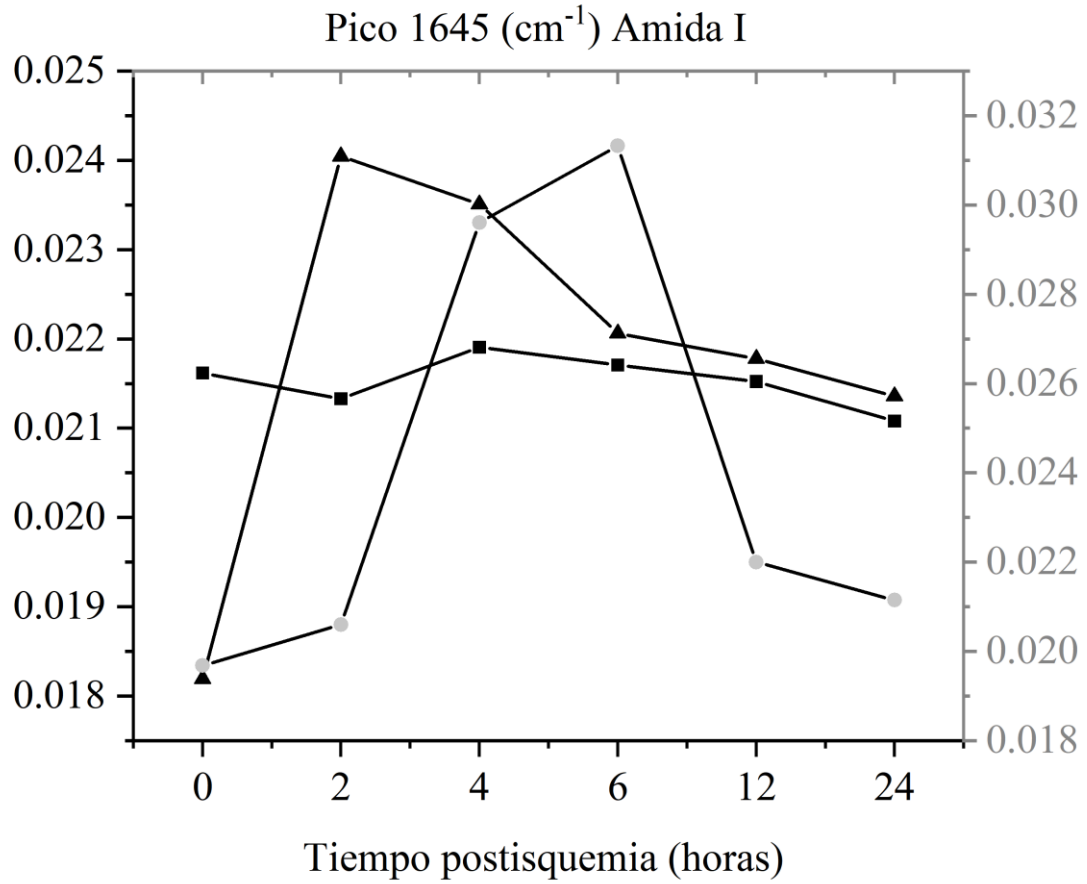
**Figura 27.** Espectros medios de intensidad de absorbancia ATR-FTIR en la región de proteínas para todos los subgrupos experimentales. Los subgrupos son los siguientes: Grupos Sham (línea negra), Isquémico (línea roja) e Isquémico+EB (línea azul). **A)** 0 horas, **B)** 2 horas, **C)** 4 horas, **D)** 6 horas, **E)** 12 horas, y **F)** 24 horas post-isquemia.

El eje X de la figura anterior muestra la región proteica: 1500-1700  $\text{cm}^{-1}$ . El eje Y muestra la intensidad de absorbancia. Esta figura muestra claramente las diferencias en las concentraciones de proteínas determinadas por la intensidad de absorbancia en función del grupo y horario post-isquemia al que se han asignado los animales.

Por otra parte, las figuras 28, 29, 30 y 31 muestran el seguimiento de 4 picos que están asociados a los grupos funcionales Amida II, Amida I, Hojas-  $\beta$  y las  $\alpha$ -Hélices respectivamente y estructuras moleculares que conforman y están presentes en las proteínas, estos picos fueron los localizados en (1545, 1645, 1635 y 1650  $\text{cm}^{-1}$ ).

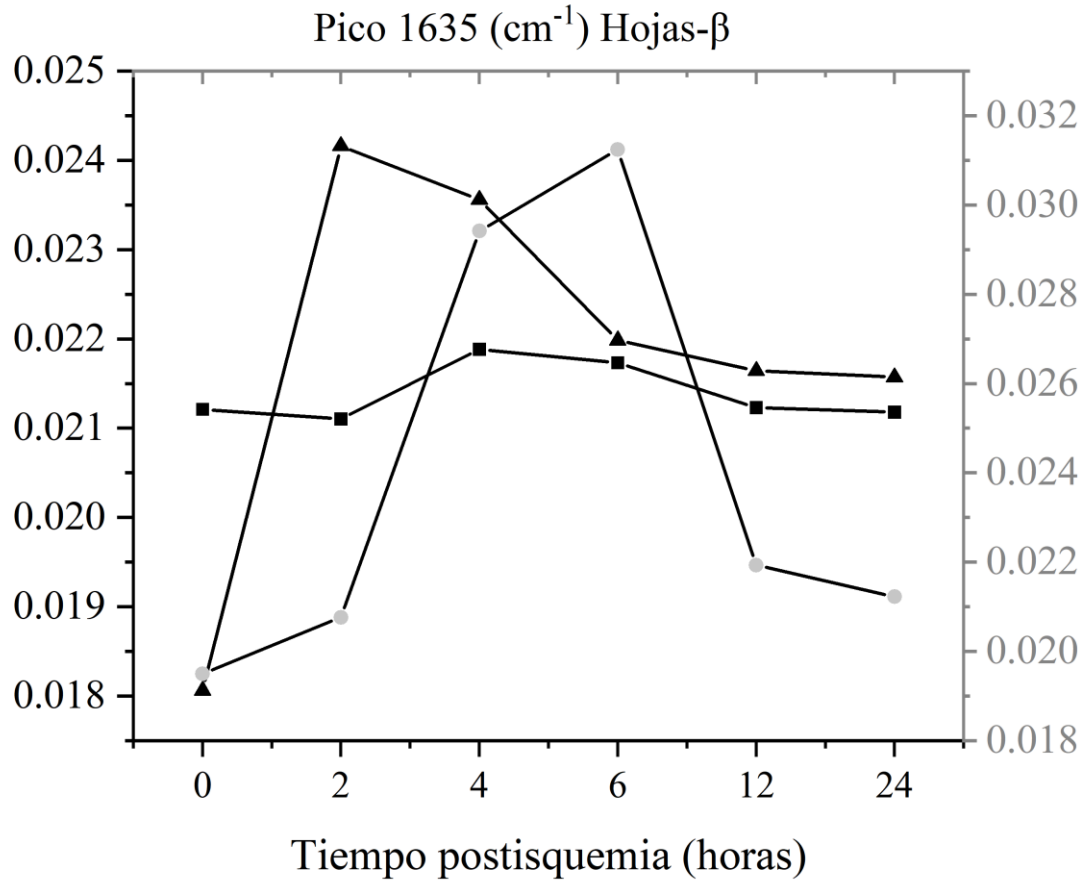


**Figura 28.** Cambios en la intensidad de absorbancia en el pico correspondiente al grupo funcional Amida II situado en 1545  $\text{cm}^{-1}$ .

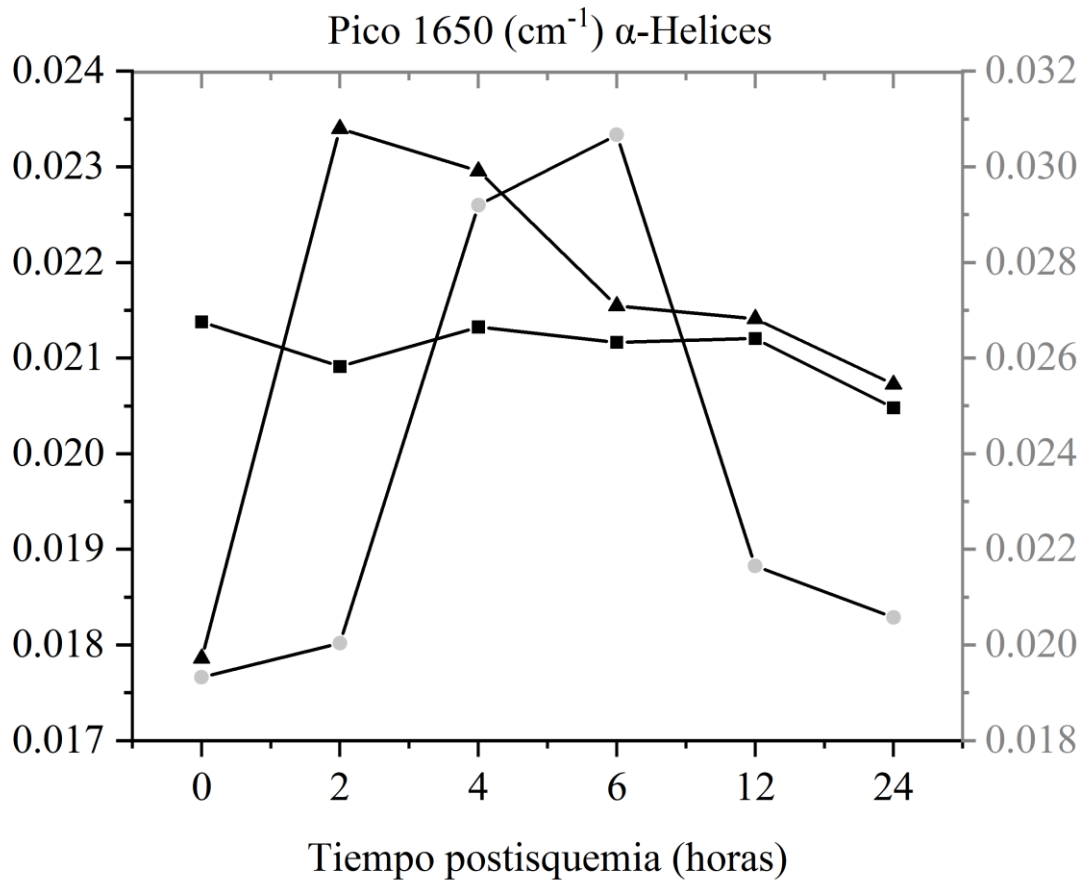


**Figura 29.** Cambios en la intensidad de absorbancia en el pico correspondiente al grupo funcional Amida I situado en  $1645 \text{ cm}^{-1}$ .





**Figura 30.** Cambios en la intensidad de absorbancia en el pico correspondiente a la estructura proteica de las Hojas-β situado en 1635 cm<sup>-1</sup>.



**Figura 31.** Cambios en la intensidad de absorbancia en el pico correspondiente a la estructura proteica de las  $\alpha$ -Helices situado en  $1650\text{ cm}^{-1}$ .

Las figuras 28,29,30 y 31 muestran los cambios en la intensidad de absorbancia en los animales Sham (cuadrados), animales Isquémicos (triángulos) y animales Isquémicos+EB (círculos) en diferentes tiempos post-isquemia (0, 2, 4, 6, 12 y 24 horas).

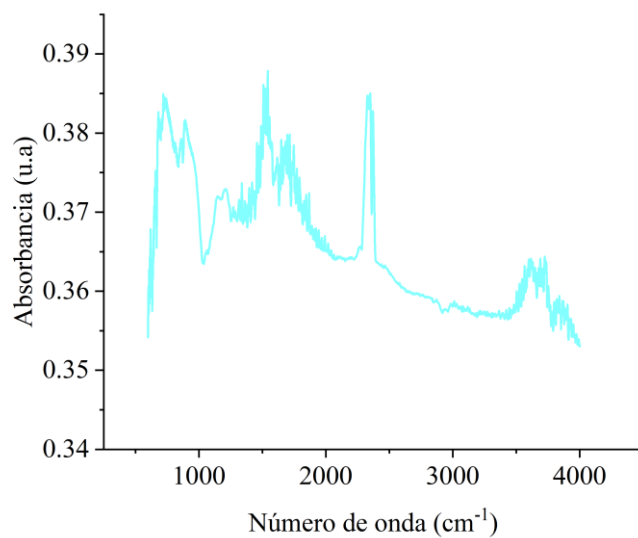
Los resultados mostrados anteriormente únicamente corresponden a los datos obtenidos de las mediciones directas del suero mediante ATR-FTIR, estos resultados por sí solos arrojan información valiosa que puede interpretarse para su aplicación clínica, sin embargo, mediante este protocolo experimental es imposible determinar la expresión de una proteína en particular, esto se debe al hecho de que en las mediciones directas de suero se puede evaluar al conglomerado de proteínas presentes en el suero pero no una en específico. Para poder evaluar las concentraciones de las proteínas de interés de este proyecto (IL-6 e IL-10) de forma específica, se tuvieron que diseñar BO selectivos para la detección de estas dos proteínas, utilizando anticuerpos específicos para cada una de ellas. Los resultados obtenidos de las mediciones en BO para su caracterización y detección de ILs se muestran a continuación.

En las figuras 32-37 se muestra la caracterización morfológica de los BO en sus distintas fases de auto ensamblaje para la detección específica de IL-6 e IL-10. Para se tomaron micrografías del microscopio Hyperion.

La figura 32 presenta la micrografía del silicio cristalino y se puede observar una superficie muy limpia, con algunas imperfecciones propias del material y del proceso de secado con el gas nitrógeno.



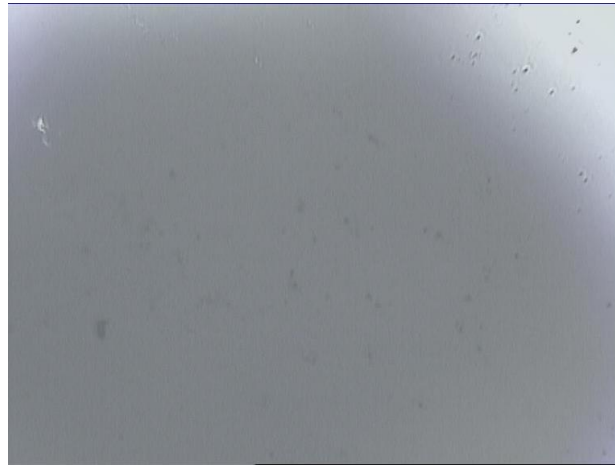
(A)



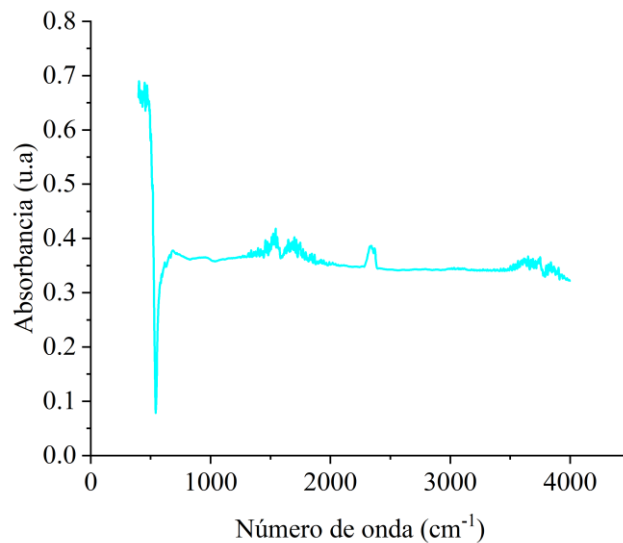
(B)

**Figura 32.** (A) *Micrografía* y (B) *espectro* obtenidos mediante *microFTIR* correspondientes a la *primera fase (Limpieza)* para el ensamblaje de los biosensores.

La figura 33 presenta la micrografía del proceso de hidroxilado donde se presentan un mayor número de puntos negros que pudieran ser asociados a los enlaces OH que se esperaría se encuentren covalentemente enlazados a la superficie del silicio cristalino.



(A)



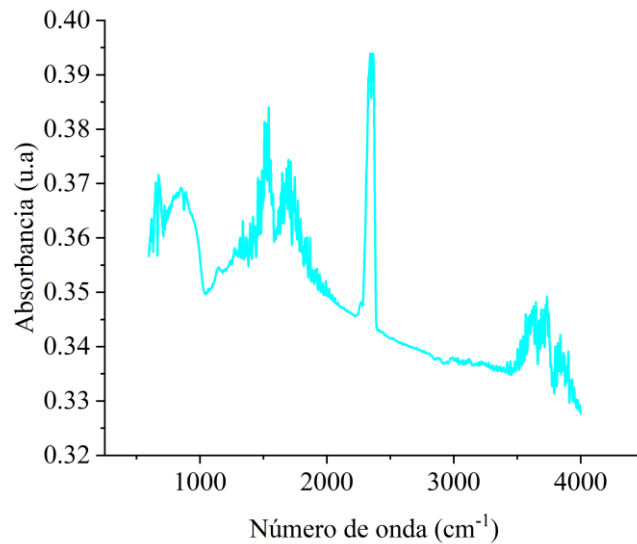
(B)

**Figura 33.** (A) Micrografía y (B) espectro obtenidos mediante microFIR correspondientes a la segunda fase (Hidroxilación) para el ensamblaje de los biosensores.

La figura 34, nos muestra una superficie con una serie de puntos negros de un diámetro muy homogéneo, los cuales son asociados a la presencia de la molécula 3-APTMS que se autoensambla a la superficie durante el proceso de funcionalización, sin embargo no es posible en esta etapa poder observar una morfología homogénea.



(A)



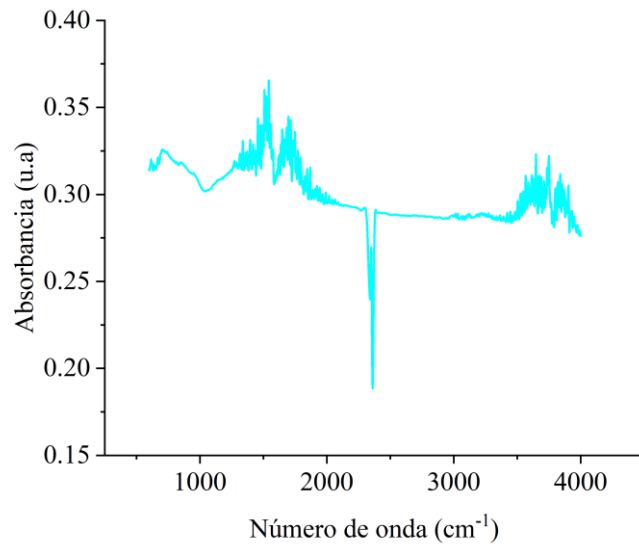
(B)

**Figura 34.** (A) Micrografía y (B) espectro obtenidos mediante microFIR correspondientes a la tercera fase (Funcionalización Gaseosa) para el ensamblaje de los biosensores.

Una vez realizado el proceso de activación, la superficie de la matriz de silicio cristalino queda ahora cubierta de manera más homogénea por puntos negros, ver figura 35, que son las mismas moléculas del 3-APTMS pero que a partir de la reacción con el EDC-NHS, se colocan con una orientación preferencial para poder dejar expuesto el grupo amino listo para unirse al elemento de reconocimiento biológico (anticuerpo).



(A)



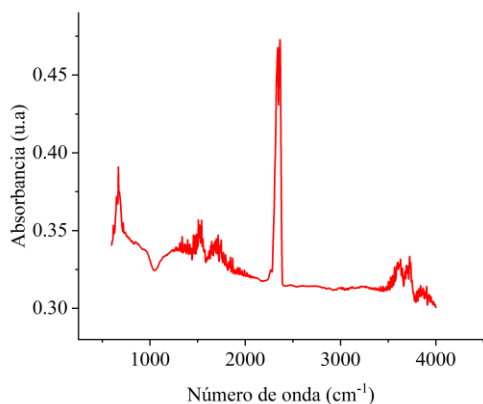
(B)

**Figura 35.** (A) Micrografía y (B) espectro obtenidos mediante microFTIR correspondientes a la cuarta fase (Activación) para el ensamblaje de los biosensores.

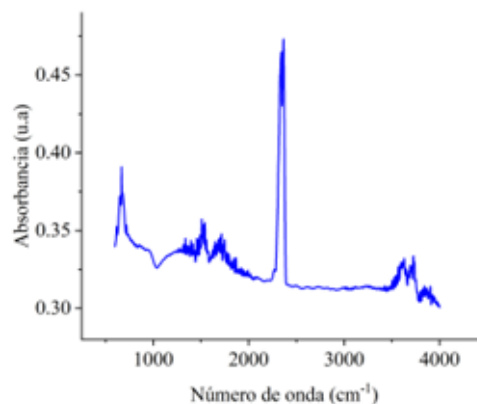
La figura 36 presenta la morfología propia del dispositivo biosensor óptico, en el fondo se observa una superficie tipo poro, mientras que en la cara más expuesta se observan puntos negros aleatoriamente dispuestos sobre la superficie porosa, esta imagen es propia de las monocapas autoensambladas, mientras que los puntos negros que se observan son asociados a los anticuerpos covalentemente enlazados a las moléculas del 3-APTMS.



(A)



(B)



(C)

**Figura 36.** (A) Micrografía, (B) y (C) espectros obtenidos mediante microFIR correspondiente a la quinta fase (Inmovilización) para el ensamblaje de los biosensores para IL-6 (rojo) e IL-10 (azul).



Finalmente la figura 36, nos muestra la imagen después de la interacción del dispositivo biosensor con las muestras biológicas (detección), en esta figura es posible observar nuevamente en el fondo la superficie porosa, mientras que el parte más expuesta se observan un mayor número de puntos negros localizados de manera homogénea, esta morfología se puede asociar a la presencia de las interleucinas que son selectivamente enlazadas a los anticuerpos específicos para su unión covalente a la superficie del dispositivo biosensor.



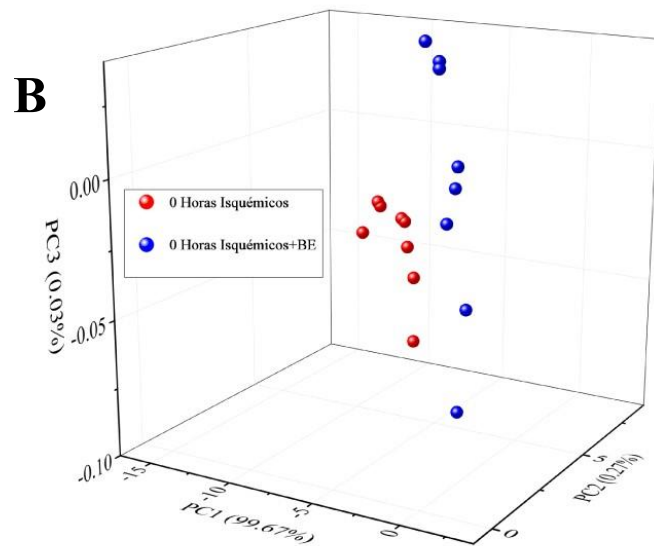
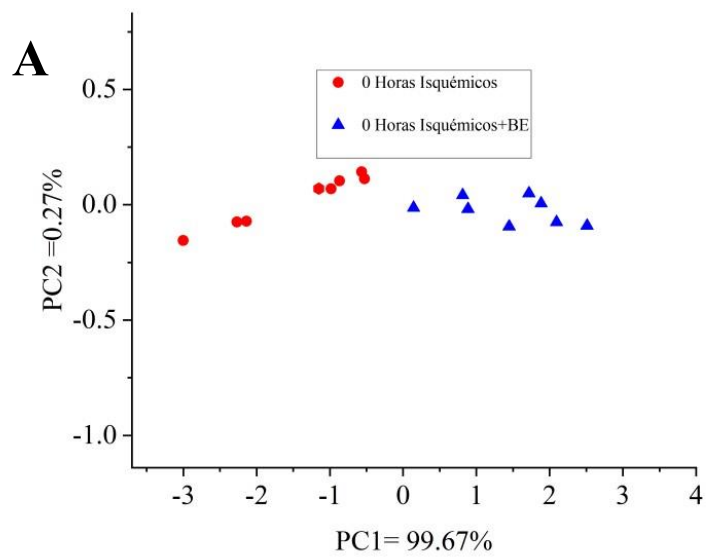
**Figura 37.** En esta imagen se muestra una micrografía obtenida mediante microFTIR correspondiente a la sexta fase (Detección) para el ensamblaje de los biosensores.

En todos los procesos de ensamblaje de BO siempre se obtenían espectros y micrografías de las distintas fases con la intención de garantizar que cada una de ellas se llevara a cabo de forma correcta, a continuación, se muestran los resultados obtenidos de las mediciones mediante ATR-FTIR en los BO desarrollados para la detección específica de IL-6 e IL-10.

Con la intención de encontrar una mejor forma de discriminar los resultados entre los distintos grupos experimentales se procedió a analizar los mismos mediante (PCA). Este método permite disminuir la dimensionalidad de los datos obtenidos experimentalmente sin perder la información que subyace en los mismos generando un nuevo eje de coordenadas donde los componentes con mayor aporte al sistema serán los nuevos ejes de coordenadas, en este sentido, las unidades de estos nuevos ejes de coordenadas representan el porcentaje de variabilidad del componente principal. Se puede lograr obtener un alto porcentaje de variabilidad del componente eligiendo la región dentro del espectro de infrarrojo donde se observen los mayores cambios (en intensidad de absorbancia o en comportamiento espectral) en función de los parámetros experimentales.

En la figura 38 y 39 se muestra el Análisis de Componentes Principales (PCA) en 2D y 3D obtenido mediante ATR-FTIR correspondiente a los BO desarrollados para la detección específica de IL-6 e IL-10 en los horarios post-isquemia de 0 y 2h respectivamente. En el eje X se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 1 siendo de (99.67%). En el eje Y se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 2 siendo de (0.27%). En el eje Z se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 3 siendo de (0.03%).

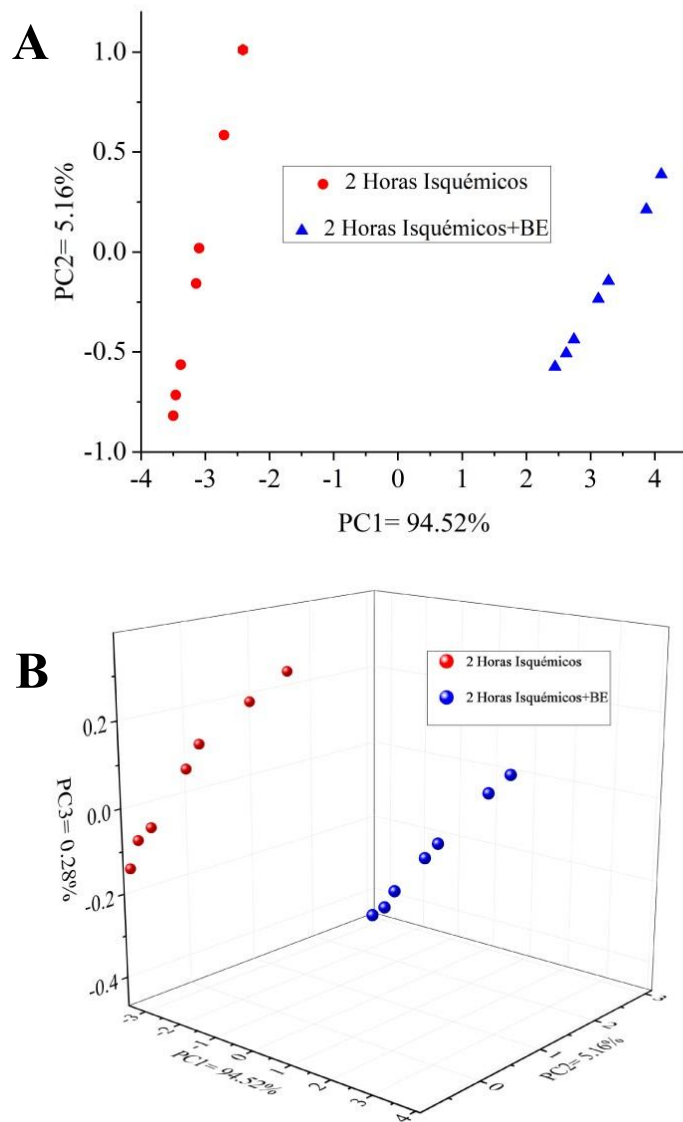
Para esto se tomaron los datos de la región de las amidas I y II ( $1500$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$ ), y se realizó el análisis multivariado. La nube de puntos que se presenta en la figura 38a (2D) y 38b (3D), permite perfectamente discriminar entre la presencia de IL6 e IL10 en dos tipos de muestras, isquémicos (IL6) e isquémicos+BE (IL10). En ambos cuadros de la figura 38, se diferencian muy bien mediante el agrupamiento de los datos experimentales el tipo de interleucina detectada. Para el caso de la figura en 2D, el componente principal 1 es el que determina el tipo de proteína detectada. Mientras que para la figura en 3D, es difícil asociar una tendencia de agrupamiento en función de alguno de los tres componentes.



**Figura 38.** Esta figura se observa el PCA en 2D Panel (A) y 3D Panel (B) obtenido mediante ATR-FTIR de las mediciones en BO con muestras de suero de animales Isquémicos con 0h con BO capacitados para IL-6 en (rojo) e Isquémicos+BE con 0h con BO capacitados para IL-10 en (azul).

En la figura 38 en el eje X se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 1 siendo de (99.67%). En el eje Y se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 2 siendo de (0.27%). En el eje Z se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 3 siendo de (0.03%).

Para el caso del tiempo de 2 horas, ver figura 39, la tendencia de agrupamiento es mucho más marcada, en ambos ejes de coordenadas 2D y 3D, el componente principal 1 es el que determina el tipo de proteína que es detectada por el BO desarrollado. En el eje X se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 1 siendo de (94.52%). En el eje Y se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 2 siendo de (5.16%). En el eje Z se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 3 siendo de (0.28%).



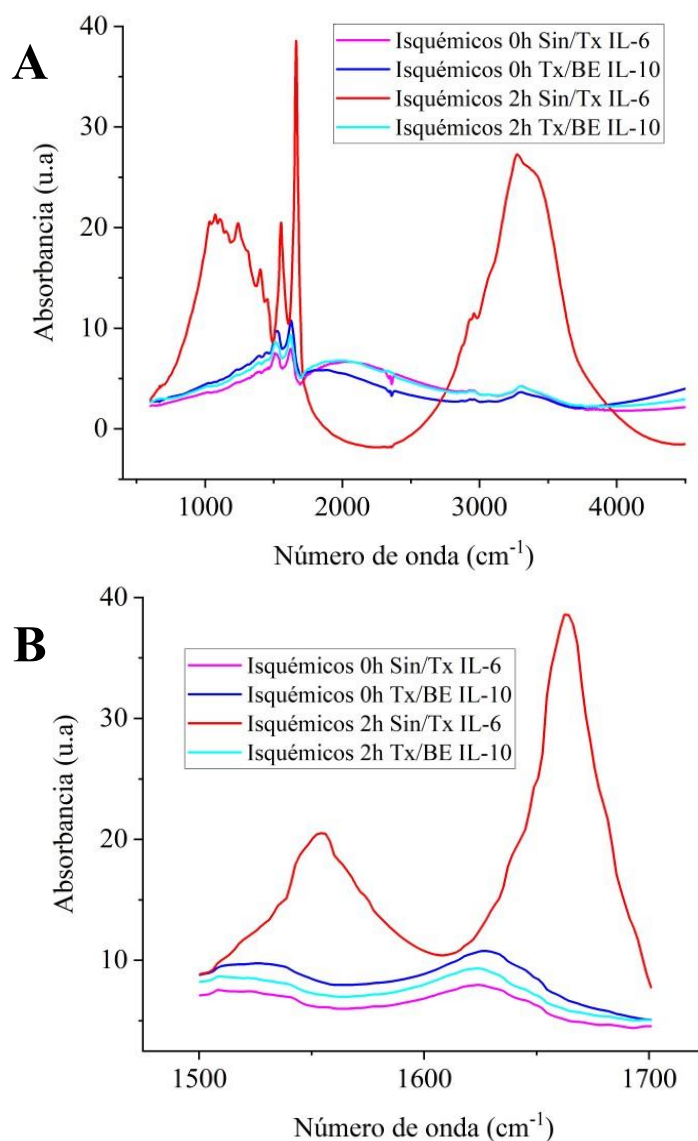
**Figura 39.** Esta figura se observa el PCA en 2D Panel (A) y 3D Panel (B) obtenido mediante ATR-FTIR de las mediciones en BO con muestras de suero de animales Isquémicos con 2h con BO capacitados para IL-6 en (rojo) e Isquémicos+BE con 2h con BO capacitados para IL-10 en (azul).

En el eje X de la figura 39 se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 1 siendo de (94.52%). En el eje Y se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 2 siendo de (5.16%). En el eje Z se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 3 siendo de (0.28%).

Finalmente, tomado en cuenta lo anterior, para el procesamiento numérico comparativo de los datos de los distintos grupos experimentales se eligió la región espectral donde se observaron los mayores cambios y que es la de relevancia en este trabajo, y esa fue la región de las Amidas I y II ubicada entre los 1500-1700  $\text{cm}^{-1}$ . Los resultados experimentales de este análisis se presentan en las figuras 40 para la respuesta por espectroscopia de infrarrojo, así como las figuras 41 y 42 con análisis de PCA en 2D y 3D respectivamente.

En la figura 40 se presenta la respuesta al infrarrojo medio, en el eje X del panel A, se muestra la región de la huella biológica, y en el eje X del panel B, la región de las proteínas, mientras que el eje Y de ambos paneles (A y B) muestra la intensidad de absorbancia. Se manifiesta una alta intensidad de absorbancia para animales isquémicos con 2h desarrollados para la detección específica de IL-6 en comparación con los demás grupos experimentales, los cuales presentan un comportamiento espectral muy similar

Por lo cual se procedió a realizar el análisis multivariado de los datos experimentales realizando el análisis de componentes principales para intentar lograr una mejor discriminación de los datos experimentales.

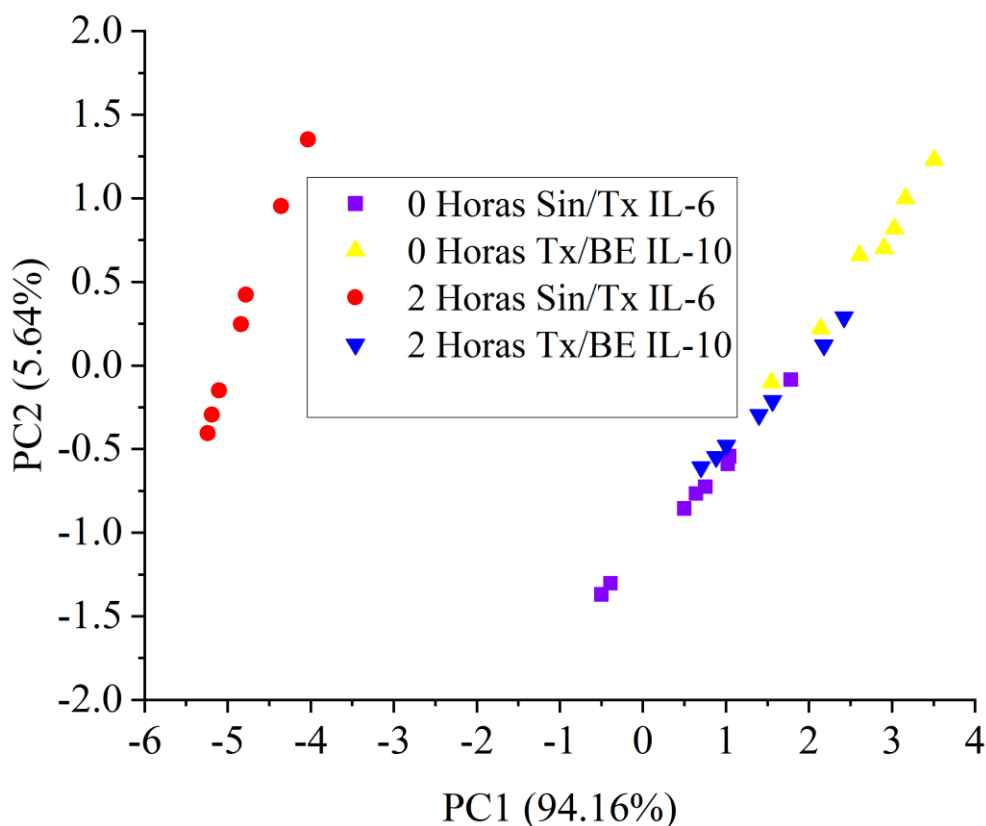


**Figura 40.** Muestra el espectro medio obtenido mediante ATR-FTIR en BO con muestras de suero de animales Isquémicos capacitados para IL-6 con 0h (rosado), Isquémicos capacitados para IL-6 con 2h (rojo), Isquémicos+BE capacitados para IL-10 con 0h (azul) e Isquémicos+BE capacitados para IL-10 con 2h (magenta).

En la figura anterior se muestra en **(A)** Región de la huella biológica: 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . **(B)** Región proteica: 1500-1700  $\text{cm}^{-1}$ . En el eje X del panel A, se muestra la región de la huella biológica, y en el eje X del panel B, la región de las proteínas, mientras que el eje Y de ambos paneles (A y B) muestra la intensidad de absorbancia. Se manifiesta una alta intensidad de absorbancia para

animales isquémicos con 2h capacitados para detección específica de IL-6 en comparación con los demás grupos experimentales.

La figura 41 presenta el análisis de PCA en un gráfico de 2D, en el eje X se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 1 siendo de 94.16%. En el eje Y se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 2 siendo de 5.64%. En la figura se puede observar que el PC1 permite discriminar entre los datos del sensado de IL6 del resto de las muestras.

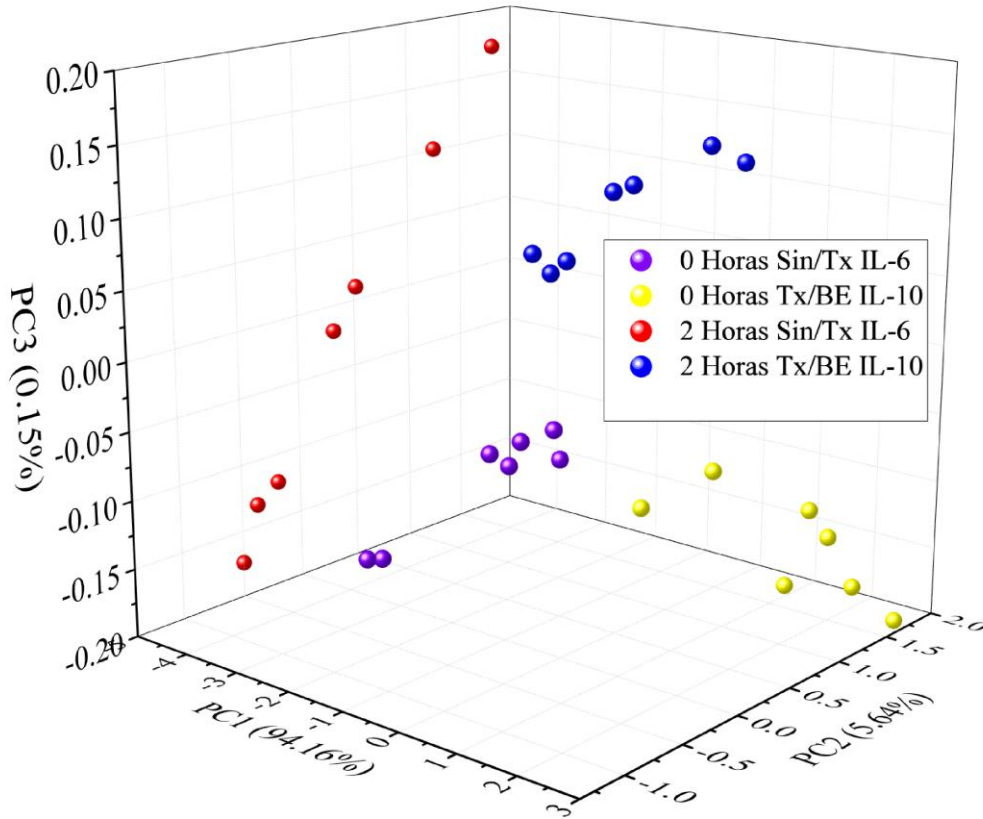


**Figura 41.** Esta figura se observa el PCA en 2D obtenido mediante ATR-FTIR de las mediciones en BO con muestras de suero de animales Isquémicos con 0h con BO capacitados para IL-6 en (morado), Isquémicos con 2h con BO capacitados para IL-6 (rojo), Isquémicos+BE con 0h con BO capacitados para IL-10 en (amarillo) e Isquémicos+BE con 2h con BO capacitados para IL-10 en (azul).



En el eje X de la figura 41 se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 1 siendo de (94.16%). En el eje Y se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 2 siendo de (5.64%).

Ahora bien, si graficamos en 3D, ver figura 42, podemos observar que en el eje X se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 1 siendo de 94.16%. En el eje Y se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 2 siendo de 5.64%. En el eje Z se observa el porcentaje de contribución del componente principal 3 siendo de 0.15%. Los 3 componentes principales contribuyen con un total del (99.95%) para la resolución del sistema lineal de ecuaciones. En este grafico de 3D para el mismo conjunto de datos mostrado en la figura anterior, es posible obtener una mejor discriminación entre cada grupo de muestras, cada grupo de muestras presenta una tendencia de agrupamiento muy específica, lo que permite identificar el tipo de tratamiento empleado para cada grupo animal.



**Figura 42.** Esta figura se observa el PCA en 3D obtenido mediante ATR-FTIR de las mediciones en BO con muestras de suero de animales Isquémicos con 0h con BO capacitados para IL-6 en (morado), Isquémicos con 2h con BO capacitados para IL-6 (rojo), Isquémicos+BE con 0h con BO capacitados para IL-10 en (amarillo) e Isquémicos+BE con 2h con BO capacitados para IL-10 en (azul).

En el eje X de la figura 42 se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 1 siendo de (94.16%). En el eje Y se muestra el porcentaje de contribución del componente principal 2 siendo de (5.64%). En el eje Z se observa el porcentaje de contribución del componente principal 3 siendo de (0.15%). Los 3 componentes principales contribuyen con un total del (99.95%) para la resolución del algoritmo.

Con estos análisis se logró determinar la aportación a la respuesta del sistema lineal, misma que fue en total del (99.95%) con los tres primeros componentes; donde el primer componente principal (PC1) responde al (94.16%) de la varianza del sistema de ecuaciones generado, el segundo componente principal (PC2) responde al (5.64%) y finalmente el tercer componente principal (PC3) responde al (0.15%) del sistema de ecuaciones lineales que resuelven el algoritmo. Este análisis nos permite graficar los componentes principales en con 2 y 3 ejes de coordenadas, es decir, en 2D y 3D y de esta forma visualizar claramente las diferencias en los datos dependiendo su ubicación en el plano, así como sus tendencias de agrupamiento de acuerdo al grupo experimental que fueron asignados los animales y el tipo de analito para el cual estaban capacitados los BO, específicamente IL-6 e IL-0.

## 8. DISCUSIÓN

En este trabajo la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier en el modo de medición de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), así como los BO desarrollados, demostraron ser una buena herramienta alternativa o complementaria de las técnicas convencionales para observar la modulación proteica en muestras de suero así como para la detección específica de IL-6 e IL-10 en el suero de animales con distintos horarios post-isquemia; esto se debe a su alta sensibilidad para detectar modificaciones incluso sutiles en las estructuras químicas que componen a las proteínas, por no necesitar preparación de las muestras y el volumen mínimo que se requiere para su medición. Aunado a lo anterior, la gran cantidad de datos que se logran obtener en tiempos cortos, maximiza la fiabilidad de los resultados y su interpretación, además, estas metodologías resultaron ser económicas, rápidas y fáciles de emplear una vez que fueron estandarizadas. Las aplicaciones clínicas y científicas de estas técnicas son numerosas y prometedoras.

Los porcentajes de supervivencia de los sujetos empleados en la presente investigación fueron tras la electrocauterización de las arterias vertebrales del 95%, tras la exposición de las arterias carótidas comunes del 90% y tras el evento isquémico del 85%. Entre los posibles factores que contribuyeron a la muerte de los animales durante la electrocauterización de las arterias vertebrales, fue el choque hipovolémico provocado por la hemorragia dentro de estos vasos. En los casos en que los animales no sobrevivieron durante la exposición de las arterias carótidas comunes, puede atribuirse a paros cardiorrespiratorios desencadenados por la manipulación física del nervio vago debido a que este nervio está implicado en la regulación del ritmo cardíaco y respiratorio (ref).

En este estudio primero se caracterizó el espectro de ratas macho sanos e intactos como se ilustra en la figura 15, esto por sí mismo es importante porque permite tener un espectro que funge como control o huella dactilar, ya que independientemente de la variabilidad individual que puede existir en cada animal se demostró que no existen diferencias relevantes en la

composición ni en la concentración sérica de biomoléculas de relevancia como; carbohidratos, lípidos y proteínas, estos resultados son comparables con los obtenidos por Wang Y et. al. en 2015, donde mostraron que mediante la espectroscopia de infrarrojo era posible determinar la presencia de los compuestos activos de Zougui Pill en suero de ratas (Wang et al., 2015).

Es de esperar que los espectros de cualquier otro suero sanguíneo de rata sin procesos patológicos o comorbilidades tengan el mismo comportamiento espectral tanto en la forma y comportamiento como en la intensidad de absorbancia, es decir, deberían presentar las mismas bandas y valles, esto debido a que no hay enfermedades ni procesos patológicos o farmacológicos que pudieran estar influyendo en los componentes moleculares séricos y sus concentraciones. Esto se corroboró al obtener los espectros de los animales SHAM que tuvieron el mismo comportamiento espectral, esto nos permite inferir que las concentraciones proteicas no se ven modificadas por la instauración de las dos cirugías preparatorias previas al evento isquémico o bien que el tiempo de reposo antes de ingresar al protocolo de ICGA fue suficiente para que existiera una estabilización de las mismas, esto es de suma importancia porque nos permite determinar que las diferencias manifestadas en los otros grupos experimentales (Isquémicos e Isquémicos+BE) se deben a 3 factores principales:

- 1.- Si el animal recibió o no el proceso isquémico.
- 2.- El tiempo posterior al evento isquémico.
- 3.- El tratamiento neuroprotector con BE.

También en estos espectros obtenidos logramos identificar las áreas o regiones de interés en el estudio de sistemas biológicos, particularmente la región de proteínas en la que se centró este trabajo como se puede observar en la figura 16.

Las figuras 17, 18 y 19 ilustran los espectros en crudo en la región del infrarrojo medio obtenidos mediante ATR-FTIR de todos los subgrupos Sham, Isquémicos e Isquémicos+BE respectivamente. Estos espectros revelan las bandas de absorción asociadas a diversos enlaces y biomoléculas en muestras biológicas, como lípidos, carbohidratos y proteínas, en estas figuras

pueden distinguirse las siguientes bandas de absorción: la banda de los enlaces O-H a  $1041\text{ cm}^{-1}$ , la banda asociada a los carbohidratos a  $1080\text{ cm}^{-1}$ , la banda de los lípidos a  $1747\text{ cm}^{-1}$ , la banda correlacionada con los enlaces C-H a  $2931\text{ cm}^{-1}$ , y las bandas atribuidas a los grupos funcionales Amida I y Amida II, a  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  y  $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, mostrando una similitud en el dibujo espectral en las áreas donde se sitúan las bandas y valles. Un comportamiento espectral similar fue mostrado por (Carmona et al. 2013, Huang Jing et al. 2021), mostrando bandas similares para muestras de suero sanguíneo. No obstante, en estos espectros promedio se observan diferencias notables en la intensidad de absorbancia en función del grupo experimental analizado, es importante destacar que en esta técnica la intensidad de absorbancia está directamente relacionada con la concentración de las moléculas presentes en la muestra analizada.

En la figura 20 se realizó la superposición de los espectros para una mejor comparativa de los mismos, se puede observar que en las diferentes regiones existen bandas que presentan casi el mismo comportamiento con variaciones muy marcadas en las absorbancias. En el entendido que la presencia de IL-6 e IL-10 deberían mostrarse en la región de las proteínas y estas a su vez deberían presentar enlaces C-O y C-H, procedimos a realizar un acercamiento en estas regiones donde fue posible observar una homologación en las 3 regiones, manifestando menores concentraciones (menor intensidad de absorbancia) los animales Sham vs Isquémicos e Isquémicos+BE en la región de los enlaces N-H y O-H que se expresan entre  $3000$  y  $3600\text{ cm}^{-1}$  y particularmente las figuras 21, 22 y 23 muestran que los mayores cambios se presentan en las bandas entre  $950\text{-}200\text{ cm}^{-1}$  asociada a los enlaces C-O, la región donde se expresan las proteínas entre  $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  así como la región asociada a los enlaces C-H ubicada en  $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ . Como lo describe (Barraza et al. 2012) estas variaciones pueden deberse a dos cosas, cambios en la estructura molecular de los compuestos y/o cambios en la concentración de los mismos.

En las figuras 24, 25 y 26 obtuvimos los espectros promedio en crudo, ploteados en cascada de las mediciones en suero obtenidos por ATR-FTIR, que representan los subgrupos Sham en diferentes tiempos, etiquetados como Sham, Isquémicos e Isquémicos+BE a 0, 2, 4, 6, 12 y 24h

respectivamente. Estos espectros exhiben picos en la región de proteína característicos en  $1644\text{ cm}^{-1}$  (Amida I, estiramiento C=O) y  $1545\text{ cm}^{-1}$  (Amida II, flexión N-H), que son comunes en las muestras biológicas (Scott D.A., et al., 2010).

En la figura 24 se evaluó si existieron diferencias en las concentraciones de proteínas entre subgrupos Sham después de dos cirugías preparatorias, electrocauterización de arterias vertebrales y exposición de arterias carótidas comunes. Aunque faltan estudios específicos sobre estas cirugías, se sabe que los procesos quirúrgicos pueden alterar la expresión proteica. Por ejemplo, (Herring et al. 2017) demostraron que la ligadura de la arteria carótida izquierda en ratones aumentaba la expresión de proteínas proinflamatorias hasta 3 días después de la cirugía. Del mismo modo, estudios posteriores han demostrado una disminución de la expresión de proteínas específicas por PCR tras una lesión vascular, sin embargo, en nuestro estudio los procesos quirúrgicos previo al evento isquémico no alteraron la dinámica molecular con respecto a animales sanos e intactos, sin embargo, no fue el mismo caso para los animales Isquémicos e Isquémicos+BE.

En los animales asignados a los diferentes subgrupos Isquémicos, la expresión proteica más baja se observó en el subgrupo de 0h, por el contrario, se observó un aumento de las concentraciones de proteínas en los otros subgrupos, concretamente el subgrupo de 2h presentó las concentraciones proteicas más elevadas, disminuyendo gradualmente en los subgrupos siguientes a medida que se prolongaba el tiempo post-isquemia. Nuestros hallazgos pueden atribuirse a la respuesta inmunitaria innata, que implica la activación de células de microglía responsables de expresar receptores que modulan la respuesta inflamatoria post-isquemia. Aunque existen tanto fenotipos microgliales proinflamatorios como antiinflamatorios, varios grupos de investigación, como el de (Lambertsen et al. 2019) han notificado un aumento de las concentraciones de proteínas proinflamatorias durante las fases aguda y subaguda posteriores a lesiones isquémicas cerebrales. De la misma manera Yoshitaba, et.al. en el 2023, evaluaron la modulación de proteínas en procesos antiinflamatorios en la fase post isquemia desde el día 0 al día 13, observando la modulación de los macrófagos tipo M1 en procesos anti y pro inflamatorios. En este trabajo de tesis, los individuos pertenecientes a los subgrupos

Isquémicos+BE al igual que en los subgrupos Isquémicos, las concentraciones de proteínas aumentaron en todos los tiempos post-isquemia, sin embargo, las concentraciones máximas de IL6, para estos subgrupos se mostraron a las 4 y 6h, mientras que la concentración máxima de IL10 se presenta en el intervalo de tiempo de 0 a 2h.

Estos resultados nos permiten concluir que el efecto máximo del BE en la inducción de la síntesis o secreción de proteínas en la isquemia cerebral se alcanza a las 6h lo que se puede relacionar con el efecto del BE que ha sido reportado en varios modelos isquémicos como un potente agente neuroprotector, incluyendo la ICGA. Esta propiedad se le atribuye en parte a su capacidad para reducir la muerte celular y el daño cerebral limitando las respuestas inflamatorias y promoviendo la síntesis de proteínas antiinflamatorias. Además, se sabe que puede inhibir la producción de proteínas proinflamatorias, como han descrito (Chiappetta et al. 2007), no obstante, la ventana terapéutica de este fármaco, así como los mecanismos celulares y moleculares específicos que subyacen en su eficacia contra la isquemia cerebral siguen sin conocerse del todo.

Mediante el ploteo lineal realizando la comparativa de los distintos subgrupos experimentales por horario homologado, se observó claramente las diferencias entre los mismos, siendo atribuible a los 3 factores ya antes mencionados; proceso isquémico, tratamiento farmacológico y tiempo post-isquemia, esto debido a que ya se ha informado como el BE actúa como agente neuroprotector en eventos de isquemia cerebral, mejorando los déficits cognitivos y reduciendo la pérdida de poblaciones neuronales. Estos efectos neuroprotectores se atribuyen en parte a la supresión de factores proteicos isquémicos, como los cotransportadores y los intercambiadores de iones, reduciendo así el edema cerebral. Adicionalmente otros estudios, demostraron que el BE inhibe la síntesis de hormonas y proteínas que promueven la degradación de la barrera hematoencefálica. Los efectos antiinflamatorios del BE contra la isquemia cerebral también se han demostrado por su capacidad para suprimir la síntesis de proteínas proinflamatorias como citocinas y el inflamasoma NLRP3, IL-1, IL-6 o TNF- $\alpha$  como lo reportó (Thakkar et al. 2016).



Además, se ha descrito que el BE modula las respuestas inflamatorias isquémicas promoviendo la síntesis de proteínas antiinflamatorias como la IL-10 generando neuroprotección contra la encefalomiелitis al inhibir la neuroinflamación mediante el aumento de la IL-10 sintetizada por las células B y la microglía (ref).

En cuanto a los subgrupos Sham, los valores más altos de absorbancia y por tanto la concentración más alta de proteínas se observaron durante la fase isquémica hiperaguda (0 h). Esto concuerda con el conocido proceso de muerte celular masiva y desnaturalización proteica inmediatamente después de un evento isquémico cerebral. En el caso de los animales isquémicos, la mayor concentración de proteínas en comparación con los animales simulados e isquémicos+BE se observó en el subgrupo de 2h, lo que concuerda con la historia natural de la enfermedad isquémica, que muestra una sobreexpresión de enzimas y citoquinas proinflamatorias en las primeras horas tras un episodio de isquemia cerebral como lo descrito por estudios como el realizado por (Emsley et al. 2007).

Para discriminar aún más las concentraciones de proteínas mediante el estudio de sus componentes estructurales, realizamos el seguimiento de los picos de Amida II ( $1545\text{ cm}^{-1}$ ), Amida I ( $1645\text{ cm}^{-1}$ ), Hojas- $\beta$  ( $1635\text{ cm}^{-1}$ ) y  $\alpha$ -Hélices ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) en cada uno de los subgrupos pertenecientes a los conglomerados grupales en; 0, 2, 4, 6, 12 y 24h post-isquemia. Las figuras 28, 29, 30 y 31 representan gráficamente los valores numéricos de estos picos y mediante el estudio de los mismos podemos determinar cómo fue el comportamiento estructural de las proteínas expresadas después de la ICGA.

En seguimiento del pico situado en ( $1545\text{ cm}^{-1}$ ) el cual corresponde al grupo funcional Amida II, mostró los cambios de absorbancia dentro de los distintos subgrupos. La absorbancia más alta en el grupo Sham se observó en el subgrupo de 4h, con un valor de 0,021832 u.a. La concentración máxima de proteína en el grupo Isquémico se observó en el subgrupo de 2h, con un valor de 0,0251 u.a, por último, en el grupo Isquémico+BE, el pico de absorbancia alcanzó su máximo en el subgrupo de 6h, con un valor de 0,0305 u.a. Murphy y colaboradores en el 2014, destacaron que la monitorización de este pico es crucial porque analizar el grupo funcional

Amida II mediante FTIR ofrece una alternativa para estudiar las estructuras secundarias de las proteínas y su estructura de orden superior (Murphy et al. 2014), lo cual implica observar no solo la expresión de las proteínas, sino también los cambios conformacionales ocasionados por efectos externos. Otros autores también han destacado que esta región, puede utilizarse para predecir estructuras secundarias de las proteínas (Schubert L. et al. 2022). Esto demuestra la importancia de seguir los cambios en el pico del grupo funcional Amida II de nuestro estudio.

En el pico situado en ( $1645\text{ cm}^{-1}$ ) correspondiente al grupo funcional Amida I también se realizó su monitoreo, mediante el análisis espectral se demostró que la absorbancia más alta se presenta en el grupo control (sham) se observó en el subgrupo de 4h, con 0,0219 u.a. La concentración máxima de proteína en el grupo Isquémico se registró en el subgrupo de 2h, con 0,024045 u.a. Por último, en el grupo isquémico+BE, el pico de absorbancia alcanzó su máximo en el subgrupo de 6 h, con un valor de 0,0313 u.a En el subgrupo Isquémico+BE, el pico de absorbancia alcanzó su máximo en el subgrupo de 6h, con un valor de 0,0313 u.a Es importante el monitoreo de este pico ya que de acuerdo a (Camerlingo et al. 2022) indicaron que la evaluación fisicoquímica de proteínas en biofluidos mediante ATR-FTIR puede llevarse a cabo eficazmente estudiando este pico. Además, también otros autores han concluido que esta técnica espectroscópica (ATR-FTIR) puede proporcionar información sobre las concentraciones de proteínas en fluidos, incluso cuando los volúmenes de muestra o las variaciones de concentración y estructurales son pequeños.

En el estudio del pico correspondiente a las hojas- $\beta$  situado en ( $1635\text{ cm}^{-1}$ ) se obtuvieron los valores de absorbancia más alta para el grupo Sham en el subgrupo de 4h, con un valor de 0,0218 u.a. La concentración máxima de esta estructura en el conjunto del grupo Isquémico se encontró en el subgrupo de 2h, con una medida de 0,0241 u.a. Por último, en el conjunto del grupo Isquémico+BE, el pico de absorbancia alcanzó su máximo en el subgrupo de 6 h, con un valor de 0,0312 u.a. El seguimiento de este pico es esencial, ya que permite estudiar la conformación de las proteínas en las enfermedades neurodegenerativas como lo destacó (Misra et al. 2021). Además, este pico está asociado a las  $\beta$ -hojas, lo que puede explicar ligeras variaciones en las concentraciones y estructuras de las proteínas en las muestras analizadas. Igualmente realizamos

este estudio en el pico asociado a las  $\alpha$ -Hélices situado en ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) obteniendo la absorbancia más alta dentro del conjunto del grupo Sham en el subgrupo de 0h, con un valor de 0,021377 u.a. La concentración máxima de esta estructura en el conjunto del grupo Isquémico se observó en el subgrupo de 2h, con un valor de 0,0233 u.a. Por último, en el conjunto del grupo Isquémico+BE, el pico de absorbancia alcanzó su máximo en el subgrupo de 6h, con un valor de 0,0306 u.a.

El seguimiento de este pico asociado a la estructura proteica  $\alpha$ -Hélice se ha referido que permite evaluar la agregación y estabilidad de la proteína y se ha destacado que la evaluación de este pico con ATR-FTIR ayuda a dilucidar la estructura de la proteína, lo cual es crucial para correlacionar la funcionalidad de una proteína con su estructura molecular (Wang et al. 2019).

Cabe destacar que todos los patrones espectrales mostraron un comportamiento coherente dentro de los distintos conjuntos de grupos y sus respectivos subgrupos. La intensidad de absorbancia en el grupo simulado se mantuvo casi idéntica en los cuatro picos analizados, sin embargo, las variaciones en la intensidad de absorbancia fueron evidentes en los subgrupos Isquémico e Isquémico+BE, lo que indica diferentes concentraciones de proteínas y sus estructuras moleculares en función del tipo de tratamiento y de los tiempos post-isquemia. Estas variaciones en las concentraciones de proteínas se atribuyen al procedimiento Isquémico, al tiempo post-isquemia y a la administración del tratamiento BE. Sin embargo, independientemente del pico analizado, los cuatro picos mostraron momentos críticos en los que la modulación proteica estaba presente. Para los subgrupos Isquémicos, los valores más altos se observaron dos horas después de la isquemia. Por el contrario, los subgrupos Isquémicos+BE mostraron una absorbancia notablemente inferior en este mismo momento. Por el contrario, los valores máximos de los grupos Isquémico+BE se obtuvieron a las 4 y 6h post-isquemia. En la hora 0, los subgrupos Isquémico e Isquémico+BE mostraron valores similares, demostrando una mayor homogeneidad en los grupos a las 12 y 24h post-isquemia.

Con la intención de poder discriminar entre las dos proteínas de interés (IL-6 e IL-10), se desarrollaron dispositivos biosensor con anticuerpos específicos para cada una de las proteínas

de interés. Para el desarrollo de los BO fue necesario implementar una nueva metodología que finalmente generó dispositivos que fueran específicos para la detección de IL-6 e IL-10, al ser un protocolo nuevo fue necesario caracterizar mediante ATR-FTIR las distintas fases del ensamblaje con la intención de garantizar que cada una de ellas se realizaran de forma correcta, por tal motivo, se obtuvieron los espectros y micrografías de las distintas fases en donde fue posible observar la modificación en la superficie de los soportes que finalmente nos permitió la detección y medición de los analitos de interés, en ese sentido, dependiendo de la fase de ensamble le correspondía una micrografía y espectro característico, esto garantizó que los resultados obtenidos y procesados correspondieran únicamente a las mediciones del analito de interés. Esto también fue corroborado mediante el seguimiento del comportamiento de la absorbancia de los picos de interés, así como el PCA en 2D y 3D de los resultados experimentales obtenidos mediante la detección con los dispositivos BO, utilizando muestras de suero pertenecientes a animales con 0 y 2h post-isquemia, este análisis demostró lograr la detección de IL-6 e IL-10 de forma específica, además, mediante la comparativa de los distintos horarios post-isquemia (0 y 2h) fue clara la diferencia en la intensidad de absorbancia y las tendencias de agrupamiento de la nube de puntos, es decir, dependiendo del grupo experimental al que fueran asignados los animales era la localización de los datos en el gráfico de PCA. Mediante este análisis numérico multivariado se logra disminuir el volumen de los datos procesados tomando en cuenta únicamente los componentes que más aportan al sistema lineal, sin perder la información que se encuentra en ella, así fue posible discriminar los resultados de forma clara, estos resultados también se homologaron con los obtenidos mediante la medición directa del suero donde la concentración máxima de proteínas en animales Isquémicos fue a las 2h, y en los datos resultantes con la medición en biosensores fue claro el incremento en la concentración de IL-6 en el mismo periodo de tiempo, cabe destacar que nuestros resultados también se han corroborado con otras metodologías que se están implementando en nuestro grupo de estudio (Verti Cervantes, 2024, González León K., 2025).

En general fue posible poder asociar los valores del componente principal 1 a los tiempos post-isquemia, y el componente principal 2 al tipo de grupo cuyos datos experimentales fueron procesados por esta técnica multivariada. Nuestros resultados correlacionan perfectamente con lo mostrado con David C.C., y Jacobs D.J en el 2014, donde presentan un método quimiométrico basado en PCA para determinar la dinámica de las proteínas.

## 9. CONCLUSIONES

Mediante el análisis por espectroscopia de infrarrojo fue posible observar y determinar la modulación de las proteínas en muestras de suero de modelo murino inducido a isquemia cerebral. Mientras que mediante el desarrollo de BO fue posible la detección específica de IL-6 e IL-10, estos dispositivos junto con la espectroscopia de ATR-FTIR demostraron ser herramientas factibles y con un alto potencial a nivel clínico para la determinación de proteínas en suero o sangre total, ya que poseen una alta especificidad y sensibilidad para detectar modificaciones incluso sutiles en las estructuras químicas que componen las proteínas. Cabe destacar que, aunque estas técnicas se han utilizado para determinar concentraciones de proteínas y otros analitos en diferentes modelos, muestras biológicas y enfermedades, este es el primer trabajo en el que se utilizan BO y ATR-FTIR para este fin en un modelo murino isquémico en diferentes esquemas post-isquémicos. Además, estas técnicas fueron excelentes alternativas para observar la modulación de la expresión proteica cuando se indujo un agente neuroprotector, como el benzoato de estradiol, en el modelo murino. Finalmente, con la implementación de la técnica de análisis multivariado PCA, la discriminación de la modulación de la expresión de las proteínas de interés, fue mucho más simple.

## 10. PERSPECTIVAS

El presente trabajo de investigación propuso una nueva metodología para la detección específica de IL-6 e IL-10 mediante el desarrollo de BO basados en matrices planares de silicio cristalino, además del uso de técnicas de espectroscopía infrarroja para la obtención de espectros pertenecientes a muestras de suero sanguíneo de individuos isquémicos a distintos horarios post-isquemia con un tratamiento con BE, esto nos permitió observar la modulación de las concentraciones proteicas, en ese sentido, este estudio es una aproximación al desarrollo de kits comerciales que sean de bajo costo y eficaces para disminuir el tiempo de medición, detección y que no requieran de personal especializado para su uso, algo que actualmente necesitan las técnicas moleculares convencionales utilizadas para la detección de proteínas.

Este tipo de estudio no ha sido realizado previamente ni con el mismo enfoque, siendo novedoso y que resulta de interés clínico, de tal forma que el conocimiento generado a partir de estas caracterizaciones permite tener un acercamiento fiable al entendimiento de las modificaciones suscitadas en las concentraciones de estas ILs y las proteínas en general en individuos isquémicos, esto ayuda a tener un panorama más amplio en el entendimiento del desarrollo fisiopatológico de la ICGA, así como de los efectos neuroprotectores de BE y podría contribuir a la mejora en el diseño de protocolos farmacológicos más eficientes, además, la ATR-FTIR y los BO pueden ser técnicas complementarias o alternativas a las convencionales, sin embargo, este estudio también presentó retos y limitaciones, como la dificultad que implica el modelo isquémico para su implementación ya que requiere de experiencia para la instauración de las cirugías, así como el entendimiento y complementariedad del conocimiento en áreas muy distintas, no obstante, los frutos académicos y científicos resultantes de esta sinergia nos motivan como grupo de investigación a continuar trabajando en conjunto y sobre la misma línea englobando nuestras áreas del conocimiento para potencializar y complementar el presente estudio.

Por lo antes descrito, tenemos planeado generar BO que estén capacitados para la detección de otras proteínas que también funcionen como biomarcadores de daño neural, como caspasas, y algunas otras ILs, tenemos particular interés en el monitoreo de IL-1 y Factor de Necrosis Tumoral Alfa, además, en un futuro cercano nuestro grupo de investigación multidisciplinario planea realizar el monitoreo en la modulación de las concentraciones proteicas reduciendo los tiempos post-isquemia, debido a que hemos concluido que las primeras horas posteriores al evento isquémico son las cruciales para limitar el daño cerebral; por ello, se trabaja en el desarrollo de una nueva metodología que permita realizar la detección de proteínas de interés en tiempo real en otro tipo de matrices en un animal con libertad de movimiento, esto sería de gran relevancia ya que lograríamos obtener datos en tiempo real sobre la modulación proteica y como distintos fármacos pueden inferir en la misma expresión de estas moléculas disminuyendo o exacerbando daño neural.



## 11. REFERENCIAS

- Allan, S. M., Tyrrell, P. J., & Rothwell, N. J. (2005). Interleukin-1 and neuronal injury. *Nature reviews. Immunology*, 5(8), 629–640. <https://doi.org/10.1038/nri1664>.
- Alvaro-Gonzalez, L. C., Freijo-Guerrero, M. M., & Sadaba-Garay, F. (2002). Inflammatory mechanisms, arteriosclerosis and ischemic stroke: clinical data and perspectives. *Revista de neurologia*, 35(5), 452-462.
- Barraza-Garza, G., de la Rosa, L. A., Martínez-Martínez, A., Castillo-Michel, H., Cotte, M., & Alvarez-Parrilla, E. (2013). La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista latinoamericana de química*, 41(3), 125-148.
- Becher, B., Spath, S., & Goverman, J. (2017). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*, 17(1), 49-59.
- Béjot, Y., Bailly, H., Graber, M., Garnier, L., Laville, A., Dubourget, L., ... & Giroud, M. (2019). Impact of the ageing population on the burden of stroke: the Dijon stroke registry. *Neuroepidemiology*, 52(1-2), 78-85.
- Beridze, M., Sanikidze, T., Shakarishvili, R., Intskirveli, N., & Bornstein, N. M. (2011). Selected acute phase CSF factors in ischemic stroke: findings and prognostic value. *BMC neurology*, 11, 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-11-41>.
- Boehme, A. K., Esenwa, C., & Elkind, M. S. (2017). Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circulation research*, 120(3), 472–495. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308398>.
- Boursin, P., Paternotte, S., Dercy, B., Sabben, C., & Maïer, B. (2018). Semantics, epidemiology and semiology of stroke. *Soins; la revue de reference infirmiere*, 63(828), 24-27.

- Breder, C. D., Tsujimoto, M., Terano, Y., Scott, D. W., & Saper, C. B. (1993). Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system. *The Journal of comparative neurology*, 337(4), 543–567. <https://doi.org/10.1002/cne.903370403>.
- Buttini, M., Sauter, A., & Boddeke, H. W. (1994). Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain research. Molecular brain research*, 23(1-2), 126–134. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(94\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0169-328x(94)90218-6).
- Carmona, P., Molina, M., Calero, M., Bermejo-Pareja, F., Martínez-Martín, P., & Toledano, A. (2013). Discrimination analysis of blood plasma associated with Alzheimer's disease using vibrational spectroscopy. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 34(4), 911–920. <https://doi.org/10.3233/JAD-122041>.
- Castillo, J., & Rodríguez, I. (2003). Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovascular Diseases*, 17(Suppl. 1), 7-18.
- Chaemsaitong, P., Romero, R., Korzeniewski, S. J., Martinez-Varea, A., Dong, Z., Yoon, B. H., Hassan, S. S., Chaiworapongsa, T., & Yeo, L. (2016). A rapid interleukin-6 bedside test for the identification of intra-amniotic inflammation in preterm labor with intact membranes. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 29(3), 349–359. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1006620>.
- Camerlingo, C., Portaccio, M., d'Apuzzo, F., Nucci, L., Perillo, L., & Lepore, M. (2022).  $\mu$ -FTIR,  $\mu$ -Raman, and SERS analysis of Amide I spectral region in oral biofluid samples during orthodontic treatment. *Sensors*, 22(20), 7874.
- Charalampopoulos, I., ALEXAKI, V. I., Tsatsanis, C., Minas, V., Dermitzaki, E., Lasaridis, I., ... & Gravanis, A. (2006). Neurosteroids as endogenous inhibitors

of neuronal cell apoptosis in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1088(1), 139-152.

- Chen, Y., Cao, S., Chen, H., Yin, C., Xu, X., & Yang, Z. (2021). Dexmedetomidine Preconditioning Reduces Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats by Inhibiting the PERK Pathway. O Pré-Condicionamento com Dexmedetomidina Reduz a Lesão de Isquemia-Reperusão do Miocárdio em Ratos, Inibindo a Via PERK. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 117(6), 1134–1144. <https://doi.org/10.36660/abc.20200672>.
- Chi, C. H., Huang, Y. Y., Ye, S. Z., Shao, M. M., Jiang, M. X., Yang, M. Y., ... & Li, X. M. (2021). Interleukin-10 level is associated with post-stroke depression in acute ischaemic stroke patients. *Journal of Affective Disorders*, 293, 254-260.
- Chiappetta, O., Gliozzi, M., Siviglia, E., Amantea, D., Morrone, L. A., Berliocchi, L., Bagetta, G., & Corasaniti, M. T. (2007). Evidence to implicate early modulation of interleukin-1beta expression in the neuroprotection afforded by 17beta-estradiol in male rats undergone transient middle cerebral artery occlusion. *International review of neurobiology*, 82, 357–372. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(07\)82019-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(07)82019-8).
- CJ, S. (2004). Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol.*, 15, 4-2.
- Climent, E., Benaiges, D., & Pedro-Botet, J. (2020). Lipid-lowering treatment in secondary prevention of ischaemic cerebrovascular disease. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis (English Edition)*, 32(4), 175-182.
- Compagnone, N. A., & Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in neuroendocrinology*, 21(1), 1-56.
- Coomes, E. A., & Haghbayan, H. (2020). Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis. *Reviews in medical virology*, 30(6), 1–9. <https://doi.org/10.1002/rmv.2141>.

- Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), 91–100. <https://doi.org/10.1042/EBC20150010>.
- David, C.C., Jacobs, D.J. 2014. Principal Component Analysis: A method for determining the essential dynamics of proteins. *Methods Mol Biol.* 2014; 1084: 193–226. doi: 10.1007/978-1-62703-658-0\_11
- Delgado Macuil R.J.; González León K.; Beltrán Perez K. (2021). Neuropson (Opn5) detection in the brain tissue of a murine model using long period fiber grating (LPFG). *Optics and laser Technology* 139:106972. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2021.106972>
- Denes, A., McColl, B. W., Leow-Dyke, S. F., Chapman, K. Z., Humphreys, N. E., Grecnis, R. K., Allan, S. M., & Rothwell, N. J. (2011). Experimental stroke-induced changes in the bone marrow reveal complex regulation of leukocyte responses. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(4), 1036–1050. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.198>.
- Dietrich, A. K., Humphreys, G. I., & Nardulli, A. M. (2015). Expression of estrogen receptor  $\alpha$  in the mouse cerebral cortex. *Molecular and cellular endocrinology*, 406, 19-26.
- Emsley, H. C., Smith, C. J., Gavin, C. M., Georgiou, R. F., Vail, A., Barberan, E. M., Illingworth, K., Scarth, S., Wickramasinghe, V., Hoadley, M. E., Rothwell, N. J., Tyrrell, P. J., & Hopkins, S. J. (2007). Clinical outcome following acute ischaemic stroke relates to both activation and autoregulatory inhibition of cytokine production. *BMC neurology*, 7, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-7-5>.
- Esenwa, C. C., & Elkind, M. S. (2016). Inflammatory risk factors, biomarkers and associated therapy in ischaemic stroke. *Nature reviews. Neurology*, 12(10), 594–604. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.125>.
- Fassbender, K., Schmidt, R., Mössner, R., Daffertshofer, M., & Hennerici, M. (1994). Pattern of activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in acute

- stroke. Relation to acute confusional state, extent of brain damage, and clinical outcome. *Stroke*, 25(6), 1105–1108. <https://doi.org/10.1161/01.str.25.6.1105>.
- Fahmi, R. M., & Elsaid, A. F. (2016). Infarction size, interleukin-6, and their interaction are predictors of short-term stroke outcome in young Egyptian adults. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 25(10), 2475-2481.
  - Ferrarese, C., Mascarucci, P., Zoia, C., Cavarretta, R., Frigo, M., Begni, B., Sarinella, F., Frattola, L., & De Simoni, M. G. (1999). Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(9), 1004–1009. <https://doi.org/10.1097/00004647-199909000-00008>.
  - Fortis, C., Foppoli, M., Gianotti, L., Galli, L., Citterio, G., Consogno, G., Gentilini, O., & Braga, M. (1996). Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. *Cancer letters*, 104(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(96\)04213-9](https://doi.org/10.1016/0304-3835(96)04213-9).
  - Gandhi, N. A., Bennett, B. L., Graham, N. M., Pirozzi, G., Stahl, N., & Yancopoulos, G. D. (2016). Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. *Nature reviews Drug discovery*, 15(1), 35-50.
  - GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet (London, England)*, 392(10159), 1789–1858. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7).
  - Germolec, D. R., Shipkowski, K. A., Frawley, R. P., & Evans, E. (2018). Markers of inflammation. *Immunotoxicity testing: Methods and protocols*, 57-79.
  - Ginsberg M. D. (2008). Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*, 55(3), 363–389. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.12.007>.

- González León K. Tesis de Doctorado. Título XXXXX(Datos no publicados) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Físico Matemáticas.
- González León K.; Beltran Perez G.; Muñoz Aguirre S.; López Gayou V.; Castillo Mixcoatl J.; Alatríste V.; Delgado Macuil R.J. (2020). Experimental characterization of a biosensor based on a tapered optical fiber for kisspeptin detection. 59(13):D131-D137. <https://doi.org/10.1364/AO.383487>
- Hallenbeck, J. M. (2002). The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nature medicine*, 8(12), 1363-1368.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal*, 374(Pt 1), 1–20. <https://doi.org/10.1042/BJ20030407>.
- Herring, B. P., Hoggatt, A. M., Griffith, S. L., McClintick, J. N., & Gallagher, P. J. (2017). Inflammation and vascular smooth muscle cell dedifferentiation following carotid artery ligation. *Physiological genomics*, 49(3), 115–126. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00095.2016>.
- Herrmann, O., Tarabin, V., Suzuki, S., Attigah, N., Coserea, I., Schneider, A., ... & Schwaninger, M. (2003). Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23(4), 406-415.
- Hill, J. K., Gunion-Rinker, L., Kulhanek, D., Lessov, N., Kim, S., Clark, W. M., Dixon, M. P., Nishi, R., Stenzel-Poore, M. P., & Eckenstein, F. P. (1999). Temporal modulation of cytokine expression following focal cerebral ischemia in mice. *Brain research*, 820(1-2), 45–54. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)01140-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)01140-8).
- Huang, J., Ali, N., Quansah, E., Guo, S., Noutsias, M., Meyer-Zedler, T., Bocklitz, T., Popp, J., Neugebauer, U., & Ramoji, A. (2021). Vibrational Spectroscopic Investigation of Blood Plasma and Serum by Drop Coating

Deposition for Clinical Application. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 2191. <https://doi.org/10.3390/ijms22042191>.

- Jatene, F. B., & Bernardo, W. M. (2003). Isquemia pulmonar embólica: aspectos clínicos e experimentais [Pulmonary embolic ischemia: clinical and experimental aspects]. *Revista da Associação Médica Brasileira* (1992), 49(3), 342–348. <https://doi.org/10.1590/s0104-42302003000300042>.
- JJ, L. G., & de Luis Román, D. A. (2021). Influence of prior ischemic events on the nutritional status of patients hospitalized for stroke. *Nutricion Hospitalaria*, 38(4), 773-779.
- Kowalska, J., Gajda, M., Kwiatek, W., Franczyk-Żarów, M., Kostogrys, R., Chłopicki, S., ... & Dumas, P. (2012). Chemical Composition of Atherosclerotic Plaques of apoE/LDLR-Double Knockout Mice by Synchrotron Radiation FTIR Microspectroscopy. *Acta Physica Polonica A*, 121(2), 555-560.
- Kramár, E. A., Babayan, A. H., Gall, C. M., & Lynch, G. (2013). Estrogen promotes learning-related plasticity by modifying the synaptic cytoskeleton. *Neuroscience*, 239, 3-16.
- Krishnamurthi, R. V., Ikeda, T., & Feigin, V. L. (2020). Global, regional and country-specific burden of ischaemic stroke, intracerebral haemorrhage and subarachnoid haemorrhage: a systematic analysis of the global burden of disease study 2017. *Neuroepidemiology*, 54(2), 171-179.
- Kriz, J., & Lalancette-Hébert, M. (2009). Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. *Acta neuropathologica*, 117, 497-509.
- Kumari, N., Dwarakanath, B. S., Das, A., & Bhatt, A. N. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(9), 11553–11572. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5098-7>.
- Kurashiki, Y., Kagusa, H., Yagi, K., Kinouchi, T., Sumiyoshi, M., Miyamoto, T., Shimada, K., Kitazato, K.T., Uto, Y., Takagi, Y. 2023. Role of post-ischemic phase-dependent modulation of anti-inflammatory M2-type macrophages

against rat brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 43(4):531-541. doi: 10.1177/0271678X221147090

- Lambertsen, K. L., Finsen, B., & Clausen, B. H. (2019). Post-stroke inflammation-target or tool for therapy?. *Acta neuropathologica*, 137(5), 693–714. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1930-z>.
- Lazcka, O., Del Campo, F. J., & Muñoz, F. X. (2007). Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors & bioelectronics*, 22(7), 1205–1217. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.036>.
- Li, H. L., Kostulas, N., Huang, Y. M., Xiao, B. G., van der Meide, P., Kostulas, V., ... & Link, H. (2001). IL-17 and IFN- $\gamma$  mRNA expression is increased in the brain and systemically after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Journal of neuroimmunology*, 116(1), 5-14.
- Liang, G., Luo, Z., Liu, K., Wang, Y., Dai, J., & Duan, Y. (2016). Fiber Optic Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor Technique: Fabrication, Advancement, and Application. *Critical reviews in analytical chemistry*, 46(3), 213–223. <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1045119>.
- Liesz, A., Suri-Payer, E., Veltkamp, C., Doerr, H., Sommer, C., Rivest, S., Giese, T., & Veltkamp, R. (2009). Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nature medicine*, 15(2), 192–199. <https://doi.org/10.1038/nm.1927>.
- Loddick, S. A., Turnbull, A. V., & Rothwell, N. J. (1998). Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 18(2), 176-179.
- M Murphy, B., D'Antonio, J., C Manning, M., & Al-Azzam, W. (2014). Use of the amide II infrared band of proteins for secondary structure determination and comparability of higher order structure. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(9), 880-889.
- Marx, C. E., Stevens, R. D., Shampine, L. J., Uzunova, V., Trost, W. T., Butterfield, M. I., ... & Lieberman, J. A. (2006). Neuroactive steroids are altered



in schizophrenia and bipolar disorder: relevance to pathophysiology and therapeutics. *Neuropsychopharmacology*, 31(6), 1249-1263.

- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
- Mellon, S. H., & Griffin, L. D. (2002). Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends in endocrinology & metabolism*, 13(1), 35-43.
- Misra, S., Singh, P., Mahata, R. N., Brandão, P., Roy, S., Mahapatra, A. K., & Nanda, J. (2021). Supramolecular Antiparallel  $\beta$ -Sheet Formation by Tetrapeptides Based on Amyloid Sequence. *The Journal of Physical Chemistry B*, 125(17), 4274-4285.
- Montaner, J., Rovira, A., Molina, C. A., Arenillas, J. F., Ribó, M., Chacón, P., Monasterio, J., & Alvarez-Sabín, J. (2003). Plasmatic level of neuroinflammatory markers predict the extent of diffusion-weighted image lesions in hyperacute stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(12), 1403–1407. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000100044.07481.97>.
- Moonen, S., Koper, M. J., Van Schoor, E., Schaefferbeke, J. M., Vandenberghe, R., von Arnim, C. A. F., Tousseyn, T., De Strooper, B., & Thal, D. R. (2023). Pyroptosis in Alzheimer's disease: cell type-specific activation in microglia, astrocytes and neurons. *Acta neuropathologica*, 145(2), 175–195. <https://doi.org/10.1007/s00401-022-02528-y>.
- Nakajima, M., Nito, C., Sowa, K., Suda, S., Nishiyama, Y., Nakamura-Takahashi, A., Nitahara-Kasahara, Y., Imagawa, K., Hirato, T., Ueda, M., Kimura, K., & Okada, T. (2017). Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Interleukin-10 Promote Neuroprotection in Experimental Acute Ischemic Stroke. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 6, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.06.005>.

- Pedersen, A. L., Gould, C. J., & Saldanha, C. J. (2017). Activation of the peripheral immune system regulates neuronal aromatase in the adult zebra finch brain. *Scientific Reports*, 7(1), 10191.
- Ooboshi, H., Ibayashi, S., Shichita, T., Kumai, Y., Takada, J., Ago, T., ... & Iida, M. (2005). Postischemic gene transfer of interleukin-10 protects against both focal and global brain ischemia. *Circulation*, 111(7), 913-919.
- Perini, F., Morra, M., Alecci, M., Galloni, E., Marchi, M., & Toso, V. (2001). Temporal profile of serum anti-inflammatory and pro-inflammatory interleukins in acute ischemic stroke patients. *Neurological sciences: official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 22(4), 289–296. <https://doi.org/10.1007/s10072-001-8170-y>.
- Piepke, M., Clausen, B. H., Ludewig, P., Vienhues, J. H., Bedke, T., Javidi, E., ... & Gelderblom, M. (2021). Interleukin-10 improves stroke outcome by controlling the detrimental Interleukin-17A response. *Journal of Neuroinflammation*, 18, 1-16.
- Pulsinelli, W. A., & Brierley, J. B. (1979). A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 10(3), 267-272.
- Putaala J. (2020). Ischemic Stroke in Young Adults. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 26(2), 386–414. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000833>.
- Rutz, S., & Ouyang, W. (2016). Regulation of Interleukin-10 Expression. *Advances in experimental medicine and biology*, 941, 89–116. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_5).
- Rong, T., He, M., Hua, Y., Chen, D., & Chen, M. (2020). Associations of Interleukin 10, Matrix Metalloproteinase 9, and Legumain with Blood Pressure Variability and Neurologic Outcomes in Patients with Ischemic Stroke. *International journal of general medicine*, 13, 1595–1602. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S285003>.
- Scheller, J., & Rose-John, S. (2006). Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Medical microbiology and immunology*, 195(4), 173–183. <https://doi.org/10.1007/s00430-006-0019-9>.

- Schiffer, L., Barnard, L., Baranowski, E. S., Gilligan, L. C., Taylor, A. E., Arlt, W., ... & Storbeck, K. H. (2019). Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 194, 105439.
- Schubert, L., langner, P., Ehrenberg, D., Lorenz-Fonfria, V.A., Heberle, J. 2022. Protein conformational changes and protonation dynamics probed by a single shot using quantum-cascade-laser-based IR spectroscopy. *J Chem Phys.* 156(20):204201. doi: 10.1063/5.0088526
- Scott , D.A., Renaud, D.E., Krishnasamy, S., Meric, P., Buduneli, N., Cetinkalp, S., Liu, K.Z. (2010). Diabetes-related molecular signatures in infrared spectra of human saliva. *Diabetes and Metabolic Syndrome.* 2:48. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-48>
- Smith, C. J., Emsley, H. C., Gavin, C. M., Georgiou, R. F., Vail, A., Barberan, E. M., del Zoppo, G. J., Hallenbeck, J. M., Rothwell, N. J., Hopkins, S. J., & Tyrrell, P. J. (2004). Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC neurology*, 4, 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-4-2>.
- Soni G.K.; Saima; Manhas P. Sharma R.K. (2022). Peptide-based optical biosensors: A promising approach for early stage cancer detection. *Biosensors and Bioelectronics: X.* 12:100259. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100259>
- Sotgiu, S., Zanda, B., Marchetti, B., Fois, M. L., Arru, G., Pes, G. M., Salaris, F. S., Arru, A., Pirisi, A., & Rosati, G. (2006). Inflammatory biomarkers in blood of patients with acute brain ischemia. *European journal of neurology*, 13(5), 505–513. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01280.x>.
- Spangler, J. B., Moraga, I., Mendoza, J. L., & Garcia, K. C. (2015). Insights into cytokine–receptor interactions from cytokine engineering. *Annual review of immunology*, 33(1), 139-167.

- Spera, P. A., Ellison, J. A., Feuerstein, G. Z., & Barone, F. C. (1998). IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neuroscience letters*, 251(3), 189-192.
- Strle, K., Zhou, J. H., Shen, W. H., Broussard, S. R., Johnson, R. W., Freund, G. G., ... & Kelley, K. W. (2001). Interleukin-10 in the brain. *Critical reviews in immunology*, 21(5), 427-450.
- Sun, Y., Lu, C. J., Lin, C. H., & Wen, L. L. (2009). Interleukin-1 $\beta$  is increased in the cerebrospinal fluid of patients with small infarcts. *European journal of neurology*, 16(7), 858-863.
- Suzuki, S., Tanaka, K., Nogawa, S., Nagata, E., Ito, D., Dembo, T., & Fukuuchi, Y. (1999). Temporal profile and cellular localization of interleukin-6 protein after focal cerebral ischemia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(11), 1256–1262. <https://doi.org/10.1097/00004647-199911000-00010>.
- Tanaka, T., Narazaki, M., Ogata, A., & Kishimoto, T. (2014, February). A new era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy. In *Seminars in immunology* (Vol. 26, No. 1, pp. 88-96). Academic Press.
- Tarkowski, E., Rosengren, L., Blomstrand, C., Wikkelso, C., Jensen, C., Ekholm, S., & Tarkowski, A. (1997). Intrathecal release of pro-and anti-inflammatory cytokines during stroke. *Clinical & Experimental Immunology*, 110(3), 492-499.
- Thakkar, R., Wang, R., Sareddy, G., Wang, J., Thiruvaiyaru, D., Vadlamudi, R., Zhang, Q., & Brann, D. (2016). NLRP3 Inflammasome Activation in the Brain after Global Cerebral Ischemia and Regulation by 17 $\beta$ -Estradiol. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 8309031. <https://doi.org/10.1155/2016/8309031>.
- Van Exel, E., Gussekloo, J., De Craen, A. J. M., Bootsma-Van Der Wiel, A., Frolich, M., & Westendorp, R. G. J. (2002). Inflammation and stroke: the Leiden 85-plus study. *Stroke*, 33(4), 1135-1138.

- Ventura-Arizmendi, E., & Hernández-Valencia, M. (2019). La esteroidogénesis en el síndrome de ovarios poliquísticos. *Gaceta médica de México*, 155(2), 184-190.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotechnology advances*, 28(2), 232–254. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.12.004>.
- Vertti Cervantes B., Tesis de Maestría, título XXXXX, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, 2024.
- Vila, N., Castillo, J., Dávalos, A., & Chamorro, A. (2000). Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke*, 31(10), 2325-2329.
- Vila, N., Castillo, J., Dávalos, A., Esteve, A., Planas, A. M., & Chamorro, Á. (2003). Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. *Stroke*, 34(3), 671-675.
- Voller, A., Bartlett, A., & Bidwell, D. E. (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of clinical pathology*, 31(6), 507-520.
- Wafa, H. A., Wolfe, C. D., Rudd, A., & Wang, Y. (2018). Long-term trends in incidence and risk factors for ischaemic stroke subtypes: prospective population study of the South London Stroke Register. *PLoS medicine*, 15(10), e1002669.
- Wang, C., Sharma, S. K., Olaluwoye, O. S., Alrashdi, S. A., Hasegawa, T., & Leblanc, R. M. (2019). Conformation change of  $\alpha$ -synuclein (61-95) at the air-water interface and quantitative measurement of the tilt angle of the axis of its  $\alpha$ -helix by multiple angle incidence resolution spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 183, 110401.
- Wang, W., & Vaughn, M. W. (2008). Morphology and amine accessibility of (3-aminopropyl) triethoxysilane films on glass surfaces. *Scanning*, 30(2), 65–77. <https://doi.org/10.1002/sca.20097>.

- Wang, X., Yue, T. L., Barone, F. C., White, R. F., Gagnon, R. C., & Feuerstein, G. Z. (1994). Concomitant cortical expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 23, 103-114.
- Wang, Y., Xu, K., L, Y., Feng, Q. (2015). Fourier transform infrared spectroscopy analysis of the active components in serum of rats treated with Zuogui Pill. *Journal of traditional Chinese medical sciences*. 2(4): 164-269. <https://doi.org/10.1016/j.jtcms.2016.01.006>
- Wappler, E. A., Felszeghy, K., Szilágyi, G., Gál, A., Skopál, J., Mehra, R. D., ... & Nagy, Z. (2010). Neuroprotective effects of estrogen treatment on ischemia-induced behavioural deficits in ovariectomized gerbils at different ages. *Behavioural brain research*, 209(1), 42-48.
- Wei, H., Li, B., Sun, A., & Guo, F. (2019). Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure. *Advances in experimental medicine and biology*, 1172, 79–96. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-9367-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9367-9_4).
- Yang, C., Hawkins, K. E., Doré, S., & Candelario-Jalil, E. (2019). Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 316(2), C135-C153.

## 12.PUBLICACIONES

Neuroscience Letters 736 (2020) 135299



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neulet](http://www.elsevier.com/locate/neulet)



### Research article

## Tibolone facilitates lordosis behavior through estrogen, progestin, and GnRH-1 receptors in estrogen-primed rats

Marcos García-Juárez<sup>a</sup>, Omar Montes-Narváez<sup>a</sup>, Francisco Javier Lima-Hernández<sup>b</sup>, Raymundo Domínguez-Ordoñez<sup>a</sup>, James G. Pfau<sup>c</sup>, Oscar González-Flores<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Tlaxcala, Mexico

<sup>b</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

<sup>c</sup> Centro de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa, Mexico

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Tibolone  
Lordosis  
Estrogen receptor  
Progesterone receptor  
GnRH1

### ABSTRACT

A dose-response study was made of the broad-spectrum gonadal steroid agonist tibolone (TBL) on lordosis behavior in estradiol benzoate (EB; 5 µg) primed rats. Doses of TBL (0, 1, 4, and 16 µg) were infused to the right lateral ventricle 2 h before testing. The highest dose increased lordosis quotients significantly at 240 min and 360 min following infusion. However, the intensity of lordosis was weak. In experiment 2, the TBL dose of 16 µg was selected to determine whether tamoxifen (TMX), RU486, or antide could modify the lordosis response to TBL. Infusions of the three compounds, before TBL, significantly attenuated the TBL-induced facilitation of lordosis. The results suggest that TBL stimulates lordosis by activating estrogen, progesterone, and may do so by downstream stimulation of GnRH release. The physiological role TBL plays in controlling lordosis behavior remains to be determined.

### 1. Introduction

Sexual behavior in females is stimulated by estrogens (Beyer et al. [1]). For example, rabbits, cats, or ferrets require only estradiol (E2) for the display of female sexual behavior, whereas the rats and guinea pigs need the sequential action of E2 and progesterone (P) [2] or E2 and an androgen like testosterone (T) or dihydrotestosterone (DHT) [3,4]. In addition, P, T, and DHT, lordosis can be facilitated over the E2 baseline by several compounds, including gonadotrophin releasing hormone (GnRH) [5], leptin [6], oxytocin [7], and prolactin or noradrenaline [8], serotonin, and dopamine [9]. Initial studies in female rats showed that E2 induced lordosis behavior in the absence of P. For example, (a) when a single injection of a high dose of the longer-lasting E2 benzoate (EB) is made to ovariectomised (OVX) rats [10]; (b) when rats receive, in place of P, a second-high dose of E2 [11] or EB after initial low priming of EB; and (c) when rats that have been OVX and adrenalectomised to eliminate peripheral sources of P, are exposed continuously to E2 injected with low doses for several days [12]. These results show that E2 can have both physiological effects, like priming before treatment of P, T, or DHT, or facilitate lordosis in low E2-primed rats.

Synthetic estrogens can also prime the central nervous system to

facilitate lordosis [13]. For example, the synthetic estrogen, RU-2058, was at least four times more effective than 17β-E2 in stimulating display of sexual behavior in adult OVX rats [14]; however, the administration of another synthetic estrogen, enclomiphene, enhanced the early, but not late priming action that E2 exerts on the neural substrates involved in the activation of lordosis, indicating that the presence of E2 is necessary to complete the activation of later processes not stimulated by enclomiphene [15].

Tibolone (TBL) is a synthetic steroid with a 3-keto-Δ<sup>5-10</sup> configuration, a 17α-ethinyl group, and a 7α-methyl substituent, which possesses estrogenic, androgenic, and progestogenic activities [16]; however, this steroid does not have structural characteristics that would explain its estrogenic-like effects on the vagina, brain, and bone, perhaps due to its tissue-selective metabolism, distinct receptor binding profile, and activation of enzyme regulation [17]. TBL is converted to three active metabolites: a) 3α-OH and b) 3β-OH-TBL, which are reduced metabolites that present estrogenic activity on bone, vagina, and climacteric symptoms, and b) Δ<sup>4</sup>-isomer which is similar to P or androgens, with effects that can stimulate or prevent endometrial growth. It has been classified as a "selective tissue estrogenic activity regulator (STEAR)" [18]. In addition, it has been described that treatments of the

\* Corresponding author at: Centro de Investigación en Reproducción Animal, Apartado Postal No 62, Tlaxcala, Tlax, c.p. 90000, Mexico.  
E-mail address: [oglezflo@gmail.com](mailto:oglezflo@gmail.com) (O. González-Flores).

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135299>

Received 7 May 2020; Received in revised form 15 July 2020; Accepted 5 August 2020

Available online 7 August 2020

0304-3940/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



## Research article

## Apelin-13 facilitates lordosis behavior following infusions to the ventromedial hypothalamus or preoptic area in ovariectomized, estrogen-primed rats

Marcos García-Juárez <sup>a</sup>, Ailyn Luna-Hernández <sup>a,b</sup>, Sandra Tapia-Hernández <sup>a,b</sup>, Omar Montes-Narvaez <sup>a,c</sup>, Raymundo Domínguez-Ordoñez <sup>a</sup>, Miriam B. Tecamachaltzi-Silvarán <sup>d</sup>, James G. Pfaus <sup>e</sup>, Oscar González-Flores <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Tlaxcala, Mexico

<sup>b</sup> Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

<sup>c</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

<sup>d</sup> Facultad de Ciencias para el Desarrollo Humano, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

<sup>e</sup> Department of Psychology and Life Sciences, Charles University, Prague, and Czech National Institute of Mental Health, Klecany, Czech Republic



## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Apelin-13  
Lordosis  
Preoptic area  
Ventromedial hypothalamus

## ABSTRACT

In normal hormonal conditions, increased neuronal activity in the ventromedial hypothalamus (VMH) induces lordosis whereas activation of the preoptic area (POA) exerts an opposite effect. In the present work, we explored the effect of bilateral infusion of different doses of the apelin-13 (0.37, 0.75, 1.5, and 15  $\mu\text{g}$ ) in both brain areas on the expression of lordosis behavior. Lordosis quotient and lordosis reflex score were performed at 30, 120, and 240 min. Weak lordosis was observed following the 0.37  $\mu\text{g}$  dose of apelin-13 at 30 min in the VMH of EB-primed rats; however, the rest of the doses induced significant lordosis relative to the control group. At 120 min, all doses induced lordosis behavior, while at 240 min, the highest dose of 15  $\mu\text{g}$  did not induce significant differences. Interestingly, only the 0.75  $\mu\text{g}$  infusion of apelin in the POA induced significant lordosis at 120 and 240 min. These results indicate that apelin-13 acts preferably in HVM and slightly in POA to initiate lordosis behavior in estrogen-primed rats.

## 1. Introduction

Estradiol ( $E_2$ ) and progesterone (P) secretion occur during the estrous cycles of mammal females; these physiological changes cause an increase in neuronal activity in preoptic and hypothalamic regions that control the timing of different female sexual behaviors. Activation in the ventromedial hypothalamus (VMH) coincides with the expression of lordosis; in contrast, increased neuronal activity in the preoptic area (POA) facilitates proceptive behaviors (sexual solicitations and pacing behaviors) but inhibits lordosis [1,2]. This suggests that short loop feedback between the VMH and POA coordinates the timing and expression of appetitive and consummatory aspects of female sexual behavior. Initial studies used different strategies to demonstrate the opposite effects of these brain areas on lordosis. For example, bilateral lesions of the VMH cause a decrease in the expression of lordosis behavior in ovariectomized (OVX) rats primed with  $E_2$  and P [3]

whereas electrical stimulation of this region facilitates it. Conversely, bilateral lesions of the medial POA facilitate lordosis [1] but inhibit sexual solicitations [4].

There are abundant data in the literature showing the participation of different neurotransmitter systems in the regulation of female sexual behaviors in these brain areas (noradrenergic, cholinergic, serotonergic, glutamate, or GABA systems, etc.). The role of GABA and glutamate in these regions also follows a similar reciprocal pattern: Glutamate and GABA actions in the medial POA are excitatory and inhibitory, respectively, for lordosis [5], while the administration of those neurotransmitters in the VMH has the opposite actions on lordosis [5–7]. Moreover,  $E_2$  priming increases GABA turnover in the VMH [8], an action likely due to a function of increased synthesis of the GABA biosynthetic enzyme GAD65 [9] through the activation of either the  $\alpha$  or  $\beta$  isoform of the  $E_2$  receptor [10]. The increased GABA transmission in the VMH disinhibits lordosis either by inhibiting local serotonin release (which

\* Corresponding author at: Centro de Investigación en Reproducción Animal, Apartado Postal No 62, Tlaxcala, Tlax. c.p. 90000, Mexico.

E-mail address: [oglezflo@gmail.com](mailto:oglezflo@gmail.com) (O. González-Flores).

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136518>

Received 3 November 2021; Received in revised form 20 January 2022; Accepted 7 February 2022

Available online 9 February 2022

0304-3940/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.





## Estradiol and progesterone-induced lordosis behavior is modulated by both the Kisspeptin receptor and melanin-concentrating hormone in estradiol benzoate-primed rats

Oscar González-Flores <sup>a</sup>, James G. Pfaus <sup>b,f</sup>, Ailyn Luna-Hernández <sup>a,c</sup>, Omar Montes-Narváez <sup>a,d</sup>, Raymundo Domínguez-Ordóñez <sup>a,e</sup>, Miriam B. Tecamachaltzi-Silvarán <sup>a</sup>, Marcos García-Juárez <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Tlaxcala, México

<sup>b</sup> Department of Psychology and Life Sciences, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>c</sup> Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

<sup>d</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

<sup>e</sup> Licenciatura en Ingeniería Agronómica y Zootecnia, CRC, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México

<sup>f</sup> Czech National Institute of Mental Health, Klecany, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Lordosis  
Kisspeptin  
Melanin-concentrating hormone  
Estradiol  
Progesterone

### ABSTRACT

Intracerebroventricular (ICV) administration of estradiol benzoate (E<sub>2</sub>B) and progesterone (P) induces intense lordosis behavior in ovariectomized rats primed peripherally with E<sub>2</sub>B. The present study tested the hypothesis that the Kisspeptin (Kiss) and melanin-concentrating hormone (MCH) pathways regulate female sexual behavior induced by these steroid hormones. In Experiment 1, we tested the relevance of the Kiss pathway by ICV infusion of its inhibitor, kiss-234, before administration of E<sub>2</sub>B or P in estrogen-primed rats. Lordosis induced by E<sub>2</sub>B alone or with the addition of P was reduced significantly at 30, 120, and 240 min. In Experiment 2, ICV infusion of MCH 30 min before E<sub>2</sub>B or P significantly reduced lordosis in rats primed with E<sub>2</sub>B alone. These data support the hypothesis that the Kiss and MCH pathways, which can release or modulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH), are involved in E<sub>2</sub>B- and P-induced lordosis.

### 1. Introduction

Estradiol (E<sub>2</sub>) and progesterone (P) regulate both appetitive and consummatory aspects of sexual behavior in mammalian females (Beach, 1976; Beyer et al., 2003; Pfaus et al., 2015). For example, in ovariectomized (OVX) rats, exogenous administration of estradiol benzoate (E<sub>2</sub>B) followed by P 20 to 40 h later synergizes to induce the expression of lordosis (Beach et al., 1942; Boling and Blandau, 1939; Morali and Beyer, 1979). In addition, E<sub>2</sub> and P regulate positive and negative feedback in the hypothalamus/pituitary/gonadal axis, which regulates the secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH; a peptide considered an essential component in the expression of female sexual behavior) and ovulation (Marques et al., 2000). For example, when E<sub>2</sub> concentration in the blood reaches its peak in the afternoon of proestrus in the rat or in the middle of the menstrual cycle in women, ovulation occurs through the secretion of GnRH from the hypothalamus,

which signals the sequential release of the gonadotropins follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) from the anterior pituitary gland. The subsequent release of P from the ruptured follicle coincides with an increase in the expression of both solicitations and lordosis in the rat (Mani and Blaustein, 2012) and an increase in sexual desire and arousal in women (Cappelletti and Wallen, 2016). These events are synchronized, so female sexual expression occurs when she is maximally prepared for fertilization.

Since the 1970s, a large number of studies have examined the involvement of the GnRH system in the display of female sexual behavior induced by selective agonists and antagonists, and by sensory stimuli caused by the male during copulation (Asizi et al., 2021; Caligioni et al., 2007; Casadonte et al., 2011; Sakuma, 2002) and more recently by us (Domínguez-Ordóñez et al., 2018; García-Juárez et al., 2020; Gómez-Arrati et al., 2008). As noted above, synergistic action between E<sub>2</sub> and P generates intense female sexual behavior in rodents;

\* Corresponding author at: Centro de Investigación en Reproducción Animal, Apartado Postal No 62, Tlaxcala, Tlax. c.p. 90000, México.  
E-mail address: [garcia.juarez\\_marcos@yahoo.com.mx](mailto:garcia.juarez_marcos@yahoo.com.mx) (M. García-Juárez).

<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2022.105257>

Received 26 April 2022; Received in revised form 22 August 2022; Accepted 30 August 2022

Available online 14 September 2022

0018-506X/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.



## Participation of kisspeptin, progesterone, and GnRH receptors on lordosis behavior induced by kisspeptin

Oscar González-Flores <sup>a</sup>, Raymundo Domínguez-Ordóñez <sup>b</sup>, Raul Jacobo Delgado-Macuil <sup>c</sup>, José Luis Tlachi-López <sup>d</sup>, Ailyn Luna-Hernández <sup>e</sup>, Omar Montes-Narváez <sup>e</sup>, James G. Pfaus <sup>f,g</sup>, Marcos García-Juárez <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Tlaxcala, México

<sup>b</sup> Licenciatura en Ingeniería Agronómica y Zootecnia, CRC, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México

<sup>c</sup> Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Santa Inés, Tlaxtecohuacan, Tlaxcala, México

<sup>d</sup> Instituto de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Veracruz, México

<sup>e</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

<sup>f</sup> Center for Sexual Health and Intervention, Czech National Institute of Mental Health, Klecary, Czech Republic

<sup>g</sup> Department of Psychology and Life Sciences, Charles University, Prague, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Lordosis behavior

Kisspeptin

Kiss-234

RU486

Antide

### ABSTRACT

The neuropeptide kisspeptin (Kiss) is crucial in regulating the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. It is produced by two main groups of neurons in the hypothalamus: the rostral periventricular region around the third ventricle and the arcuate nucleus. Kiss is the peptide product of the KISS-1 gene and serves as the endogenous agonist for the GPR54 receptor. The Kiss/GPR54 system functions as a critical regulator of the reproductive system. Thus, we examined the effect of intracerebroventricular administration of 3 µg of Kiss to the right lateral ventricle of ovariectomized rats primed with a dose of 5 µg subcutaneous (sc) of estradiol benzoate (EB). Kiss treatment increased the lordosis quotient at all times tested. However, the lordosis reflex score was comparatively lower yet still significant compared to the control group. To investigate receptor specificity and downstream mechanisms on lordosis, we infused 10 µg of GPR54 receptor antagonist, Kiss-234, 5 µg of the progesterin receptor antagonist, RU486, or 3 µg of antide, a gonadotropin-releasing hormone-1 (GnRH-1) receptor antagonist, to the right lateral ventricle 30 min before an infusion of 3 µg of Kiss. Results demonstrated a significant reduction in the facilitation of lordosis behavior by Kiss at 60 and 120 min when Kiss-234, RU486, or antide were administered. These findings suggest that Kiss stimulates lordosis expression by activating GPR54 receptors on GnRH neurons and that Kiss/GPR54 system is an essential intermediary by which progesterone activates GnRH.

### 1. Introduction

The orchestration of reproductive behaviors in mammals involves a complex interplay of various neuropeptides, hormones, and receptors within the central nervous system (CNS). Among these, kisspeptin (Kiss), a neuropeptide encoded by the *Kiss1* gene, has emerged as a crucial regulator of reproductive function, particularly in ovulation induction [1–5]. Kiss neurons are predominantly distributed in two critical areas of the hypothalamus: the arcuate nucleus (ARC) and the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) [6,7]. These neurons play a pivotal role in translating sex steroid feedback into neuroendocrine signals, thereby influencing gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion and

subsequent gonadotropin release [8].

Neurons in the ARC regulate the pulsatile release of GnRH, while those in the AVPV are implicated in regulating the surge of luteinizing hormone (LH) and ovulation [9–13]. Notably, Kiss neurons exhibit high expression of estrogen receptor alpha (ERα) and progesterone receptor (PR), indicating their responsiveness to sex steroid feedback [14–16]. Additionally, recent studies have highlighted the involvement of Kiss in the modulation of lordosis behavior, a crucial aspect of female sexual receptivity [17–19].

For instance, previous research by Kauffman et al. [17] investigated the role of the Kiss receptor, GPR54, in female mice sexual behavior, and found no significant differences in lordosis behavior between wild-type

\* Corresponding author at: Centro de Investigación en Reproducción Animal, Apartado Postal No 62, Tlaxcala, Tlax. c.p. 90000, México.  
E-mail address: [mgarciaj@uatx.mx](mailto:mgarciaj@uatx.mx) (M. García-Juárez).

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2024.114609>

Received 4 April 2024; Received in revised form 27 May 2024; Accepted 5 June 2024

Available online 6 June 2024

0031-9384/© 2024 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.



Contents lists available at ScienceDirect

Hormones and Behavior

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yhbeh](http://www.elsevier.com/locate/yhbeh)

## Disruptions in reproductive health, sex hormonal profiles, and hypothalamic hormone receptors content in females of the C58/J mouse model of autism

Isabel Barón-Mendoza<sup>a</sup>, Mónica Martínez-Marcial<sup>a</sup>, Marcos García-Juárez<sup>b</sup>,  
 Montserrat Mejía-Hernández<sup>a</sup>, Yesenia Cortés-Sánchez<sup>a</sup>, Carmen J. Zamora-Sánchez<sup>c</sup>,  
 Jorge Omar García-Rebollar<sup>a</sup>, Roberto Chavira-Ramírez<sup>d</sup>, David Ordaz-Rosado<sup>d</sup>,  
 Ignacio Camacho-Arroyo<sup>c</sup>, Miriam Betzabe Tecamachalzi-Silvarán<sup>e</sup>, Omar Montes-Narváez<sup>b</sup>,  
 Oscar González-Flores<sup>b</sup>, Rocío García-Becerra<sup>e</sup>, Aliesha González-Arenas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

<sup>b</sup> Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Tlaxcala, México

<sup>c</sup> Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México

<sup>d</sup> Departamento de Biología de la Reproducción Dr. Carlos Guadalupe Castro, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 14080 Ciudad de México, México

<sup>e</sup> Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

<sup>f</sup> Facultad de Ciencias para el Desarrollo Humano, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Autism  
 Reproduction  
 Estrous cycle  
 Estradiol  
 Progesterone  
 Hypothalamus  
 Mouse  
 Estrogen receptor

### ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is characterized by differences in social communication and interaction, as well as areas of focused interests and/or repetitive behaviors. Recent studies have highlighted a higher prevalence of endocrine and reproductive disturbances among females on the autism spectrum, hinting at potential disruptions within the hypothalamus-pituitary-ovary (HPO) axis. This research aims to explore the reproductive health disparities in ASD using an animal model of autism, the C58/J inbred mouse strain, with a focus on reproductive performance and hormonal profiles compared to the C57BL/6J control strain.

Our findings revealed that the estrous cycle in C58/J females is disrupted, as evidenced by a lower frequency of complete cycles and a lack of cyclical release of estradiol and progesterone compared to control mice. C58/J females also exhibited poor performance in several reproductive parameters, including reproductive lifespan and fertility index. Furthermore, estrogen receptor alpha content showed a marked decrease in the hypothalamus of C58/J mice. These alterations in the estrous cycle, hormonal imbalances, and reduced reproductive function imply dysregulation in the HPO axis. Additionally, our in-silico study identified a group of genes involved in infertility carrying single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the C58/J strain, which also have human orthologs associated with autism. These findings could offer valuable insights into the molecular underpinnings of neuroendocrine axis disruption and reproductive issues observed in ASD.

### 1. Introduction

Autism Spectrum Disorder (ASD) is characterized by differences in social communication and interaction, as well as areas of focused interests and/or repetitive behaviors (American Psychiatric Association, 2022; Bottema-Beutel et al., 2021). Notably, girls and women on the

autism spectrum exhibit a higher prevalence of endocrine, menstrual, and reproductive health conditions compared to neurotypical individuals (Kassee et al., 2020). These conditions include infertility, irregular menstruation, polycystic ovary syndrome, premenstrual dysphoric disorder (Casanova et al., 2018), and an increased risk of complications during pregnancy, such as preeclampsia and preterm

\* Corresponding author.

E-mail address: [aliesha@iibimedicas.unam.mx](mailto:aliesha@iibimedicas.unam.mx) (A. González-Arenas).

<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2024.105593>

Received 25 April 2024; Received in revised form 12 June 2024; Accepted 14 June 2024

Available online 22 June 2024

0018-506X/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A:  
Molecular and Biomolecular Spectroscopyjournal homepage: [www.journals.elsevier.com/spectrochimica-acta-part-a-molecular-and-biomolecular-spectroscopy](http://www.journals.elsevier.com/spectrochimica-acta-part-a-molecular-and-biomolecular-spectroscopy)

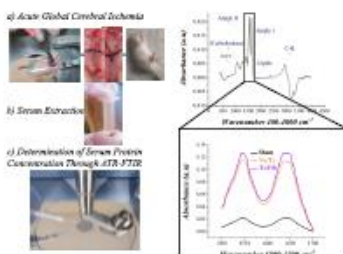
## ATR-FTIR spectroscopy to evaluate serum protein expression in a murine cerebral ischemia model

Omar Montes-Narváez<sup>a,b</sup>, Marcos García-Juárez<sup>a,c</sup>, Georgina Beltrán-Pérez<sup>c</sup>,  
Claudia Espinosa-García<sup>d,e</sup>, Oscar González-Flores<sup>a</sup>, Raúl Jacobo Delgado-Macuil<sup>f</sup><sup>a</sup> Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Plaza Hidalgo S/N. San Nicolás Panotla, C.P. 90140 Tlaxcala, Mexico<sup>b</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala 90000, Mexico<sup>c</sup> Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico<sup>d</sup> Department of Neurology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA 30322, USA<sup>e</sup> Department of Neurology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA<sup>f</sup> Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Tepetlilla, Tlaxcala 90700, Mexico

## HIGHLIGHTS

- Absorbance in Sham animals was lower than in ischemic and ischemic + EB animals.
- Maximum absorbance in ischemic animals occurred at 2 h vs. Sham and ischemic + EB.
- Maximum absorbance in ischemic + EB animals occurred at 4 h and 6 h vs. Sham and ischemic.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
ATR-FTIR spectroscopy  
Serum  
Cerebral ischemia  
Protein expression

## ABSTRACT

Stroke is a prevalent vascular disease that causes disability and death worldwide. Molecular techniques have been developed to assess serum concentrations of biomarkers associated with this disease, such as some proteins. ATR-FTIR was proposed as an alternative technique to determine protein expression during the early stages of stroke. Serum samples from sham, ischemic, and ischemic treated with estradiol benzoate (EB; as a neuroprotective agent) male rats were evaluated at 0, 2, 4, 6, 12, and 24-hours post-ischemia. The analysis was developed in the mid-infrared region but mainly focused on the protein region ( $1500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ ), where it was possible to observe the modulation in the absorbance intensity. The peaks at  $1545$ ,  $1645$ ,  $1635$ , and  $1650\text{ cm}^{-1}$  associated with amide II, amide I,  $\beta$ -sheets, and  $\alpha$ -helices, respectively, were prominent peaks where protein modulation was observed. The results demonstrate that infrared spectroscopy could be a good alternative technique to determine the modulation of protein expression during stroke events.

\* Corresponding author at: Centro de Investigación en Reproducción Animal, Apartado Postal No 62, Tlaxcala, Tlax. c.p. 90000, Mexico.  
E-mail address: [mgarciaj@uatax.mx](mailto:mgarciaj@uatax.mx) (M. García-Juárez).

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.125261>

Received 16 April 2024; Received in revised form 22 September 2024; Accepted 5 October 2024

Available online 9 October 2024

1386-1425/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

## 13.ANEXOS

*Neuroscience 2022*  
*November 12-16, 2022*

Please let this serve to certify that

***Omar Montes***

has attended Neuroscience 2022 online.

The Society for Neuroscience (SfN) is a nonprofit membership organization of basic scientists and physicians who study the brain and nervous system. The Society's primary goal is to promote the exchange of information among researchers. For this purpose, SfN holds a prestigious annual meeting, attended by scientists and researchers from around the globe. It is considered the most important annual forum for the neuroscience research community, offering attendees the opportunity to learn about the latest advances in brain research.

Sincerely,



Kyle Hayden, CMP  
Director, Meeting Programs and Attendee Services  
Society for Neuroscience

*Neuroscience 2023  
November 11-15, 2023*

Please let this serve to certify that

**Omar Montes**

has attended Neuroscience 2023 online.

The Society for Neuroscience (SfN) is a nonprofit membership organization of basic scientists and physicians who study the brain and nervous system. The Society's primary goal is to promote the exchange of information among researchers. For this purpose, SfN holds a prestigious annual meeting, attended by scientists and researchers from around the globe. It is considered the most important annual forum for the neuroscience research community, offering attendees the opportunity to learn about the latest advances in brain research.

Sincerely,



Kyle Hayden, CMP  
Director, Meeting Programs and Attendee Services  
Society for Neuroscience

2023. Año de Francisco Villa  
30 Aniversario de la Declaración sobre  
la Eliminación de la Violencia contra la Mujer (ONU)  
60 Aniversario del CECyT 7 "Cuauhtémoc" y del CENAC  
90 Aniversario de la Escuela Superior de Ingeniería Textil  
40 Aniversario del CIDIR, Unidad Oaxaca

Oficio número CIBA/SA/POS/531/2023

**Asunto**  
Constancia

Tepetitla de Lardizábal; Tlaxcala., 07 de junio de 2023.

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Se hace constar que el (a) *M. en C. Omar Montes Narváez*, se encuentra realizando Estancia de Investigación de Posgrado en el Centro de Investigación En Biotecnología Aplicada Unidad Tlaxcala, durante el periodo del 23 de enero al 28 de julio del 2023; a cargo del Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil, Profesor Investigador adscrito a este Centro.

Se extiende la presente CONSTANCIA para los usos legales que se estimen pertinentes a los siete días del mes de junio del año dos mil veintitrés.

ATENTAMENTE  
"La Técnica al Servicio de la Patria"

  
Dra. María del Carmen Rodríguez López  
Subdirectora Académica y de Investigación  
  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada  
Unidad Tlaxcala  
Subdirección Académica y de Investigación



Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
División de Ciencias Biológicas  
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



## CONSTANCIA

**A Omar Montes Narváez**

Estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas

Por impartir el seminario

**"ATR-FTIR spectroscopy to evaluate protein expression in plasma, after cerebral ischemia, in murine model.**

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"  
TLAXCALA, TLAX., A 07 DE AGOSTO DEL 2023



DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO  
COORD. GENERAL DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Sistema Institucional de Autogestión de la Calidad Certificado bajo la Norma: ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015

PCB/23-01/060-rsl





**Universidad Autónoma de Tlaxcala**  
**Facultad de Ciencias de la Salud**  
**PRIMER FORO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN**  
**EN SALUD**  
**"INVESTIGACIÓN MULTIDISCIPLINARIA EN SALUD"**



Otorgan la presente

# Reconocimiento

**Montes Narvaés Omar**

Por su destacada participación en presentación del cartel "Detección de biomarcadores neuroinflamatorios y concentraciones plasmáticas proteicas, en modelo de isquemia cerebral global en rata, mediante biosensores ópticos y espectroscopía infrarroja" realizada el día 24 de noviembre del año en curso.

**ATENTAMENTE**  
"Por la Cultura a la Justicia Social".  
Zacatelco, Tlax., a 24 de Noviembre de 2023.



MSP. José Francisco Mauricio García  
Director de Facultad

MCSP. Irma Lumbreras Delgado  
Secretaria de Facultad

Sistema Institucional de Autogestión de Calidad  
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IRMIC-2015





El Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología  
otorga la presente

## CONSTANCIA

a

Omar Montes Narváez

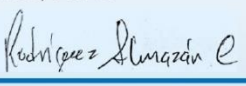
Por su participación como **PONENTE** en el "2º. Simposio Nacional  
de Biosensores"  
celebrado los días 27, 28 y 29 de junio de 2023.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2023



  
Dra. Ma. Herlinda Montiel Sánchez  
Directora  
ICAT, UNAM

  
Dra. Claudia Rodríguez Almazán  
Comité Organizador  
ICAT, UNAM



El Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología  
otorga la presente

# CONSTANCIA

a

Omar Montes Narváez

Por su participación en la presentación de **PÓSTER** en el  
"2º. Simposio Nacional de Biosensores"  
celebrado los días 27, 28 y 29 de junio de 2023.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2023



Dra. Ma. Herlinda Montiel Sánchez  
Directora  
ICAT, UNAM

Dra. Claudia Rodríguez Almazán  
Comité Organizador  
ICAT, UNAM

# AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



## XLIV

### ENCUENTRO NACIONAL DE LA AMIDIQ

Investigación e industria: inclusión, retos y oportunidades  
para la Ingeniería Química en México

## UDLAP

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia  
en Ingeniería Química A.C.

otorga el presente

## RECONOCIMIENTO

a:

**Brenda Vertti Cervantes, Raúl J. Delgado Macuil, Georgina Beltrán Pérez,  
Karina González León, Omar Montes Narváez, Marcos García Juárez.**

**Por la presentación del trabajo:**

**DETERMINACIÓN DE INTERLEUCINA 6 (IL-6) EN PLASMA SANGUÍNEO DE UN MODELO MURINO  
ISQUÉMICO CON TRATAMIENTO DE BENZOATO DE ESTRADIOL MEDIANTE BIOSENSORES DE FIBRA  
ÓPTICA.**

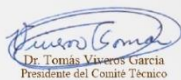
En el área de **BIOTECNOLOGÍA** en modalidad **ORAL**

ID: 910

**XLIV Encuentro Nacional de la AMIDIQ**

  
Dr. Aarón Romo Hernández  
Presidente del Comité Organizador

  
Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz  
Presidente Nacional de la AMIDIQ

  
Dr. Tomás Viveros García  
Presidente del Comité Técnico

Huatulco, Oaxaca, México 30 de mayo al 2 de junio de 2023

La **Dirección de Comunicación del Conocimiento**, de la Universidad Autónoma Metropolitana, otorga la presente constancia al:

**Mtro. Omar  
Montes Nárvaez**

Por su asesoría en la cápsula del episodio

**Descifrando el cerebro:  
¿vamos hacia Black Mirror?**

como parte de la 14a temporada de Ciencia abierta al tiempo, transmitida a través de UAM Radio 94.1 FM el 8 de diciembre de 2023.



Dr. Mario Andrés De Leo Winkler  
Director de Comunicación  
del Conocimiento



Fis. Miriam Carrillo Barragán  
Jefa de Fomento  
del Conocimiento

La **Dirección de Comunicación del Conocimiento**, de la Universidad Autónoma Metropolitana, otorga la presente constancia al:

**Mtro. Omar  
Montes Nárvaez**

Por su participación en el episodio:

**Descifrando el cerebro:  
¿vamos hacia Black Mirror?**

como parte de la 14a temporada de Ciencia abierta al tiempo, transmitido a través de UAM Radio 94.1 FM el 10 de diciembre de 2023.



Dr. Mario Andrés De Leo Winkler  
Director de Comunicación  
del Conocimiento



Fis. Miriam Carrillo Barragán  
Jefa de Fomento  
del Conocimiento

## XIX Reunión Anual AMEVASC – Reunión Virtual



La Asociación Mexicana de Enfermedad Vascular Cerebral, A.C.

Otorga el presente reconocimiento a: Omar Montes Narváez

Por su participación como **ASISTENTE** a la XIX Reunión anual de AMEVASC – Reunión Virtual, la cual se realizó en la plataforma <https://amevasc.com.mx> "AMEVASC Online", y constó de 18 horas no presenciales de Educación Médica Continua, equivalente a **1.12** créditos de Educación Superior.

Dr. Luis Manuel Murillo Bonilla  
Presidente AMEVASC

Dr. Carlos Alberto Espinoza Casillas  
Secretario AMEVASC

Dra. Carolina León Jiménez  
Secretario AMEVASC



jueves, 13 de mayo de 2021



La Asociación Mexicana de Enfermedad Vasculare Cerebral, A.C. Otorga el presente reconocimiento a:

***Omar Montes Narváez***

por su asistencia al

***Curso Virtual de la XX Reunión Anual de AMEVASC***

el cual consta de 26.4 horas de Educación Médica Continúa en línea, equivalente a 1.68 créditos

lunes, 26 de abril de 2021

Carlos Alberto Espinoza Casillas  
Secretario AMEVASC

Dr. Luis Manuel Murillo Bonilla  
Presidente AMEVASC

Carolina Leon Jimenez  
Tesorera AMEVASC

h44K6fVjRL



REGIDURIA  
DE SALUD

EL H. AYUNTAMIENTO DE AMAXAC DE  
GUERRERO OTORGA EL PRESENTE



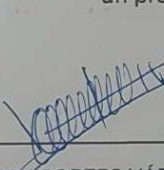
# DIPLOMA

A:

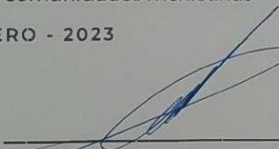
*Dr. Omar Montes Narváez*

Por haber impartido la conferencia "La enfermedad vascular cerebral,  
un problema mortal en las comunidades mexicanas"

03 - FEBRERO - 2023

  
LIC. NANCY CORTES VÁZQUEZ  
Presidenta Municipal de  
Amaxac de Guerrero.



  
DR. GREGORIO HERNÁNDEZ PÉREZ  
Regidor de Salud Pública  
y Desarrollo Social.



4to REGIDOR  
GREGORIO HERNÁNDEZ PÉREZ  
COMISIÓN DE SALUD PÚBLICA Y  
DESARROLLO SOCIAL  
AMAXAC DE GRO. TLAX.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA**  
**Facultad de Trabajo Social, Sociología,  
Psicología y Psicoterapia**

Otorga la presente

# Constancia

**A: Mtro. Omar Montes Narváez**

Por su participación de ponente en la conferencia Magistral titulada **"LOS ACCIDENTES CEREBRO-VASCULARES Y SUS IMPLICACIONES PSICOSOCIALES EN LA POBLACIÓN MEXICANA"**, con una duración de 2 horas.

**"Por la Cultura a la Justicia Social"**  
Tlaxcala, Tlax., a 22 de febrero del 2023

  
**Mtra. Paola Vez Ramos**  
Directora

  
**Dra. Karina Sánchez**  
Coordinadora de la Licenciatura  
en Psicoterapia

  
  
400c-RG-22  
Folio: 222\_P23\_FTSSPyP



# XXVI INTERNATIONAL COURSE Biological Bases of Behavior



SE OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA A:

*Omar Montes Narváez*

POR ASISTIR AL "XXVI INTERNATIONAL COURSE  
BIOLOGICAL BASES OF BEHAVIOUR"

Dr. JORGE CONTRERAS GARDUÑO  
Organizador

Dr. LUIS FELIPE MENDOZA CUENCA  
Organizador



Campaña de  
**REFORESTACIÓN**  
2023



EL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
a través del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, otorga la presente

## CONSTANCIA

a: Omar Montes Narváez

Por participar en la "Campaña de reforestación 2023", en el marco del  
Día de la Tierra, el día 21 de abril de 2023.

DRA. DIANA VERÓNICA CORTÉS ESQUIVEL  
DIRECTORA INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada  
Unidad Tlaxcala  
DIRECCIÓN



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**  
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado  
Centro de Investigación en Reproducción Animal

Otorga la presente:

# CONSTANCIA

Al:

*M. en C. Omar Montes Narváez*

Por su valiosa participación como PONENTE con la conferencia titulada **"Efecto del benzoato de estradiol sobre la expresión de las interleucinas 6 y 10 en el modelo de isquemia cerebral global aguda en la rata, determinado por biosensores ópticos basados en matrices planares de silicio"** en el marco del Simposio: **Nuevas estrategias metodológicas para el estudio de lesiones cerebrales y tisulares.**

Tlaxcala, Tlax., a 27 de septiembre del 2023

  
Dr. Marcos García Juárez  
Organizador

  
Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil  
Organizador

  
Dr. Oscar González Flores  
Organizador



Coloquio



**“CONSERVANDO LA MALINCHE:  
APORTACIONES CIENTÍFICAS Y SOCIALES  
DE LOS UNIVERSITARIOS”**

Parte 2

Otorga la presente

**CONSTANCIA**

A

**Omar Montes Narváez**

**Doctorado - Posgrado en Ciencias Biológicas  
Universidad Autónoma de Tlaxcala**

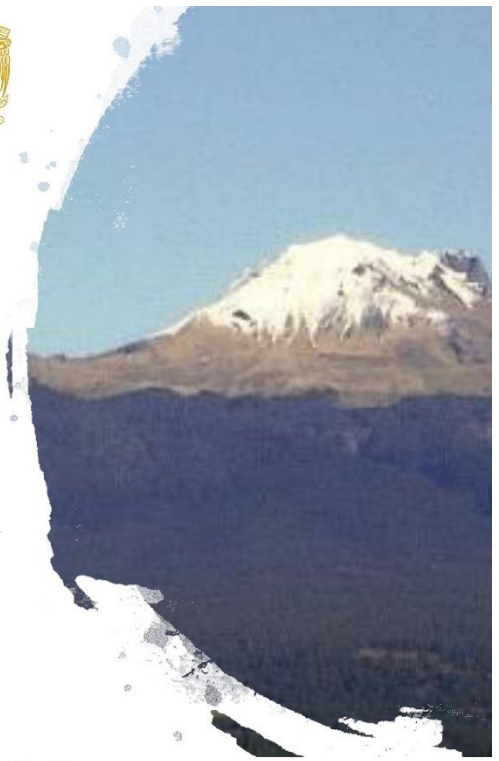
**Por su asistencia al Coloquio**

Tlaxcala de Xicohténcatl, 6 de octubre de 2021.

Dra. Margarita Martínez Gómez  
Organizadora  
Coordinadora Académica  
Estación Científica La Malinche



CTBC/21-2/433-MLAC





Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
 División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
 Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



# CONSTANCIA

A **Omar Montes Narváez**

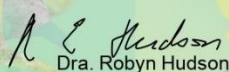
Por asistir al Simposio

## The Rabbit and the Cat: What next?

Que se llevó a cabo el 23 de octubre  
 con una duración de 9 horas

*"Por la Cultura a la Justicia Social"*  
 Tlaxcala, Tlax., Octubre 23, 2020

  
 Dra. Margarita Martínez Gómez

  
 Dra. Robyn Hudson

  
 Dr. Amando Bautista Ortega

Organizadores



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma: ISO 9001-2015- NMX-CC-9001-IMNC-2015



CTBC/20-2/114-MLAC



Cinvestav



POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

## Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro de Investigación en Reproducción Animal Dr. Carlos Beyer Flores

Laboratorio de neurociencia de la conducta

Otorga la presente constancia a:

**Omar Montes Narváez**

Por su asistencia al simposio en honor a la Dra. Patricia Aguilar Alonso "Nuevos conocimientos sobre el estrés oxidativo" el día 21 de Enero de 2022.

Valor curricular 5 Hrs

  
Dr. Julio César Morales Medina

Organizador

CENTRO DE INVESTIGACION  
EN REPRODUCCION ANIMAL  
CINVESTAV - U.A.T.  
Apdo. Postal No. 62  
TLAXCALA, 90000, TLAX.  
MEXICO

Made for free with Certify'em





**BUAP**<sup>®</sup>



**La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

A través del  
**Instituto de Ciencias**  
otorga la presente

## Constancia

A: **Omar Montes Narváez.**

Por haber asistido al **“Curso-taller: Análisis de secuencias de DNA y proteínas por métodos bioinformáticas.”** celebrado del 04 de agosto al 27 de octubre del año en curso. Valor curricular de 48 horas.

*“Pensar bien, para vivir mejor”*  
H. Puebla de Z., a 6 de enero del 2022

  
**Dra. Carolina Moran Raya**  
Directora





Otorgan la presente  
**CONSTANCIA**

**A: OMAR MONTES NARVÁEZ**

Por su participación en la feria científica con el taller:

«**NEUROFISIOLOGÍA**»

Realizada el 20 de Enero en la Esc. Sec. Presidente Juárez, Tlaxcala

“Por la Cultura a la Justicia Social”  
Tlaxcala, Tlax., 20 de enero de 2023

**Dra. María de Lourdes Arteaga Castañeda**  
**Coordinadora General del CTBC**

**Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado**  
**bajo la Norma: ISO 9001-2015- NMX-CC-9001-IMN-2015**



CTBC/23-1/094-MLRM



**Posgrado en Ciencias Biológicas**  
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas  
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



#### A QUIEN CORRESPONDA

La Coordinación General de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, **HACE CONSTAR** que el **Mtro. Omar Montes Narváez** participó como **ayudante de profesor** en la unidad de aprendizaje **Endocrinología** durante el periodo **Primavera 2023 (febrero-julio)**, impartida por los Dres. Leticia Nicolás Toledo y Marcos García Juárez con una duración de **32 horas**.

Se extiende la presente en la ciudad de Tlaxcala de Xicohténcatl, a los cinco días del mes de julio del año dos mil veintitrés.

ATENTAMENTE  
"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO  
COORD. GENERAL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Posgrado  
Ciencias Biológicas



Sistema Institucional de Autogestión de la Calidad Certificado bajo la Norma: ISO  
9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**  
 Secretaría de Investigación Científica y Posgrado  
 Comisión Estatal de Bioética del Estado de Tlaxcala

**Sicp**

Otorgan la presente



# Constancia

**A: MC OMAR MONTES NARVÁEZ**

Por su valiosa participación como asistente al taller denominado "Ética y Bioética en Estudios con Animales", realizado el día 26 de mayo del año en curso, con valor curricular de cuatro horas.

**ATENTAMENTE**

"Por la Cultura a la Justicia Social"  
 Tlaxcala, Tlax., a 26 de mayo de 2023

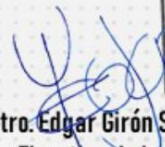


Folio: 15663

**Dr. Alfredo Aragón Pimentel**  
 Secretario de Investigación Científica  
 y Posgrado, UATx



**Mtro. Edgar Girón Soriano**  
 Director Ejecutivo de la Comisión de  
 Bioética del Estado de Tlaxcala



400c-RG22



## Universidad Autónoma de Tlaxcala Observatorio UATx

Otorgan la presente

# Constancia

A: Omar Montes Narváez

Por haber asistido a la Conferencia Magistral Inaugural "**Redes Multidisciplinarias; un modelo para aumentar el impacto social del trabajo científico**" del Foro Internacional ¿Ciencia para qué? Hacia nuevos modelos de investigación.

**Celebrada el 17 de agosto de 2023**

**"Observar para comprender, proponer para resolver"**



**Dr. René Elizalde Salazar**  
Presidente Observatorio de la UATx



**Mtro. José David Cabrera Canales**  
Secretario Observatorio de la UATx



Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
División de Ciencias Biológicas  
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



## CONSTANCIA

A **Omar Montes Narváez**  
Estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas

Por impartir el seminario  
**"Efecto del benzoato de estradiol sobre la expresión de las interleucinas 6 y 10  
en el modelo de isquemia cerebral global aguda en la rata, determinado por  
biosensores ópticos basados en matrices planares de silicio"**

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"  
TLAXCALA, TLAX., A 20 DE OCTUBRE DE 2022



DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO  
ENCARGADA DE LA COORD. GENERAL DEL POSGRADO  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma: ISO 9001-2015- NMX-CC-9001-IMNC-2015



PCB/22-2/044-rsl



American Stroke Association and  
Asociación Mexicana de Enfermedad Vascular Cerebral


## The Growing Need for Quality Stroke Care in Mexico Certificate of Participation

**AWARDED TO**

**Omar Montes**

You attended ASA & AMEVASC's live webinar,  
demonstrating your commitment to the growing need  
for quality stroke care in Mexico.

  
Julia Mora, MSHCA, BSN Director,  
International Quality Improvement, ASA

  
Juan Calleja, MD, MSc, President,  
Asociación Mexicana de  
Enfermedad Vascular Cerebral

Issue Date: February 29, 2024  
© 2024 American Stroke Association





Otorga la presente

# Constancia


A : Omar Montes Narváez .

Por su participación como ponente en la Actividad académica complementaria de la Unidad de Aprendizaje Psicofisiología denominada "IMPORTANCIA DE LOS CENTROS DE INVESTIGACIÓN EN LA FORMACIÓN CURRICULAR DE ESTUDIANTES DE PSICOTERAPIA" llevado a cabo en el Centro de Investigación en Reproducción Animal- Carlos Beyer Flores, con una duración de 8 horas, realizado los días 7 y 14 de mayo del 2024.

"Por la Cultura a la Justicia Social"  
Tlaxcala, Tlax., a 14 de mayo del 2024

  
Mtra. Paola Vez Ramos  
Directora



  
Dra. Karla Cruz Sánchez  
Coordinadora de la Licenciatura  
en Psicoterapia





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
Facultad de Trabajo Social, Sociología,  
Psicología y Psicoterapia



Otorga la presente

# Constancia

A: **OMAR MONTES NARVÁEZ.**

Por su participación como profesor invitado en la Unidad de Aprendizaje "**PSICOFISIOLOGÍA**", en la Licenciatura de Psicoterapia durante el periodo escolar primavera 2024, iniciando el 22 de enero del 2024 y finalizando el 07 de junio del 2024, con una duración de 150 horas clase cubriendo un total de 4 créditos perteneciente al Plan de estudios 2018.

"Por la Cultura a la Justicia Social"

Tlaxcala, Tlax., 7 de junio del 2024

Mtra. Paola Vez Ramos  
Directora



Dra. Karla Cruz Sánchez  
Coordinadora de la Licenciatura  
en Psicoterapia

## CERTIFICATE OF PRESENTATION

This is to confirm that

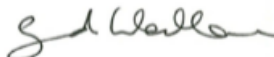
**Raul Delgado Macuil, O. Montes Narváez, M. García Juárez, B. Vertti Cervantes**

for presenting the Oral entitled  
Chemometric determination of IL-6 in ischemic murine model

at the Scope Conference

**International Conference on Artificial Intelligence  
& Machine Learning 2024**

from 28 - 30 Oct 2024 in Paris, France



Gerlind Wallon, PhD  
AI2024 Deputy Director

European Scope  
Conference Organization

London UK

phone +44 1244 94  
0687

[ai@scopeconferences.co.uk](mailto:ai@scopeconferences.co.uk)

Date and location: 30 October 2024, Paris