



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CENTRO DE QUÍMICA-ICUAP

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO CLÍNICAS

TESIS DE DOCTORADO

**“ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA
EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR ZIP14 Y EL PAPEL DE
ZNT1 EN EL CONTROL DE LA CONCENTRACIÓN HEPÁTICA DE
ZINC EN RATAS CON UNA CIRUGÍA ABDOMINAL”**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
QUÍMICAS ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

PRESENTA:

M.C. VIOLETA ABURTO LUNA

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. EDUARDO M. BRAMBILA COLOMBRES

PUEBLA, PUE., 14 DE DICIEMBRE 2016



El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas, del área de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, con el apoyo de beca otorgada por CONACYT con No. 237104 y la VIEP/2437/2016



VIEP
Vicerrectoría de Investigación
y Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Al M.V.Z. Carlos G. Escamilla Weinman, director del Bioterio “Claude Bernard” de la BUAP, por el aporte de las ratas.

Al M.C. Leopoldo Castro Caballero del departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, por su apoyo para realizar las cuantificaciones de zinc.

A mi director de tesis D. C. Eduardo M. Brambila Colombres, le agradezco infinitamente el haberme aceptado en su equipo de trabajo, así como todo el apoyo proporcionado para la realización de este proyecto

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	10
1. MARCO TEÓRICO	12
1.1 INTRODUCCIÓN	12
1.2 CONTROL HOMEOSTÁTICO DEL ZINC	14
1.2.1 Transportadores de zinc	14
1.2.2 Distribución de zinc intracelular	27
1.2.3 Metalotioneinas	28
1.2.4 Factor de transcripción de metales tipo 1 (MTF-1).....	34
1.3 ZINC E INFLAMACIÓN.....	37
1.3.1 Hipozinquemia y redistribución de zinc hacia hígado durante el proceso inflamatorio agudo	40
1.4 Interleucina 6	45
1.4.1 Transducción de la señal intracelular de Il-6	46
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	49
5. JUSTIFICACIÓN.....	49
6. HIPOTESIS	50
7. OBJETIVOS.....	51
7.1 OBJETIVO GENERAL:.....	51
7.2 OBJETIVOS PARTICULARES	51
8. METODOLOGÍA.....	52
8.1 Animales y Tratamiento.....	52
8.2 Cuantificación de zinc en tejido hepático y suero	53
8.3 Tinciones de Zinquina y Ditizona.....	53
8.4 Cuantificación de metalotioneina en hígado por el método de saturación con 109cadmio.....	54
8.5 Aislamiento de ARN total.....	54
8.6 Inmunohistoquímica	55
8.7 Ensayos de Western Blot	55
8.8 Análisis de datos	56

8.9 Esquema de trabajo para evaluar la expresión Zip14 durante el proceso inflamatorio agudo.....	56
8.8 Esquema de trabajo para evaluar el efecto de los inhibidores de las vías de señalización sobre la expresión de Zip14	58
8.9 Esquema de trabajo para evaluar la expresión de ZnT1	59
9. RESULTADOS	59
9.1 Zinc y metalotioneinas durante el proceso quirúrgico experimental	59
9.2 Detección de Zinc libre en tejido hepático	60
9.3 Localización de zinc compartimentalizado	61
9.5 Expresión de metalotioneínas durante el proceso inflamatorio	64
9.6 Determinación del nivel de ARNm de Zip14 mediante RT-qPCR	64
9.10 Evaluación de la expresión de Zip14 mediante inmunohistoquímica	65
9.11 Efecto de la inhibición de las vías de señalización de IL-6 sobre la expresión de Zip14	67
9.12 Detección de Zinc libre en tejido hepático	72
9.13 Localización de zinc total	73
9.14 Efecto de la inhibición de las vías de señalización de IL-1 β sobre la expresión de Zip14	75
9.15 Efecto de los inhibidores de las vías de señalización de IL-1 β sobre el zinc libre en tejido hepático.....	77
9.16 Efecto de la inhibición de la señalización de IL-1 β sobre el zinc compartimentalizado	78
9.17 Efecto del proceso inflamatorio sobre la regulación de ZnT1	80
9.18 Cuantificación de zinc total en hígado.....	80
9.19 Evaluación de MTF-1 en la fracción nuclear y citoplásmica durante el proceso inflamatorio.....	80
9.20 Cuantificación de Metalotioneina total en hígado	82
9.21 Determinación del nivel de ARNm de ZnT1 mediante RT-qPCR	82
9.22 Evaluación de la expresión de ZnT1 durante el trauma quirúrgico	83
9.23 El trauma quirúrgico afecta la expresión de ZnT1 durante el proceso inflamatorio	85
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	86
11. CONCLUSIONES.....	93
12. REFERENCIAS	94

14. ANEXOS 107

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
μg	Microgramo
$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado
aa	Aminoácidos
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Amortiguador TAE	Amortiguador de tris-acetato-EDTA
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARN total	Ácido ribonucleico total
CDF	Facilitadores de difusión catiónica
Células Caco-2	Células de cáncer de colon humano
Células JAR	Células de coriocarcinoma humano
Células HeLa	Células derivadas de cáncer cérvico-uterino
Células NRK	Células de riñón de rata normal
Cys	Cisteína
Cd	Cadmio
CdCl_2	Cloruro de cadmio
DMT	Dominios transmembranales
D.O	Densidad óptica
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
GADPH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
h	Hora
HC11	Línea celular de epitelio mamario normal
HCl	Ácido clorhídrico
HClO_4	Ácido perclórico
h/mZip1	Transportador de zinc Zip1 humano o murino
HNO_3	Ácido nítrico

h/Zip2	Transportador de zinc Zip2 humano
iNOS	Sintasa del óxido nítrico inducible
IP	Intraperitoneal
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
KO	Knock-out
IL-6	Interleucina-6
IL-1	Interleucina-1
L	Litro
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MRE	Elemento de respuesta a metales
MT	Metalotioneina
MT-1	Metalotioneina isoforma 1
MT-2	Metalotioneina isoforma 2
MT-3	Metalotioneina isoforma 3
MT-4	Metalotioneina isoforma 4
MTF-1	Factor de transcripción de metales tipo 1
MTs	Metalotioneinas.
m/Zip3	Transportador de zinc Zip3 murino.
N	Concentración normal
NFκB	Factor nuclear de transcripción kappa B
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
OSM	Oncostatina M
pg	Picogramo
pH	Potencial hidrógeno
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
RFA	Respuesta de fase aguda
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a un retrotranscripción
SLC	Acarreador de soluto
STAT	Elementos activados por los transductores de señales y activadores de la
la	transcripción
Tris-base	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
Ta	Temperatura de alineamiento
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPH-1	Línea celular de leucemia monocítica aguda humana
Zip	Proteínas parecidas a ZrT, Irt
Zn	Zinc
ZnCl ₂	Cloruro de zinc
ZnT	Transportador de zinc

RESUMEN

La inflamación es iniciada por las citoquinas pro-inflamatorias que tienen profundos efectos sobre el metabolismo de nutrientes y su utilización. Los oligoelementos se

encuentran entre aquellos nutrientes que exhiben perfiles metabólicos atípicos durante la inflamación y episodios infecciosos. Durante la inflamación producida por una cirugía experimental en animales se produce una disminución de zinc en plasma, la cual se denomina hipozinquemia, y es debida a la redistribución de este metal a diferentes tejidos, principalmente hacia hígado. No obstante lo anterior, poco se conoce acerca de los mecanismos bioquímicos involucrados en esta redistribución, por lo que en el presente estudio se examinó el papel de Zip14 en la captación hepática de zinc, las vías de señalización implicadas en su inducción después de una cirugía abdominal, así como la redistribución intracelular del metal a diferentes tiempos. Adicionalmente fue importante evaluar los mecanismos implicados en el retorno de las concentraciones de zinc hepático a sus niveles basales, relacionándolo con la regulación de la expresión del exportador de zinc ZnT1. El trauma quirúrgico produjo una disminución de zinc plasmático desde las 9 hasta las 20 h post-cirugía y un incremento en hígado a las 20 h. A nivel intracelular, el zinc libre disminuyó de las 3 a las 6 h, e incrementó a las 9 h, mientras que el zinc total incrementó de las 9 hasta las 24 h. La concentración de MT mostró incrementos desde las 6 hasta las 36 h, retornando a sus niveles basales a las 48 h. El ARNm del transportador Zip14 incrementó desde las 6 hasta las 20 h, al igual que su síntesis proteica, teniendo un máximo a las 9 h. Al administrar un inhibidor de Jak2, se produjo una disminución del nivel de RNAm, así como también de la expresión proteica, lo mismo ocurrió cuando se administró el inhibidor para Stat3, sin embargo, al administrar un inhibidor de PI3K se evidenció un aumento en la transcripción y traducción de la proteína. Cuando fue administrado el inhibidor de NFκB incrementó el ARNm y la expresión de la proteína Zip14. Al administrar los inhibidores de MAPp38 y JNK no se presentaron cambios del ARNm, pero la proteína Zip14 se encontró incrementada. Estos datos sugieren que Zip14 es uno de los principales transportadores que se encuentran mediando la redistribución de zinc plasmático hacia hígado durante el trauma quirúrgico y que su inducción depende de la vía Jak2-Stat3 que es activada por IL-6. El trauma quirúrgico provocó un incremento de la concentración de zinc hepático desde las 20 h hasta las 36 h post-cirugía, retornando a su nivel basal a las 48 h. El factor de transcripción de MTF-1 se encontró incrementado en citoplasma a las 20 h, sin embargo en núcleo no se encontraron cambios en los tiempos evaluados. El nivel de ZnT1 RNAm se encontró incrementado desde las 16 h hasta las 36 h al igual que la síntesis proteica que se mantuvo incrementada hasta las 32 h, estos resultados fueron corroborados al evaluar la cantidad de proteína mediante western-blot. Los cambios observados en la regulación de la expresión de ZnT1 después del proceso experimental estudiado, sugieren que durante el proceso inflamatorio inducido por una cirugía experimental, este transportador regula el retorno del zinc hepático a su concentración basal con la finalidad de retornar a la homeostasis.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 INTRODUCCIÓN

El zinc juega un papel indispensable para la vida, es el segundo metal más abundante en los organismos. Este se encuentra como un catión divalente (Zn^{2+}) y no posee propiedades redox bajo condiciones fisiológicas, lo cual explica por qué realiza múltiples papeles fisiológicos en una gran variedad de procesos biológicos [Kambe y cols., 2015]. El cuerpo humano adulto contiene de 2 a 4 gramos de este metal, aproximadamente el 60% del zinc se encuentra almacenado en músculo esquelético, ~30% en hueso, ~5% en piel e hígado (Fig. 1) [Jackson y cols., 1989; Rink y Gabriel, 2000]. El zinc juega un papel clave como un componente estructural, de señalización y catalítico [Maret y Li, 2009; Fukada y cols., 2011], por lo que es el único metal que actúa como cofactor en las seis clases de enzimas, esto último gracias a que la unión del metal a las proteínas generalmente sigue la serie de Irving-Williams, donde el zinc es altamente preferido sobre muchos otros metales excepto cobre [Maret y Li, 2009; Colvin y cols., 2010], por lo tanto un incremento de zinc daría lugar a numerosas proteínas disfuncionales y probablemente esto conduciría a la muerte celular, al igual que una deficiencia de este biometal [Fraker y cols., 2000, Rink y Gabriel, 2000].

Debido a la importancia que tiene el zinc, las células deben mantener sus niveles de zinc a concentraciones controladas, esto es logrado a través de un balance de exportación, almacenamiento celular y captación del metal. Cada una de estas actividades es mediada por distintas familias de proteínas, destacando los transportadores de zinc y las metalotioneinas (MTs) [Dufner-Beattie y cols., 2003].

Con la finalidad de mantener el metabolismo homeostático, las células han desarrollado un eficiente sistema de proteínas de transporte integradas a las membranas celulares y a las membranas de los organelos intracelulares, lo que permite el movimiento y el mantenimiento de las concentraciones de zinc adecuadas [Gaither y Eide, 2001].

Empleando estos sistemas de transporte, el zinc es trasladado al interior de los organelos, y activa enzimas dependientes de este metal, que son necesarias para el mantenimiento de diversos procesos bioquímicos. Además, cuando los niveles intracelulares del metal son altos, el control es mantenido mediante mecanismos de desintoxicación que incluyen la unión del metal a proteínas citoplasmáticas como son las

metalotioneinas (MTs) y la participación de los transportadores de zinc, facilitando el secuestro dentro de organelos, el cual es empleado más tarde cuando existe un déficit del metal o la exportación del zinc de las células [Gaither y Eide, 2001].

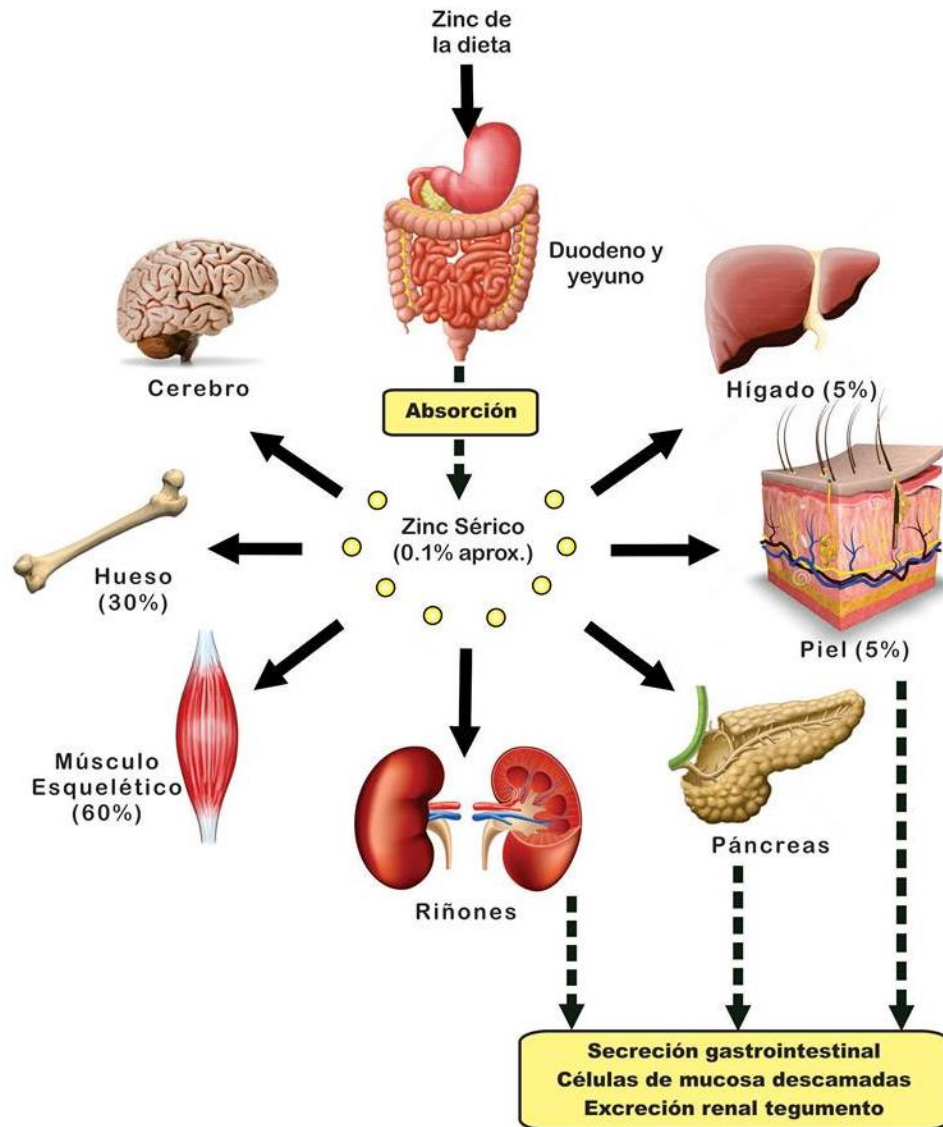


Figura 1. Distribución de zinc en el cuerpo. El zinc de la dieta es absorbido por el intestino (duodeno y jejun) y luego se distribuye a los tejidos periféricos. Aproximadamente el 60% es almacenado en el músculo esquelético, ~30 en huesos y 5% en hígado y piel. El porcentaje remanente es distribuido a otros tejidos tales como cerebro, riñón y páncreas. El exceso de zinc es excretado a través de la secreción intestinal, células de la mucosa descamadas y por el tegumento renal. Tomado y modificado de Kambe y cols., 2015.

1.2 CONTROL HOMEOSTÁTICO DEL ZINC

1.2.1 Transportadores de zinc

En los mamíferos existen dos familias de transportadores de zinc, la familia de transportadores ZnT, actúan disminuyendo los niveles de zinc intracelular, mediante la exportación de zinc desde el citoplasma celular hacia compartimentos intracelulares o al espacio extracelular, mientras la familia de transportadores ZIP, son las proteínas responsables del incremento de los niveles de zinc intracelular, vía el transporte del metal desde el espacio extracelular o desde el lumen de los organelos hacia el citoplasma (Fig. 2) [Lichten y Cousins, 2009].

Las proteínas ZnT también llamadas SLC30A (solute-linked carrier 30, haciendo referencia a los genes que las codifican), pertenecen a la familia de proteínas CDF (por sus siglas en inglés cation diffusion facilitator) y está integrada por 9 miembros en los mamíferos [Gaither y Eide, 2001; Palmiter y Huang, 2004; Cousins y cols., 2006; Lichten y Cousins, 2009; Kambe y cols., 2015].

Basados en la similitud de sus secuencias, Gaither y Eide, dividen a los transportadores CDF en tres subfamilias; la subfamilia I incluye principalmente proteínas de organismos procariotas, el transportador ZnT9 de mamíferos está clasificado dentro de esta subfamilia. Las subfamilias II y III están presentes tanto en organismos eucariotas como procariotas en la misma proporción, ZnT1, 5, 6, 7, 8 y 10 se clasifican dentro de la subfamilia II mientras que ZnT2, 3 y 4 pertenecen a la subfamilia III (fig. 3) [Gaither y Eide, 2001; Palmiter y Huang, 2004].

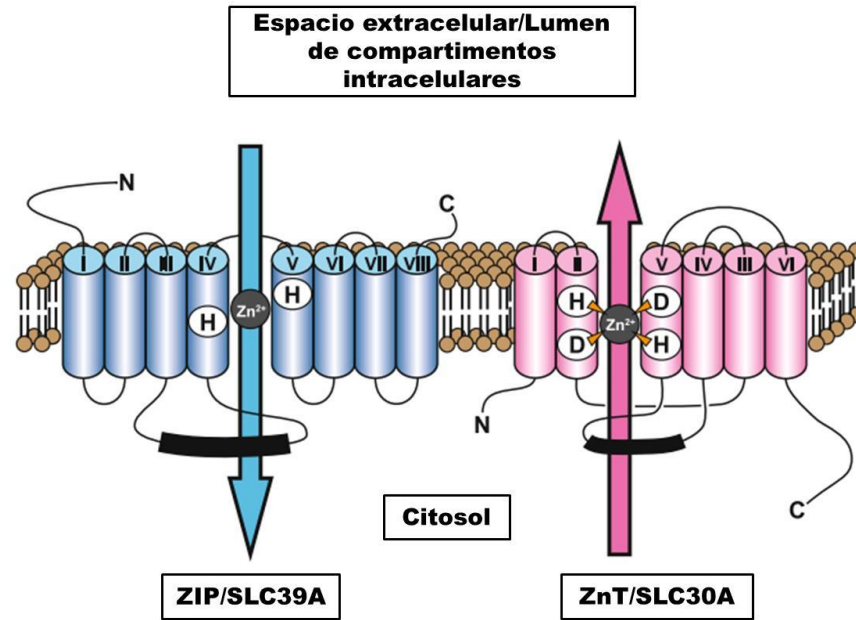


Figura 2. Predicción de las estructuras y mecanismos de transporte de Zip y ZnT. Se muestran las predicciones topológicas y las direcciones del transporte de zinc de los transportadores Zip (izquierda) y ZnT (derecha). La secuencia rica en histidinas de Zip y ZnT es indicada con una línea en negrita. Los residuos de histidina en los DTM IV y V son esenciales para la actividad del transporte de zinc de los transportadores Zip y los residuos de histidina y ácido aspártico de los DTM II y V de los transportadores ZnT son indicados. Los transportadores Zip mueven al zinc del espacio extracelular o de los compartimentos intracelulares al citoplasma, el mecanismo de transporte aún no ha sido aclarado. En contraste, los transportadores ZnT funcionan como intercambiadores Zn^{2+}/H^{+} , transportan zinc desde el citoplasma al espacio extracelular o compartimentos intracelulares. Modificado de Fukada y Kambe, 2011

La mayoría de estas proteínas transportadoras muestran seis dominios transmembranales (DTMs I-VI), a excepción de ZnT5 que posee 15 DTMs (Fig. 3); destacando los grupos amino y carboxilo-terminal a nivel citoplasmático [Paulsen y Saier, 1997; Palmiter y Huang, 2004]. Dentro de los DTMs II y V se han identificado cuatro aminoácidos conservados (dos histidinas y dos ácidos aspárticos) (Fig. 2), otra característica de estas proteínas es la presencia de un bucle largo rico en histidinas que generalmente sigue una secuencia (HX) n donde $n = 2$ a 6 y X suele ser serina (S) o glicina (G), el bucle se encuentra entre los DTMs IV y V (Fig. 3), esta secuencia puede representar el dominio de unión al metal. Además de este último dominio, se encuentra otro de unión a metal en el carboxilo-terminal, teniendo una secuencia...H-D/E-X-H-X-W-X-L-T-X₈-H... (Fig. 3) [Gaither y Eide, 2001].

Transportadores ZNT (SLC30A)

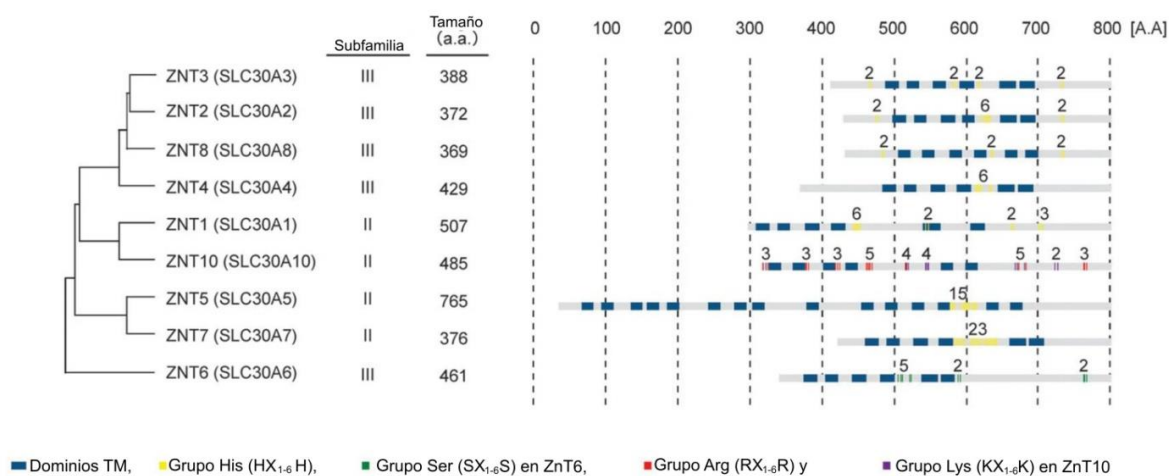


Figura 3. Resumen de las características estructurales de los transportadores ZnT. El dendrograma muestra la similitud de la secuencia entre transportadores ZnT este es mostrado a la izquierda. La clasificación de las subfamilias sigue la asignación de Gaither y Eide. La cantidad de DTM, así como los grupos o secuencias de His (HX₁₋₆H), Ser (SX₁₋₆S) y Lys (KX₁₋₆K) son mostrados en el panel derecho. Los números arábigos por encima de cada secuencia indica el número de residuos de His/Ser/Arg/Lys en las secuencias. Modificado de Fukada y Kambe, 2011.

Investigaciones basadas en la estructura cristalina del homólogo de ZnT en *E. coli*, YiiP, con la finalidad de realizar la verificación de las predicciones topológicas, han dado una valiosa información acerca del sitio de unión y el mecanismo de transporte de las proteínas ZnT. YiiP forma un homodímero en forma de Y, en donde los cuatro residuos aminoacídicos conservados dentro de los DTMs II y V (Fig. 2) forman un sitio de unión tetraédrico con zinc en cada protómero. Cada carboxilo terminal adopta una estructura plegada como metalochaperona. Al igual que los dominios de unión a metal de las ATPasas tipo P que transportan metales, para ambas proteínas es importante la formación del sitio de unión del zinc citoplasmático y la regulación de la actividad del transporte de zinc [Lu y Fu, 2007; Lu y cols., 2009]. El asa citoplasmática rica en histidinas es una característica única de los transportadores ZnT, pero su función precisa no ha sido determinada, en parte porque esta asa está ausente en YiiP. Sin embargo, la presencia de esta secuencia rica en histidinas en el transportador es esencial para la actividad del transporte de zinc. El número de residuos de histidinas en la asa ha mostrado modular la actividad del transporte de zinc en varios ZnTs incluyendo sus homólogos obtenidos de otras especies [Suzuki y cols.,

2005; Kawachi y cols., 2008]. La información de la estructura de los transportadores ZnT sugiere que la región del asa de los transportadores ZnTs coopera con los DTMs y con el grupo carboxilo terminal para el transporte de zinc [Fukada y Kambe, 2011]. Los DTMs I, II y V de las proteínas ZnTs son altamente anfipáticos, sugiriendo un importante papel en el transporte del sustrato. Esta hipótesis es soportada por la observación de que ciertos aminoácidos polares dentro de estos dominios se encuentran más conservados [Gaither y Eide, 2001; Lichten y Cousins, 2009].

Análisis con inmunofluorescencia y actividad de los transportadores de zinc han demostrado que ZnT1 reside en la membrana plasmática y que está involucrado directamente en el transporte de zinc citoplasmático hacia el exterior de la célula [Palmiter y Findley, 1995; McMahon y Cousins, 1998]. Otros transportadores ZnT, incluyendo del ZnT2 al ZnT10 se localizan predominantemente en las regiones perinucleares y/o compartimientos vesiculares de la célula (Fig. 4) [Palmiter y cols., 1996 a, b; Huang y cols., 2002; Kambe y cols., 2002; Kirschke y Huang, 2003; Chimienti y cols., 2004; Yu y cols., 2007].

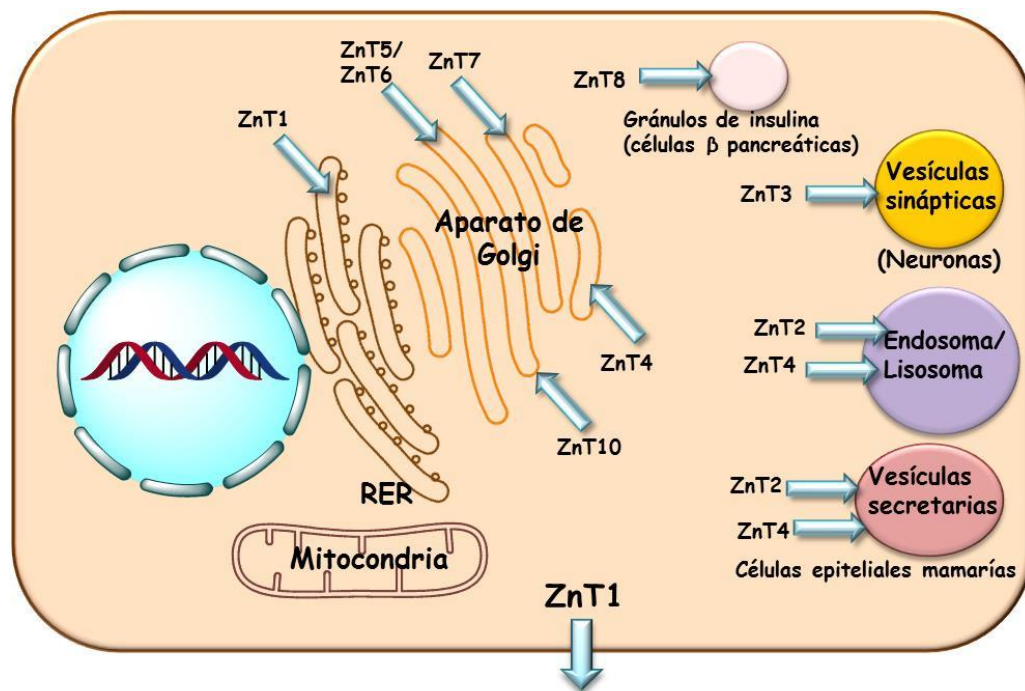


Figura 4. Localización de los transportadores ZnTs en células de mamífero. Las flechas indican la dirección de la movilización de zinc. Modificado de John y cols., 2010; Kambe y cols., 2015.

En la tabla 1 se muestra la distribución de los transportadores ZnT en tejidos, su localización subcelular y los patrones de regulación en respuesta a la suplementación o eliminación de zinc en varios sistemas celulares.

Tabla 1. Distribución en tejidos, localización subcelular y regulación de los transportadores ZnTs. Modificado de Overbeck y cols., 2008.

ZnT	Distribución en tejidos	Localización subcelular	Regulación
ZnT1	Ubicuo	Membrana plasmática y vesículas	SZ induce ARNm en THP-1, HC11 murinas
ZnT2	Intestino delgado, riñón, placenta, testículos, próstata, hígado y páncreas	Vesículas Endosomales / lisosomales ácidas	SZ induce ARNm en intestino delgado, hígado y riñón de ratas. EZ reduce ARNm en intestino delgado y páncreas de ratones y en el intestino delgado y riñón de ratas
ZnT3	Cerebro y testículos	Vesículas sinápticas	EZ no tiene ninguna influencia en timo de ratón
ZnT4	Ubicuo	Red trans-Golgi, vesículas y endosomas	SZ no tiene ninguna influencia en ARNm en el hígado, intestino y riñón de ratas y en células epiteliales de mama humana; EZ no tiene influencia en el ARNm en intestino delgado, hígado riñón, testículos y cerebro de ratas
ZnT5	Ubicuo	Gránulos secretorios en células β pancreáticas, aparato de Golgi, membrana plasmática.	SZ induce ARNm en células Caco-2, pero no en células JAR y células HeLa; EZ reduce ARNm en THP-1 e incrementa ARNm en HeLa
ZnT6	Hígado, cerebro, intestino delgado, riñón, pulmón, THP-1	Red trans-Golgi, vesículas	SZ y EZ reduce ARNm en THP-1, SZ no tiene influencia en ARNm en células NRK
ZnT7	Hígado, intestino delgado, riñón, bazo, corazón, cerebro, pulmón y THP-1	Aparato de Golgi y vesículas	SZ induce ARNm en THP-1 y no afecta en células HeLa; EZ reduce ARNm en THP-1 e induce ARNm en células HeLa
ZnT8	Células β pancreáticas e hígado	Vesículas	No determinado
ZnT9	Ubicuo	Citoplasma y núcleo	No determinado
ZnT10	Hígado y cerebro fetales	No determinado	No determinado

SZ, suplementación de zinc; EZ, Eliminación de zinc. THP-1, Línea celular de leucemia monocítica aguda. HC11, Línea celular de epitelio mamario normal. Células Caco-2, Células de cáncer de colon humano. Células JAR, Células de coriocarcinoma humano. Células HeLa, Células derivadas de cáncer cérvico-uterino. Células NRK, Células de riñón de rata normal.

La familia de transportadores Zip también son llamados SLC39A (por sus siglas en inglés, solute-linked carrier 39) haciendo alusión a la familia de genes que los codifican. Los transportadores Zip fueron llamados así debido a que son “proteínas parecidas a ZrT, Irt” (deriva de sus siglas en inglés, Zrt-, Irt-like Proteins). Estos transportadores llevan el nombre de los dos primeros miembros de la familia identificados, Zrt de *Saccharomyces cerevisiae* e Irt de *Arabidopsis thaliana* [Eide y cols., 1996; Zhao y Eide, 1996 a]. Zrt1 es un transportador que capta zinc en levaduras e Irt es un transportador de hierro en plantas, de esta forma se puede concluir que la familia de transportadores Zip provienen de un ancestro común [Gaither y Eide, 2001]. La familia de proteínas Zip de mamíferos consiste de 14 miembros [Cousins y cols., 2006; Lichten y Cousins, 2009] que son divididas en varias subfamilias con alto grado de conservación dentro de estos grupos. La subfamilia I está integrada principalmente por miembros pertenecientes a hongos y plantas, el transportador Zip9 de mamíferos pertenece a esta subfamilia. La subfamilia II incluye a transportadores de mamíferos, nemátodos e insectos, a esta familia pertenecen Zip1, Zip2 y Zip3 [Guerinot, 2000; Cousins y cols., 2006]. La subfamilia GufA está relacionada con el gen *gufA* de *Myxococcus xanthus* y su función es desconocida, está integrada por proteínas presentes en procariontes y eucariontes, a esta subfamilia pertenece Zip11 y, por último, la subfamilia LIV-1 que está relacionada con genes *LIV-1*, que son regulados por estrógenos, esta subfamilia está restringida a eucariontes, encontrándose en ésta los transportadores Zip4-Zip8, Zip10 y Zip12-Zip14 (Fig. 5) [Eng y cols., 1998; Taylor, 2000; Gaither y Eide, 2001; Taylor y Nicholson, 2003; Cousins y cols., 2006].

Los transportadores de la familia Zip poseen 8 DTMs [Guerinot, 2000; Gaither y Eide, 2001]. Destacan las orientaciones extracelulares tanto del grupo amino como del carboxilo-terminal (Fig. 2), este modelo topológico ha sido confirmado en transportadores de levaduras como Zrt1 y algunos transportadores Zip de mamíferos como Zip2 [Gaither y Eide, 2000; Gitan y cols., 1998]. Los transportadores Zip muestran un asa larga de localización intracelular el cual se ha denominado “región variable” debido a que los miembros de ésta familia muestran poca conservación tanto en longitud y secuencia. Esta asa se encuentra ubicada entre los dominios III y IV. Una característica que es compartida por varias proteínas Zip es la presencia de repeticiones ricas de histidinas (HX)_n en la región variable, donde n corresponde a un número de 3 a 5 [Gaither y Eide, 2001; Eide,

2004; Kambe y cols., 2004]. Gaither y Eide han propuesto que esta secuencia rica en histidinas corresponde a un dominio de unión al metal, además de que esta misma región incluye importantes residuos aminoacídicos de vital importancia para la función de los transportadores Zip, al actuar probablemente como una señal de selección, como es el caso de di-leucina en Zip1, la cual media la endocitosis y los residuos de histidina en Zip4, median procesos de ubiquitinación y degradación [Gaither y Eide, 2001; Huang y Kirschke, 2007; Mao y cols., 2007]. La porción más conservada entre los miembros de la familia Zip se encuentra entre los dominios IV y V, ambos son parcialmente anfipáticos y contienen residuos de histidina conservados (Fig. 2) [Gaither y Eide, 2001; Eng y cols., 1998]. Se ha propuesto que en esta región se forma un canal acuoso a través del cual pasa el zinc y que, los residuos de histidina junto con residuos polares adyacentes constituyen un sitio de unión a metales a nivel intramembranal [Eng y cols., 1998]. Consistente con esta propuesta, las mutaciones de los residuos de histidina y los residuos polares en los dominios IV y V de IRT1 suprimen la actividad del transporte de zinc [Rogers y cols., 2000].

Los miembros de la subfamilia LIV-1 tienen características únicas, poseen una secuencia conservada en el dominio V parecida a la presentada por las metaloproteasas (HEXPHEXGD) (Fig. 5). De acuerdo a las características de esta secuencia se sugiere que los miembros LIV-1 pueden ligar el zinc vía estos motivos [Taylor y Nicholson, 2003]. Otro motivo característico es el CPALLY localizado inmediatamente antes del primer DTM (Fig. 5) [Fukada y Kambe, 2011]. Muchos de los miembros de la subfamilia LIV-1 tienen una secuencia amino-terminal más larga en comparación con otros miembros de la subfamilia Zip. Al parecer esta secuencia tiene funciones importantes, ya que en pacientes con Acrodermatitis enteropática se ha descrito un gran número de mutaciones en este dominio del transportador Zip4 [Taylor y Nicholson, 2003; Andrews, 2008].

La estructura cristalina analizada por difracción de rayos X de los transportadores Zip no ha sido reportada, lo cual restringe la comprensión de su topología precisa, sitios de unión a zinc y mecanismos de transporte [Fukada y Kambe, 2011].

Transportadores ZIP (SLC39A)

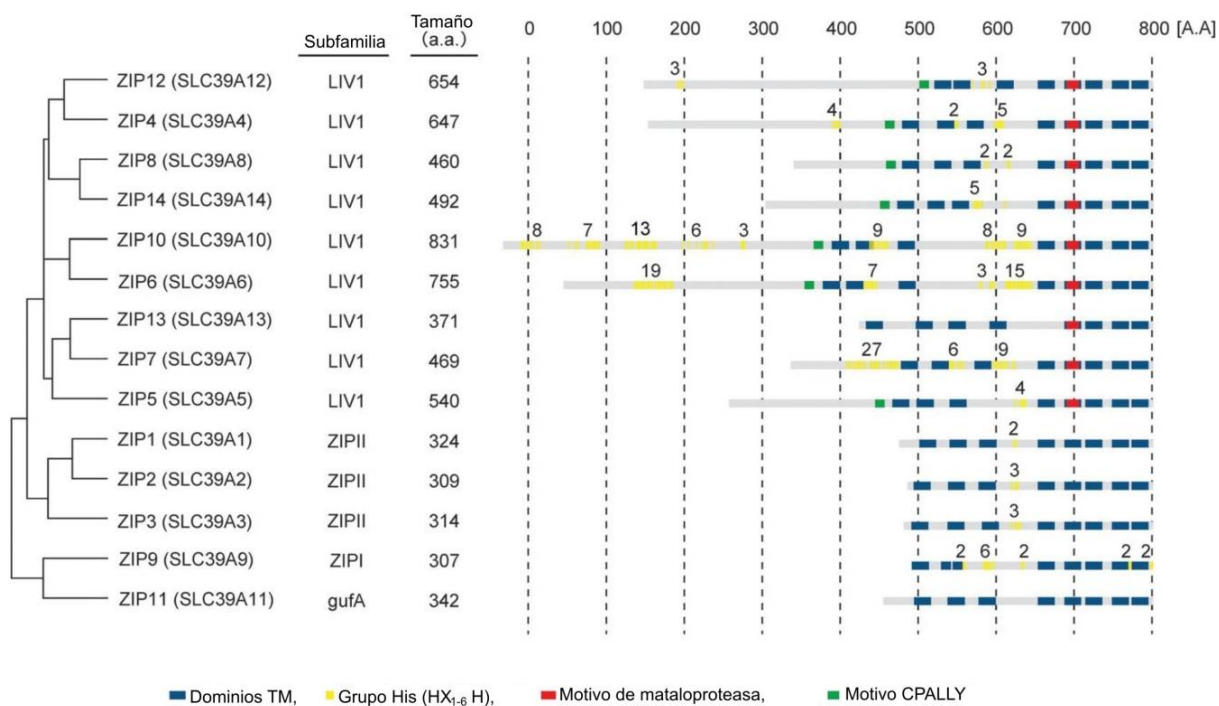


Figura 5. Resumen de las características estructurales de los transportadores Zip. El dendrograma muestra la similitud de las secuencias entre los transportadores Zip, este es presentado a la izquierda. La clasificación de las subfamilias sigue la asignación de Gaither y Eide. En el panel derecho se presentan los dominios transmembranales (DTM), grupos de histidinas (HX₁₋₆H), motivos parecidos al de metaloproteasas y el motivo CPALLY. Los números arábigos por encima de cada secuencia indica el número de residuos de histidina en el bucle de histidinas. Modificado de Fukada y Kambe, 2011.

Como ya ha sido mencionado, el mecanismo bioquímico involucrado en el transporte de zinc por los transportadores Zip no ha sido completamente investigado. En levaduras, se ha descrito que los transportadores Zrt1 y Zrt2 son dependientes de energía [Zhao y Eide 1996 a, b]. Sin embargo, el transporte de zinc por Zip1 y Zip2 no depende de energía, ni de gradientes de K⁺ o Na⁺, aunque la actividad de Zip2 es estimulada por HCO₃⁻ sugiriendo la existencia de un mecanismo simporte Zn²⁺/HCO₃⁻. Estudios de competición del metal indican que algunas proteínas Zip de mamíferos son específicas para zinc, sin embargo, la actividad de captación de zinc por h/mZip1, mZip3 y h/Zip2 son inhibidas por múltiples cationes [Gaither y Eide, 2001; Gaither y Eide, 2000; Dufner-Beattie y cols., 2003].

La mayoría de las proteínas Zip se localizan en membrana plasmática (Fig. 6) en el caso de Zip1-8 y Zip14 ha sido confirmado por análisis de actividad de transporte de zinc usando transfección de ADN en células de mamíferos, la actividad del transporte ha sido medido por la captación de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ o usando pruebas que producen emisión fluorescente bajo la unión de zinc lábil intracelular [Cousins y cols., 2006]. Los transportadores Zip7, Zip8, Zip9 y Zip13 se localizan en membranas de organelos [Fukada y Kambe, 2011].

En la tabla 2 se muestra la distribución de los transportadores en los tejidos, su localización subcelular y los patrones de regulación en base a la concentración de zinc celular.

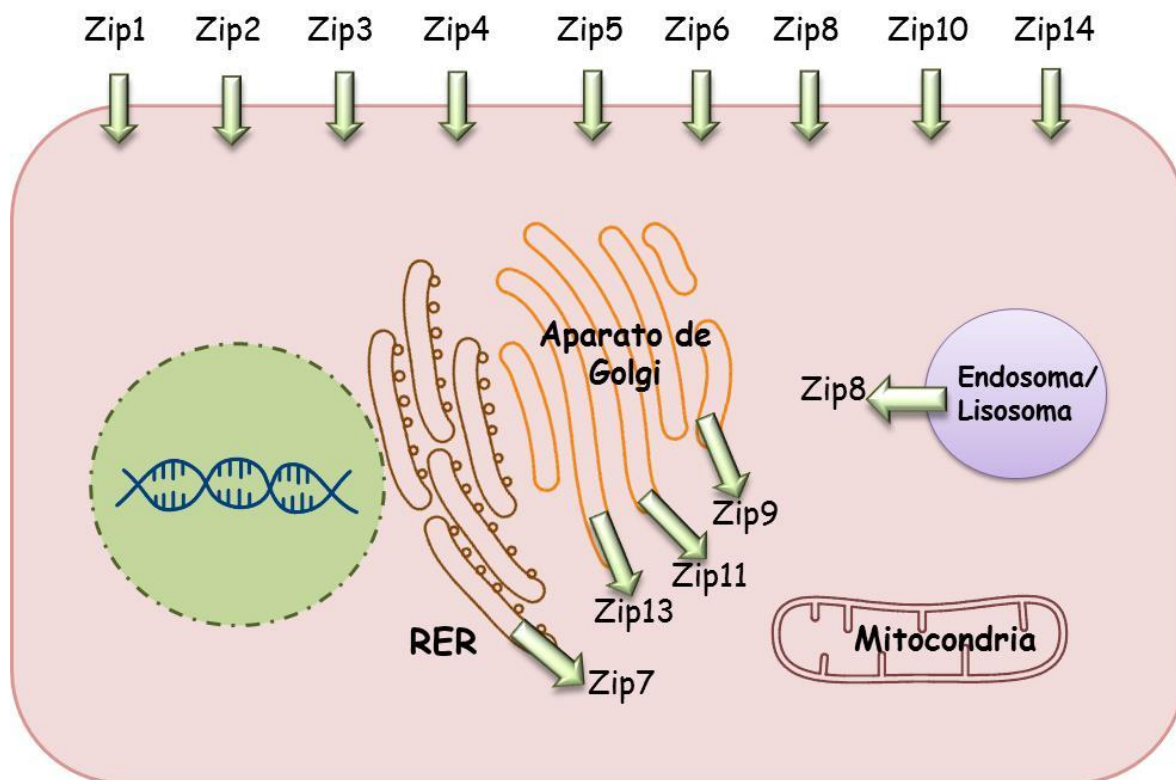


Figura 6. Localización celular de los transportadores Zip. Las flechas indican la dirección del movimiento del zinc. La mayoría de estos transportadores se localizan a nivel de membrana plasmática a excepción de Zip7 que se localiza en membrana de retículo endoplásmico y Zip8 en membrana de lisosomas. Modificado de Lichten y Cousins, 2009.

Tabla 2. Distribución en tejidos, localización subcelular y regulación de los transportadores Zip.

Zip	Distribución en tejidos	Localización subcelular	Regulación
Zip1	Ubicuo	Membrana plasmática y vesículas intracelulares	El ARNm es regulado negativamente cuando las células son expuestas a altas concentraciones de zinc.
Zip2	Detección limitada en próstata, útero, epitelio cervical, nervio óptico y monocitos	Membrana plasmática	Incrementa el ARNm cuando disminuyen las concentraciones de zinc celular.
Zip3	Ubicuo con altos niveles en testículos y células epiteliales mamarias	Membrana plasmática	El ARNm no es regulado por el zinc de la dieta en el intestino o endodermo visceral.
Zip4	Intestino delgado, estómago, colón y riñón	Membrana plasmática	Aumentan su expresión cuando existen deficiencias de zinc. El aumento de zinc de la dieta tiende a degradar el ARNm.
Zip5	Alta expresión en hígado, riñón, páncreas y a lo largo del intestino delgado y colón	Membrana plasmática	La abundancia de ARNm es insensible a zinc, pero la traducción de este ARNm fue encontrada ser sensible a zinc
Zip6	Ubicuo	Membrana plasmática	Su expresión no depende de las concentraciones de zinc.
Zip7	Ubicuo	Aparato de Golgi	Su abundancia es reprimida por suplementación de zinc
Zip8	Pulmón, Riñón, hígado, cerebro, intestino delgado	Membrana plasmática y Endosomas/lisosomas	Su expresión no depende de las concentraciones de zinc
Zip9	Ubicuo	Red trans Golgi	No determinado
Zip10	Ubicuo	Membrana plasmática	Aumenta su expresión con la suplementación de zinc
Zip11	No determinado	Membrana plasmática	No determinado
Zip12	Cerebro, pulmón, testículos y retina	No determinado	No determinado
Zip13	Ubicuo	Aparato de Golgi	No determinado
Zip14	Ubicuo	Membrana plasmática	Su expresión no depende de las concentraciones de zinc

Información modificada de Lichten y Cousins, 2009; Eide, 2004.

La expresión de muchos transportadores ZnT y Zip es regulada transcripcionalmente y post-transcripcionalmente. Se conoce que algunos genes que codifican para estas proteínas son blanco del factor de transcripción de respuesta a metales

(MTF-1), por lo tanto son regulados por la concentración del zinc, por ejemplo, MTF-1 activa la expresión de ZnT1 (Fig. 7) y reprime la expresión de Zip10 en respuesta a incremento de zinc [Langmade y cols., 2000; Wimmer y cols., 2005].

La expresión de Zip4 es estrictamente regulada en múltiples niveles post-transcripcionales, debido a que cumple funciones críticas para la regulación de la biodisponibilidad del zinc en el cuerpo, como una ruta esencial para la absorción del zinc de la dieta [Weaver y cols., 2007; Jou y cols., 2009]. El ARNm del transportador Zip4 es estabilizado durante la deficiencia de zinc lo que da lugar a un incremento del transportador. La acumulación de la proteína Zip4 en la superficie apical de las células epiteliales del intestino se da después de su procesamiento, que se ha descrito que puede ser una escisión proteolítica del dominio N-terminal. El aumento en la concentración de zinc causa una rápida endocitosis y degradación de la proteína, así como la desestabilización del ARNm [Weaver y cols., 2007]. Un cambio de localización similar ha sido encontrado para muchos transportadores Zip localizados en la membrana plasmática, sugiriendo que la endocitosis en respuesta a la concentración de zinc es un mecanismo conservado para controlar la captación de zinc por los transportadores Zip [Wang y cols., 2004]. En contraste existen pocos reportes acerca de los cambios de localización de los transportadores ZnT. Las proteínas ZnT4 y ZnT6 se redistribuyen de la región perinuclear a la periferia celular en respuesta a altas concentraciones de zinc [Huang y cols., 2002]. La regulación de éste tráfico de proteínas probablemente es importante para el mantenimiento de la homeostasis del zinc intracelular [Fukada y Kambe, 2011].

Los transportadores, además de ser regulados por zinc, sus concentraciones dependen de la presencia de citocinas y hormonas, siendo esta regulación positiva o negativa, lo que depende del tejido (Fig. 7). Un buen ejemplo de esta regulación positiva es la del transportador Zip6 del pez “cebra” por el factor de transcripción STAT3, ya que es indispensable para la transición epitelial mesenquimal (EMT) durante su desarrollo temprano [Fukada y Kambe, 2011]. En los mamíferos se ha reportado una regulación positiva en tejido hepático generada por IL-6 tanto para transportadores de la familia ZnT y Zip (Tabla 3), por otro lado también se ha reportado que la hormona glucocorticoide regula positivamente la expresión del transportador ZnT2 [Lichten y Cousins, 2009]. Así, la regulación de la expresión de los transportadores de zinc es esencial para su función en

fisiología y patogenia, como lo es el proceso inflamatorio que se caracteriza por un aumento en la síntesis de las citocinas IL-6 e IL-1, así como algunas hormonas [Cousins y cols., 2006, Fukada y Kambe, 2011].

Tabla 3. Regulación de la expresión de los transportadores de zinc de la familia Zip y ZnT por citocinas y hormonas. Modificado de Lichten y Cousins, 2009.

Transportador de zinc	Regulación
Zip1	IL-6
Zip5	IL-6
Zip6	IL-6/IL-1
Zip8	TNF α
Zip14	IL-6/IL1/Óxido nítrico
ZnT1	Factor de transcripción de respuesta a metales (MTF-1)
ZnT2	Hormona glucocorticoide
ZnT5	IL-6
ZnT6	¿IL-6?

¿? No se ha definido su regulación por IL-6

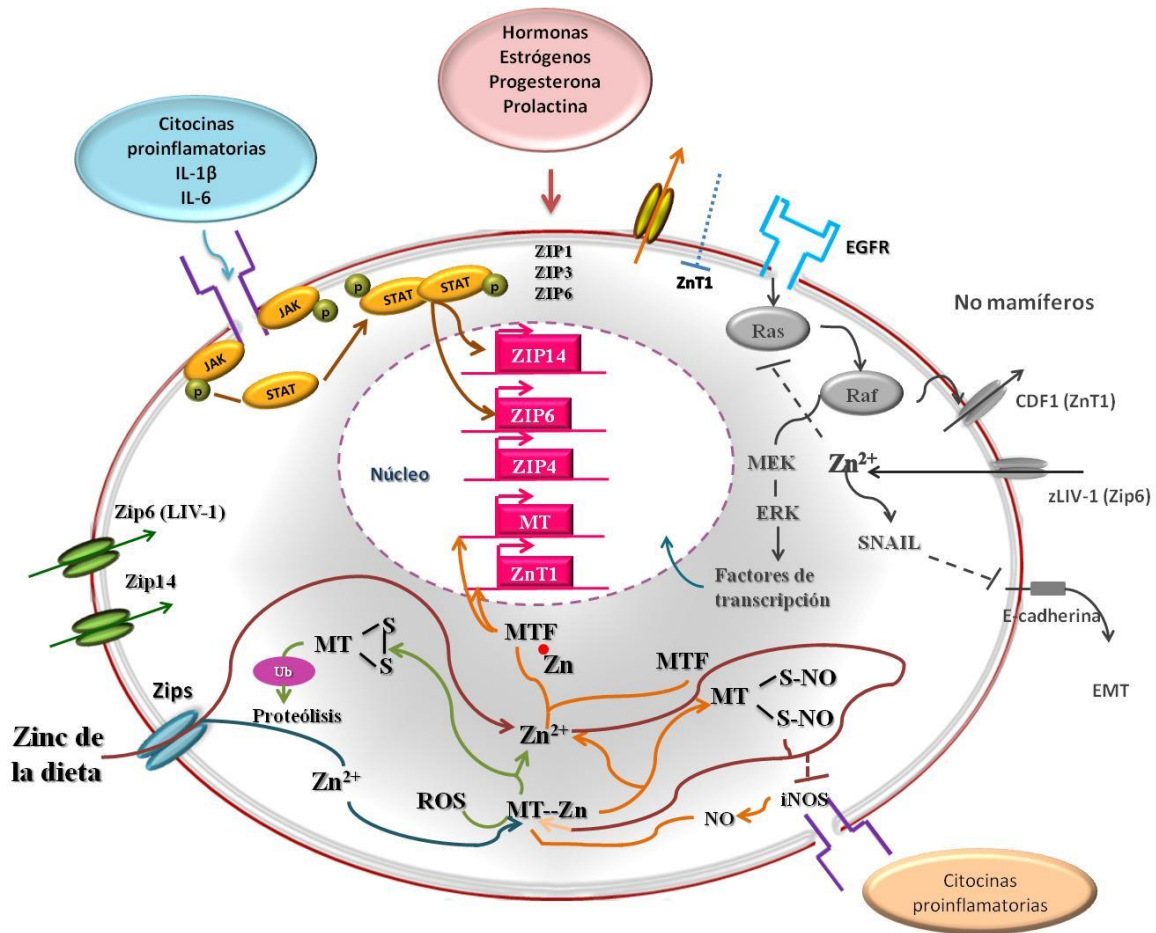


Figura 7. Vías de señalización que regulan algunos genes de ZnT y Zip, y la influencia del tráfico de Zn^{2+} intracelular. Cambios en la dieta suplementada con zinc tiene influencia sobre la expresión de ZnT1, ZnT2, Zip4 y MT. El factor de transcripción MTF-1 controla MT y ZnT1. El estrés nitrosativo inducido por citocinas pro-inflamatorias incrementa NO y estimula la liberación de Zn^{2+} de MT, el cual activa MTF-1. Los eventos que induce iNOS y el incremento de NO da lugar a la tionitrosación de MT, lo cual puede ser revertido adicionando Zn^{2+} . En contraste, la oxidación irreversible de MT por ROS dirige la degradación probablemente vía ubiquitinación. Las citocinas pro-inflamatorias incluyendo IL-1 β e IL-6 estimulan la señalización mediada por STAT, regulando positivamente a Zip14 y Zip6, dando lugar al influjo de Zinc celular. La prolactina, estrógeno y testosterona regulan la expresión específica celular de algunos genes de transportadores Zip. En modelos de organismos no mamíferos la regulación del Zn^{2+} es dada por transportadores homólogos a ZnT1 y Zip6. EMT puede ser un factor controlado en parte por Zn^{2+} vía regulación de transportadores. Las líneas solidas indican acción positiva y las continuas indican lo contrario. Modificado de Cousins y cols., 2006.

1.2.2 Distribución de zinc intracelular

Después de la captación celular de zinc, la que es mediada por los transportadores localizados en la membrana plasmática, este metal es distribuido dentro del citoplasma (50%), núcleo (30-40%) y membrana celular (10%). La concentración de zinc celular es considerada estar dentro de un rango entre 10 y 100 μg . El Zinc celular está disponible en cuatro pools. Primero puede unirse fuertemente a metaloproteínas como un componente estructural o metaloenzimas como cofactor; segundo el zinc unido a metalotioneinas con una afinidad baja, del cual puede ocupar del 5-10% del total del pool del zinc celular; tercero puede ser compartimentalizado dentro de los organelos intracelulares y vesículas de almacén de zinc, y como un suministro para las proteínas dependientes de zinc, la cual es mediada por transportadores de zinc. Como resultado del segundo y del tercero, el cuarto pool es el zinc libre citosólico el cual es mantenido en una muy baja concentración considerada en un orden picomolar y nanomolar bajo. Las concentraciones de zinc libre en los organelos intracelulares son de 0.14 pM en mitocondria, 0.2 pM en la matriz mitocondrial, 0.9 en el retículo endoplásmico y \sim 0.2 en Golgi (Fig. 8).

La movilización de zinc entre las vesículas y los organelos también es efectuada por los transportadores de zinc, los cuales contribuyen a las perturbaciones de amortiguamiento de la homeostasis del zinc citosólico, el cual es referido como “buffering” y “muffling”. Buffering y muffling son importantes en situaciones de exceso de zinc y juegan un papel importante en las fluctuaciones de zinc [Kimura y Kambe, 2016; Kambe y cols., 2015].

Para mantener controladas las concentraciones de zinc celular, las células deben disponer de factores que sensen o regulen el estado estable de los niveles de zinc citosólico. Solamente un sensor de zinc (Factor de transcripción de unión a elementos de respuesta a metales de tipo 1: MTF-1 coordina la expresión de dos importantes proteínas de control homeostático de zinc que son Metalotioneina y ZnT1.

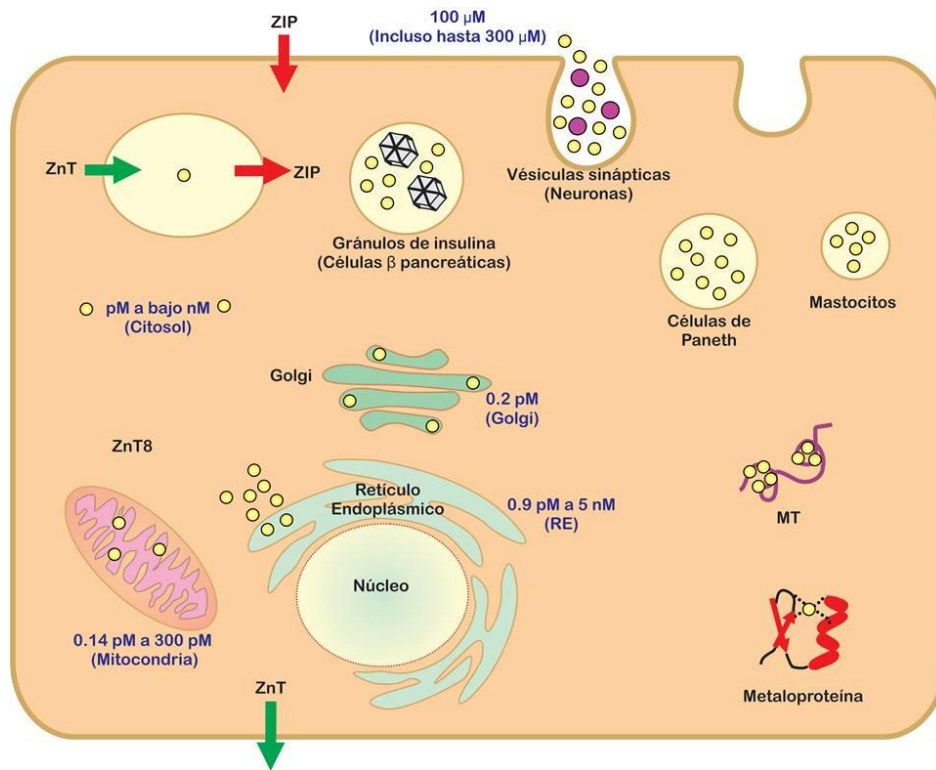


Figura 8. Esquema de la distribución de zinc. Los transportadores ZnT (flechas verdes) y ZIP (flechas rojas) Coordinan para regular la homeostasis del zinc celular. La concentración total del zinc celular es considerada ser de 10 a 100 μM, pero casi todos los iones $[Zn^{2+}]$ en el citosol se unen estrechamente a una serie de metaloproteínas y MTs, o secuestrados o liberados de organelos/ vesículas intracelulares a través de transportadores de ZnT o ZIP, respectivamente. Por lo tanto las concentraciones del Zn^{2+} lábil (“libre”) en el citosol son muy bajas. Las concentraciones del metal en algunos compartimentos intracelulares también son mostradas. Sin embargo, no hay consenso sobre los valores del ER y Golgi. El Zn^{2+} lábil está presente en mitocondria, pero la ruta de entrada no ha sido demostrada. Altas cantidades de Zn^{2+} son acumuladas en compartimentos secretorios especializados, tales como vesículas sinápticas y gránulos de insulina. Círculos amarillos: Zinc. Círculos rosa: glutamato. Tomado y modificado de [Kambe y cols., 2015].

1.2.3 Metalotioneinas

Después de que Margoshes y Vallee descubrieron una proteína de unión a cadmio en riñones de caballo, a esta se le dio el nombre de “metalotioneína” para indicar la presencia de varios tipos de iones metálicos en el material aislado (*metalo-*) y el alto contenido de grupos tioles (cisteína) en la proteína (*-tioneína*) [Margoshes y Vallee, 1957; Kägi y Vallee, 1960]. Metalotioneína (MT) es el nombre genérico para la familia de

proteínas de unión a metales, las cuales son estructuralmente variables [Maret, 2011]. Son de baja masa molecular la cual va de 6-7 kDa [Kägi y Vallee, 1960], están formadas por 61-68 aminoácidos de los cuales ~30% son cisteínas y no contienen aminoácidos aromáticos [Kojima y cols., 1976]. Las MTs tienen una gran afinidad por metales divalentes esenciales, como zinc y cobre, así como por metales no esenciales como cadmio, mercurio y bismuto [Palmiter, 1994; Haq y cols., 2003]. Debido a estas características, en las MTs de mamíferos los metales determinan la estructura terciaria de la proteína [Maret, 2011], la cual está constituida por enlaces de coordinación entre los grupos tioles de las cisteínas y los iones metálicos [Ngu y Stillman, 2009], por ejemplo el zinc se une con una geometría tetraédrica [Maret, 2011].

Estructuralmente las metalotioneínas están compuestas por dos dominios globulares de unión a metales (α y β) con diferente capacidad para asociarse a iones metálicos. El dominio α está formado por el extremo C-terminal y contiene 11 cisteínas, el dominio β está formado por el extremo N-terminal y contiene 9 cisteínas (Fig. 9), los 20 residuos de cisteína en la MT permiten que se unan un total de siete iones zinc o un total de 12 iones cobre [Haq y cols., 2003]. El análisis de la secuencia de la proteína demostró que esta constituida por una sola cadena polipeptídica, y que las distintas cisteínas se distribuyen en tres diferentes secuencias que son Cys-X-Cys, Cys-Cys y Cys-X-X-Cys donde X denota un aminoácido distinto a cisteína (Tabla 4) [Kojima y cols., 1976]. El alto contenido de cisteínas en las MTs cumplen dos propiedades importantes que son críticas para la función de estas proteínas y son: la unión a metal y las reacciones redox [Colvin y cols, 2010].

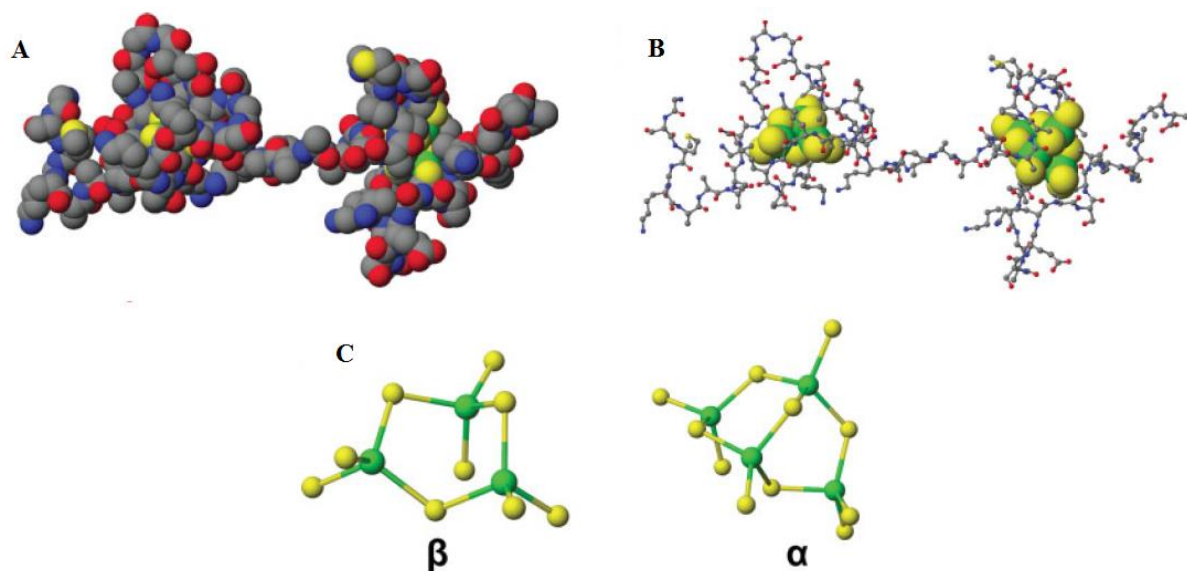


Figura 9. Modelos moleculares de MT. A) modelo molecular de metalotioneina en 3D (esferas), donde se pueden observar los dos dominios α y β , carboxilo y amino terminal respectivamente. B) modelo molecular de esferas y varillas donde se muestra la unión del cadmio (esferas verdes) y los grupos sulfhidrilos (esferas amarillas) provenientes de las cisteínas que caracterizan a la molécula. C) Estructuras α y β donde se muestran los ángulos tetraédricos de interacción entre los grupos sulfhidrilos (esferas amarillas) y los átomos de cadmio (esferas verdes). Modificado de Ngu y Stillman, 2009.

Tabla 4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las cuatro isoformas de metalotioneinas humanas usando ClustalW. Tomado de Vasak y Meloni, 2011.

	1	10	20	30	40	50	60	68						
MT-1H	MDPN-C	SCEA	GGSCACAGS	C	KCKKCKCTSC	KKS	CCS	CCPL	GCAKCAQGC	I	CKG-----A	SEK	SCCA	
MT-2A	MDPN-C	SCAA	GDSCTCAGS	C	KCKECKCTSC	KKS	CCS	CCPV	GCAKCAQGC	I	CKG-----A	SDK	SCCA	
MT-3	MDPETC	PCPS	GGSCTCADS	C	KCEGCKCTSC	KKS	CCS	CCPA	ECEKCAKDC	V	CKG	GEEAAEAE	AEK	SCCQ
MT-4	MDPRE	VCMS	GGICM	GDNC	KCTTCNCKT	C	RKS	CCPCCPP	GCAK	CARGC	I	CKG-----G	SDK	SCCP

Se destacan los residuos de cisteínas conservadas. La numeración corresponde a la secuencia de la MT-3 humana. El número de acceso a la secuencia de cada una de las isoformas en la base de datos NCBI es: MT-1H, NP_005942. MT-2A, NP_005944. MT-3, NP_005945 y MT-4, NP_116324.

En mamíferos se han descrito cuatro isoformas que han sido designadas como MT-1 a MT-4. Las isoformas 1 y 2 de las MT fueron descubiertas hace 50 años por Margshes y Valle [Margoshes y Vallee, 1957], y son expresadas en casi todos las células de los mamíferos, siendo mayor su expresión en hígado [Haq y cols., 2003]. La expresión de MT-3 y MT-4 está más limitada, MT-3 fue descubierta cuando en un ensayo biológico empleado para investigar la falta de actividad antiproliferativa en cerebro de pacientes de

la enfermedad de Alzheimer's, esta proteína fue capaz de suprimir el crecimiento de células neuronales de rata en cultivo, debido a esta propiedad fue llamada "factor de crecimiento inhibitorio" [Haq y cols., 2003], que más tarde fue identificado como un nuevo miembro de la familia de MTs [Palmiter y cols., 1992]. MT-3 es expresada principalmente en neuronas glutamatérgicas, aunque también se ha reportado en páncreas e intestino. La expresión de MT-4 está limitada a células del epitelio escamoso de piel y lengua [Haq y cols., 2003].

En humanos, los genes de las MT están localizados en la región q13 del cromosoma 16, e incluye a los siguientes 11 genes de MT-1 (MT1A, -B, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K, -L y -X), MT-2 (también conocida MT-2A), MT-3 y MT-4 [Haq y cols., 2003].

Las MTs son las únicas proteínas que se han relacionado con el control y biodisponibilidad de los iones zinc [Colvin y cols, 2010]. Los ratones carentes de los genes de las MT-1 y 2 son sensibles a los efectos adversos del exceso de zinc en la dieta y también son más susceptibles a desarrollar deficiencia de zinc, demostrándose así el papel de las MTs en el metabolismo celular del zinc [Kelly y cols., 1996]. Las MTs pueden localizarse en la célula a nivel citoplasmático, endosomal, nuclear y mitocondrial, así como a nivel extracelular [Ye y cols., 2001; Hao y cols., 2007; Moltedo y cols., 2000; Maret, 2011].

Además del papel de las MTs en el metabolismo del Zn, también se le ha relacionado con el metabolismo redox, este vínculo ha sido formulado en términos de un ciclo redox en el cual la oxido-reducción de la MT es bioquímicamente acoplada a otros pares redox con una concomitante asociación y disociación de iones zinc [Chen y Maret, 2001] (Fig. 8).

Debido a estas características, a las MTs se les ha adjudicado funciones de protección celular en contra de la toxicidad de metales divalentes, como antioxidantes y como protectores contra radicales libres hidroxilos [Inoue y cols., 2009].

Las MTs son inducidas en su síntesis por una gran cantidad de factores fisiológicos, fisiopatológicos y toxicológicos (Fig. 10). Las isoformas MT-1 y MT-2 son altamente inducibles por una variedad de estímulos incluyendo metales, hormonas, citocinas, oxidantes, estrés e irradiación [Haq y cols., 2003].

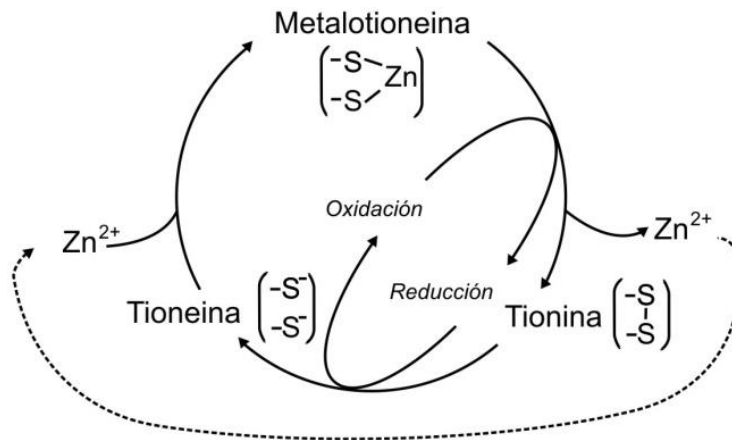


Figura 10. Ciclo redox de metalotioneína. Oxidación de los grupos tiolatos unidos a zinc en la MT resulta en la disociación de iones Zn^{2+} y formación de tionina con enlaces disulfuro. Los mismos o diferentes pares redox reduce los enlaces disulfuro y regenera tioneína, la cual puede asociarse con iones Zn^{2+} para formar MT y cerrar el ciclo. Las intersecciones del ciclo con el ciclo de un par redox y el ciclo de la concentración de iones Zn^{2+} , proveen un vínculo entre el estado redox celular y la disponibilidad de los iones Zn^{2+} . Modificado de Maret, 2011.

A nivel hepático, la expresión de MT es inducida en ratas por IL-6 a través de un mecanismo que requiere una adecuada dieta suplementada con zinc [Huber y Cousins, 1992]. En contraste, experimentos con hepatocitos en cultivo han mostrado que IL-6, pero no IL-1 α , incrementa la acumulación de zinc celular, así como la expresión de MT, en comparación con hepatocitos expuestos a glucocorticoides [Schroeder y cols, 1990].

Por otro lado, el incremento de la concentración de zinc hepático fue encontrado en ratones después de la administración de lipopolisacárido (LPS), sin embargo, este incremento no fue observado en ratones knock-out para MT (MT^{-/-}) o IL-6 (IL-6^{-/-}), estos resultados sugieren que MT juega un papel importante en la regulación del zinc durante los procesos infecciosos e inflamatorios [Liuzzi y cols., 2005; Inoue y cols., 2009].

Otro estudio demostró que los ratones IL-6^{-/-} con pre-tratamientos de IL-6, después de realizarles una hepatectomía parcial restablecieron la síntesis de MT hepática y la regeneración del hígado igual al del grupo testigo, demostrando que IL-6 es uno de los principales inductores para la síntesis de MT hepática y un factor crítico para la regeneración del hígado durante la hepatectomía parcial [Cherian y Kang, 2006].

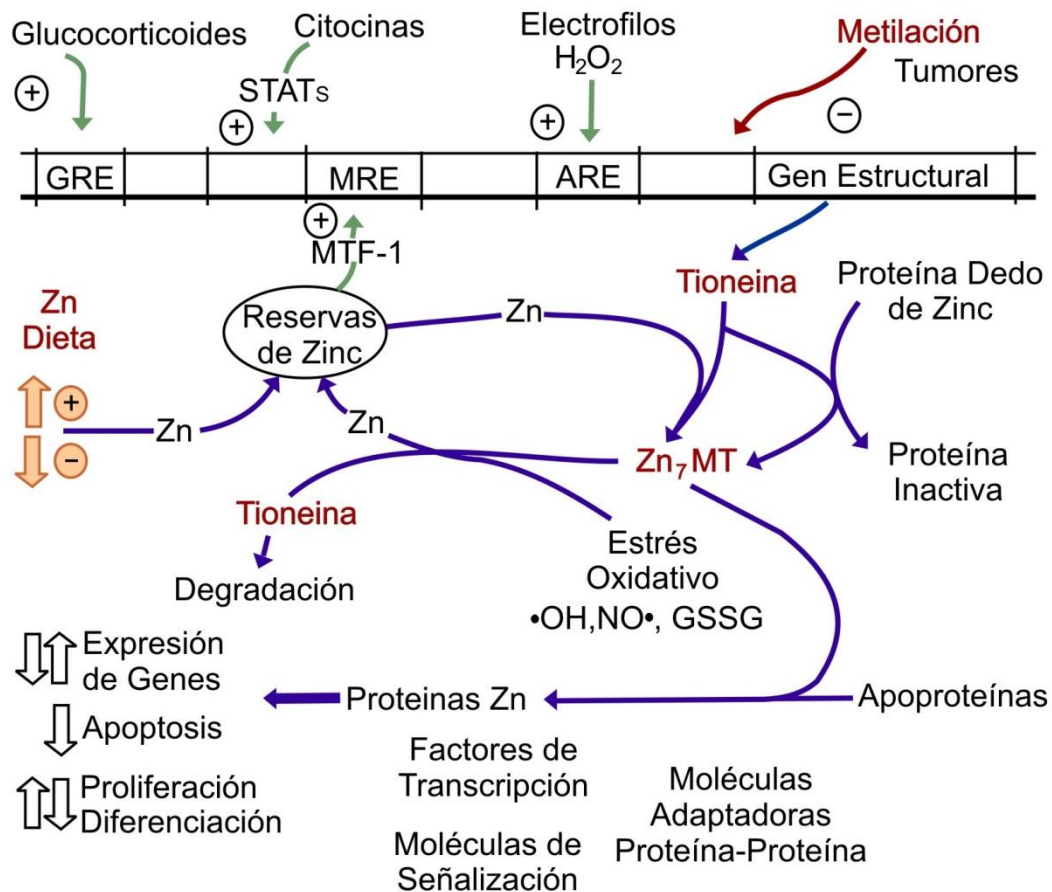


Figura 11. Panorama general de la regulación de los genes de metalotioneina (MT) y su función. El promotor de MT tiene muchos elementos de respuesta que regularan positivamente su transcripción. Estos incluyen: 1) Elemento de respuesta a metales (MRE), el cual es activado por el factor de transcripción de respuesta a metales (MTF-1) después de la captación de zinc, que es suministrado por la dieta; 2) Elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE); 3) Elementos activados por STAT (Transductores de señales y activadores de transcripción); 4) Elemento de respuesta a antioxidantes o electrófilos (ARE) activado en respuesta a estados redox. La metilación puede regular negativamente la expresión en algunas células tumorales. Reservas de zinc celular están influidas por la ingesta del zinc de la dieta y la actividad de los transportadores de zinc y sirve como la fuente de zinc unido a MT. El zinc ligado a MT muestra una estabilidad termodinámica alta pero también alta labilidad cinética. La tioneína y Zn₇MT puede servir para secuestrar o donar zinc, respectivamente, desde/a metaloproteínas de zinc. La metalotioneína es más rápidamente degradada que Zn₇MT. Los numerosos sitios de coordinación de zinc en proteínas (incluye factores de transcripción, moléculas de señalización y moléculas adaptadoras que utilizan dedos de zinc para la interacción proteína-proteína) proporcionan la oportunidad para que el nivel de MT influya en los procesos claves incluyendo regulación de genes, proliferación celular y diferenciación, transducción de las señales y apoptosis, así como el daño oxidativo causado por la influencia de estrés oxidativo y electrófilos. Modificado de Davis y Cousins, 2000.

1.2.4 Factor de transcripción de metales tipo 1 (MTF-1)

Los factores de transcripción constituyen un grupo de proteínas que controlan la expresión del gen diana por inhibición o iniciación de la transcripción en respuesta a un estímulo molecular específico. Uno de estos factores de transcripción es MTF-1 que representa un interesante ligando de iones zinc involucrado en un gran número de procesos celulares. MTF-1 es un regulador transcripcional pluripontete localizado tanto en citoplasma como en núcleo. Está involucrado en la adaptación celular como consecuencia de varias condiciones de estrés, principalmente a la exposición de metales pesados, pero también a hipoxia y estrés oxidante.

MTF-1 es una proteína de 72.5 kDa, tiene una estructura de dominio típico de los factores de transcripción intracelulares en el que varias partes funcionales pueden ser distinguidas (Fig. 12). Una parte funcional importante es el dominio de unión a DNA (DBD por sus siglas en inglés) el cual permite la detección y la unión de la proteína a la secuencia del promotor del gen. Otras partes pueden tener varios dominios de detección de señales y dominios de trans-activación (TAD) los cuales detectan señales químicas y permiten la regulación positiva y negativa de la expresión de genes que accede de este modo a la expresión celular específica. Como la mayoría de los factores de transcripción, MTF-1 también tiene un dominio de dedos de zinc, incluyendo 6 estructuras de dedo de zinc tipo Cys₂His₂ los cuales permiten un conducto de interacción con el DNA [Grzywacz y cols., 2015]. Dado que MTF-1 muestra un aumento de unión a DNA bajo suplementos de zinc y los dedos de zinc individuales tienen afinidades de unión diferentes, este dominio fue sugerido para mediar la percepción de zinc intrínseco de MTF-1, los dedos de zinc 5 y 6 pueden contribuir a la especificidad pero son indispensables para la unión a MER [Günther y cols., 2012].

MTF-1 se encuentra altamente conservado, desde insectos hasta mamíferos, donde esta típicamente presentado como una sola copia [Günther y cols., 2012]. Varios reportes han revelado que el factor de transcripción se acorta en roedores, lo que podría conducir a una menor afinidad a zinc. Por otro lado en insectos como *Drosophila* ha sido bien caracterizado y es responsable de la homeostasis del cobre [Grzywacz y cols., 2015].

Debido a la importancia del proceso transcripcional para la supervivencia de los organismos, existen varios niveles de regulación y control. En el caso de MTF-1 y procesos conectados con su actividad, el zinc parece ser el mensajero crucial y un factor central para el cruce de vías fisiológicas, también MTF-1 necesita iones de zinc para iniciar su actividad como un factor de transcripción [Grzywacz y cols., 2015].

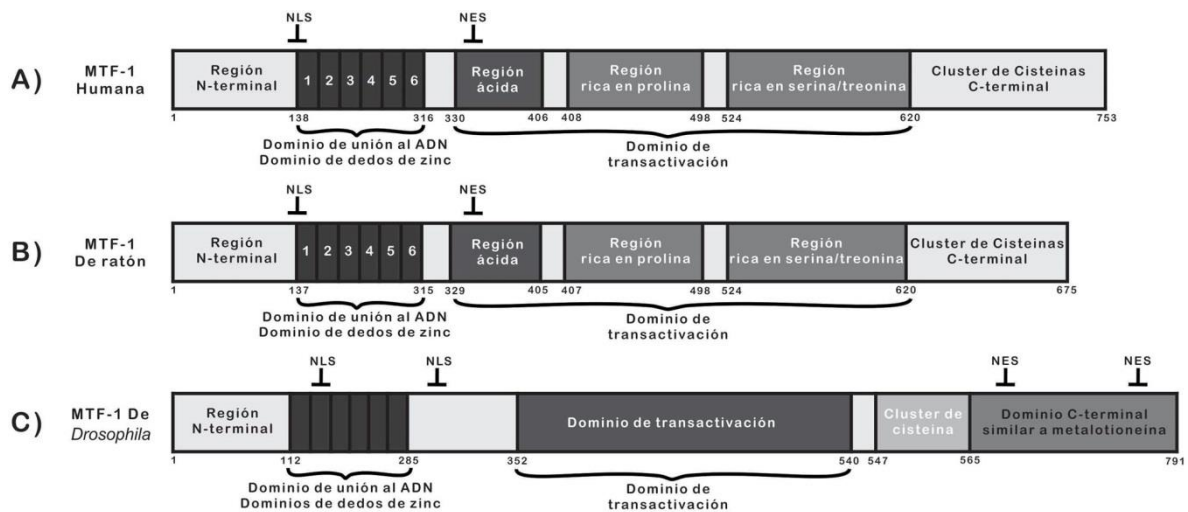


Fig. 12 Esquema de MTF-1 con sus dominios funcionales. Esquema de MTF-1 a) humano; b) ratón; c) *Drosophila*. NLS, señal de localización nuclear, NES señal de exportación nuclear. Tomado y modificado de Grzywacz y cols., 2015

El mecanismo que ha sido bien descrito de la estimulación celular de MTF-1 ocurre por iones de zinc libre. La activación de este factor de transcripción puede ser precedida (i) directamente por los iones zinc de citoplasma, (ii) indirectamente por la liberación de zinc de metalotioneínas o (iii) indirectamente por fosforilación/desfosforilación de la proteína [Grzywacz y cols., 2015].

Bajo condiciones normales MTF-1 se localiza tanto en núcleo como en citoplasma, pero se acumula en núcleo bajo condiciones de estrés, incluyendo la sobrecarga de metales pesados, choque térmico y estrés oxidante. Una vez que MTF-1 es activado, se transloca al núcleo y después de que se une al DNA recluta diferentes activadores, ya que a menudo depende de otros factores de transcripción para la expresión coordinada del gen diana (Fig. 13) [Günther y cols., 2012].

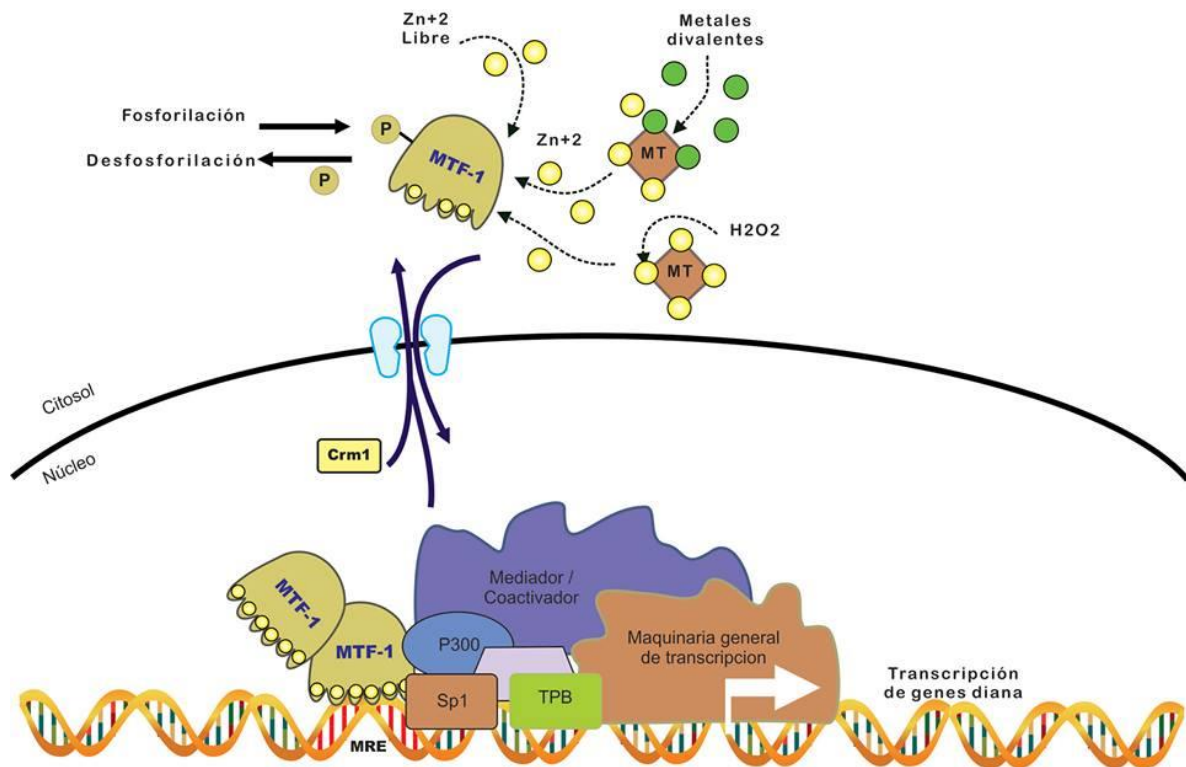


Figura 13. Generalidades de la regulación de MTF-1 en mamíferos. Bajo condiciones normales se encuentra en núcleo y citoplasma con la exportación más probable de MTF-1 con Crm1, el cual media la exportación nuclear de proteínas que llevan una señal de exportación nuclear rica en leucina. MTF-1 puede ser activado directamente por zinc o indirectamente por la liberación de zinc de metalotioneínas que es desplazado de esta por metales divalentes y estrés oxidante H_2O_2 . Además la activación de MTF-1 puede ser modulada por fosforilación. Bajo la unión de zinc a MTF-1 es transportado al núcleo donde se une a su motivo de DNA, denominado MRE (elemento de respuesta a metales) con la secuencia consenso TGRCNC (R=A o G; N=cualquier nucleótido). MTF-1 interactúa con otros factores de transcripción (como Sp1) y coactivadores (como p300) para dirigir la expresión del gen diana. Tomado y modificado de Günther y cols., 2012.

A través de la regulación de los genes correspondientes, MTF-1 tiene influencia sobre la homeostasis de zinc, hierro y cobre. Este factor de transcripción está implicado en la regulación de la inflamación, especialmente la activación de citocinas inflamatorias pro- o anti-inflamatorias [Grzywacz y cols., 2015].

1.3 ZINC E INFLAMACIÓN

Reportes previos han mostrado que el zinc juega un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmune. La deficiencia de zinc afecta múltiples aspectos de la inmunidad innata y adaptativa, viéndose reflejados en alteraciones de la expresión de citocinas, enzimas de reparación del ADN, transportadores de zinc y moléculas de señalización. Estos datos sugieren que las células del sistema inmune se adaptan al estrés ocasionado por la deficiencia de zinc [Rink y Gabriel, 2000; Vasto y cols., 2006; Mocchegiani y Malavolta, 2008; Prasad, 2008; Overbeck y cols., 2008; Prasad, 2009; John y cols., 2010].

La inflamación es una respuesta inmune esencial que es activada por diversos estímulos, como la lesión tisular e infección, permitiendo la supervivencia de los organismos bajo estas condiciones; en general la reacción inflamatoria aguda tiene un inicio rápido y con poca duración [Goldsby y cols., 2004; Medzhitov, 2010]. El objetivo de esta respuesta es restaurar la homeostasis y eliminar la causa de su perturbación [Moshage, 1997; Medzhitov, 2010; Ventecleft y cols., 2011]. Por otro lado, en algunas enfermedades la activación inmunológica persistente puede ocasionar inflamación crónica, que a menudo tiene consecuencias patológicas [Goldsby y cols., 2004; Vasto y cols., 2006; Libby, 2007; Van Dyke y Kornman, 2008].

Estudios previos han permitido la identificación de diferentes clases de mediadores inflamatorios, las vías que controlan su producción y sus mecanismos de acción. Hasta el momento se conoce que la inflamación puede darse de diferentes formas y modalidades, las cuales son gobernadas por diferentes mecanismos de inducción, regulación y resolución. Una respuesta típica inflamatoria consiste de cuatro componentes: inductores inflamatorios, los sensores que los detectan, mediadores inflamatorios inducidos por los sensores y el tejido blanco que se ve afectado por los mediadores inflamatorios. Cada componente viene de múltiples formas y sus combinaciones funcionan en distintas vías inflamatorias. El tipo de vía inducida bajo condiciones dadas depende de la naturaleza del estímulo inflamatorio [Medzhitov, 2010].

Un proceso inflamatorio agudo comprende reacciones tanto localizadas como generalizadas. Las piedras angulares de la reacción inflamatoria localizada son tumefacción, enrojecimiento, calor, dolor y pérdida de la función, estos signos reflejan los 3 principales fenómenos de una reacción inflamatoria que son: 1) vasodilatación, 2) aumento de la permeabilidad capilar y 3) afluencia de fagocitos. La duración y la intensidad de la reacción inflamatoria aguda local deben regularse para controlar la lesión tisular y facilitar los mecanismos necesarios para que los tejidos cicatricen [Goldsby y cols., 2004].

La reacción inflamatoria local se acompaña de una respuesta sistémica o general conocida como reacción de fase aguda que es referida como la reprogramación rápida de expresión de genes y metabolismo en respuesta a la señalización de citocinas inflamatorias (Fig. 14) [Goldsby y cols., 2004; Gruys y cols., 2005; Kuribayashi y cols., 2011; Ventecleft y cols., 2011]. La respuesta de fase aguda se observa en todas las especies animales, de hecho las contrapartes de las proteínas de fase aguda de mamíferos han sido identificadas en invertebrados y peces, en los cuales se ha propuesto que esta respuesta es más fuerte que la de los mamíferos para compensar una menos evolucionada respuesta inmune adaptativa [Cray, 2009].

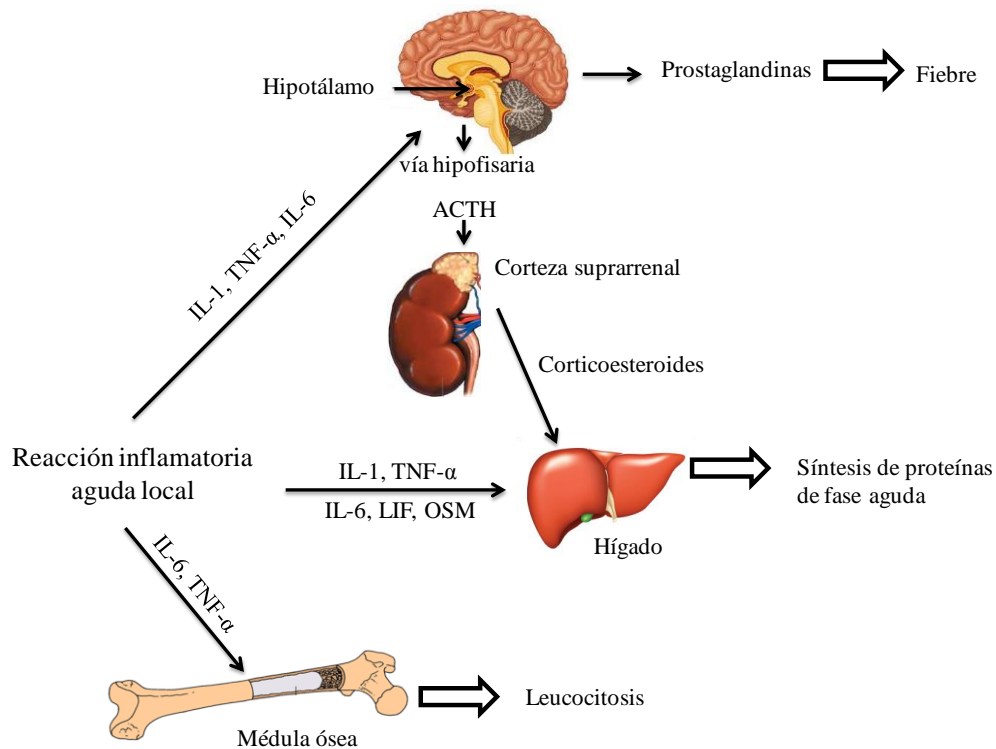


Figura 14. Revisión general de los órganos y los mediadores que participan en la reacción sistémica de la fase aguda. IL-1, IL-6 y TNF- α , que los macrófagos activados en el sitio de la inflamación producen, tienen importancia particular para mediar los efectos de fase aguda. Factor inhibidor de leucemia (LIF); Oncostatina M (OSM). Tomado y modificado de Goldsby y cols., 2004.

ta producción de leucocitos, (c) cambios en el metabolismo de lípidos, (d) aumento de la gluconeogénesis, (e) en músculo se incrementa el catabolismo de proteínas y existe transferencia de aminoácidos de músculo a hígado, (f) activación del complemento y vías de coagulación, (g) cambios hormonales, (h) inducción de proteínas de fase aguda, (i) así como una disminución de la concentración de hierro y zinc sérico [Moshage, 1997; Goldsby y cols., 2004].

La disminución de la concentración de zinc en plasma ha sido observada después de la administración de numerosos agentes incluyendo endotoxina, dibutiril-cAMP, hormonas glucocorticoides, IL-1 α , Lipopolisacárido (LPS) y turpentina [Powanda y cols., 1979; Cousins y Leinart, 1988; Rofe y cols., 1996; Liuzzi y cols., 2005].

El estrés quirúrgico induce modificaciones complejas en la hemodinámica, la respuesta metabólica, neuro-hormonal e inmune del individuo. La magnitud de estas modificaciones depende de los eventos preoperatorios que conducen a la cirugía, de la severidad del trauma quirúrgico y también de las complicaciones post-operatorias/post-traumáticas. Al igual que en otras condiciones que presentan daños tisulares, el trauma quirúrgico es seguido por una respuesta inmune-inflamatoria iniciada en el sitio de la lesión por el sistema inmune innato y una respuesta anti-inflamatoria compensatoria [Desborough, 2000; Kehlet, 2000; Cardinale y cols., 2011].

Dentro de los cambios sistémicos que ocurren durante los procesos quirúrgicos también sobresale la disminución de la concentración de zinc plasmático, por lo que es razonable decir que no ha habido elementos traza más estrechamente relacionados con la cirugía que el zinc [Okada y cols., 1990].

Pories investigó el proceso de curación de heridas quirúrgicas en ratas, encontrando que la cicatrización de heridas fue mucho más rápida en animales alimentados con dietas suficientes en zinc, en comparación con aquellos que no fueron provistos de este metal [Okada y cols., 1990]. Posteriormente, este investigador condujo estudios acerca del papel del zinc en la cicatrización de heridas, tanto en animales de laboratorio como en humanos. Los resultados de un experimento que involucraba la curación de una úlcera en una pierna,

demonstró que la curación rápida de la úlcera se asoció con la suplementación de zinc en individuos con niveles muy bajos de zinc plasmático [Pories y cols., 1967; Okada y cols., 1990].

Otro aspecto importante a considerar fue la redistribución hacia el sitio de la lesión que sufre el zinc durante los procesos quirúrgicos, por lo que esto fue analizado determinando la diferencia de captación de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ entre la piel lesionada e intacta, los resultados mostraron que el zinc se acumula alrededor de la lesión donde toma lugar la división celular, siendo mayor en etapas tempranas del proceso quirúrgico [Okada y cols., 1990].

Por otro lado, también se ha mostrado en modelos infecciosos o quirúrgicos que la disminución de zinc plasmático está estrechamente relacionada con la distribución de este metal hacia hígado.

1.3.1 Hipozinquemia y redistribución de zinc hacia hígado durante el proceso inflamatorio agudo

Durante la respuesta de fase aguda, la viscosidad del plasma incrementa como resultado de los cambios en la concentración de proteínas plasmáticas totales [Gruys y cols., 2005], por el contrario, también se ven disminuidas las concentraciones de algunos metales como hierro (hipoferremia) y zinc (hipozinquemia) plasmáticos. Al parecer, estos cambios en la respuesta de fase aguda tienen como finalidad proteger al hospedero [Moshage, 1997; Kim y cols., 2004]. En el caso de hipoferremia, el hospedero disminuye la biodisponibilidad de hierro evitando un mayor crecimiento de microorganismos patógenos [Jurado, 1997]. Previamente se ha reportado que la disminución de la concentración de hierro plasmático es generada por hepcidina, que es el principal péptido regulador del balance del hierro en la mucosa intestinal y macrófagos.

Bajo condiciones inflamatorias esta hormona inhibe la absorción de hierro por el intestino y su liberación de los macrófagos, su regulación depende de IL-6, IL-1 α e IL1- β , por lo que es contemplada como una proteína de fase aguda [Nemeth y cols., 2004; Lee y cols., 2004; Sheikh y cols., 2007]. En circulación el hierro es capturado por proteínas plasmáticas como transferrina, lactoferrina y ferritina, manteniendo su concentración en el

orden de 10^{-15} M, cantidad que es muy baja, ya que los microorganismos requieren en una concentración de 10^{-6} M para su crecimiento [Jurado, 1997].

A diferencia de la hipoferremia, el papel de la hipozinquemia no ha sido completamente entendida, estudios previos empleando modelos infecciosos e inflamatorios han reportado la redistribución de zinc plasmático hacia hígado [Cousins y Leinart, 1988; Brambila y cols., 1999; Liuzzi y cols., 2005]; por lo que se han propuesto algunas funciones en las que la biodisponibilidad del zinc es importante para la regulación de la gluconeogénesis, control de especies reactivas (óxido nítrico o radicales hidroxilo) y para la síntesis hepática de proteínas de fase aguda [Liuzzi y cols., 2005].

Durante la reacción de fase aguda se incrementa la concentración de un gran número de proteínas plasmáticas, colectivamente conocidas como proteínas de fase aguda, las cuales son sintetizadas casi exclusivamente en el hígado. Las proteínas de fase aguda pueden ser divididas dentro de dos grupos: tipo I y tipo II. Las proteínas tipo I incluyen amiloide A sérico (SSA), proteína C-reactiva (CRP), complemento C3, haptoglobina (rata), y α 1-glicoproteína ácida, todas ellas son inducidas por citocinas de la familia interleucina-1 (IL-1), las cuales comprenden IL-1 α , IL-1 β , factor de necrosis tumoral (TNF)- α y TNF- β . Dentro del grupo de las proteínas tipo II se encuentran fibrinógeno, haptoglobina (humanos), α 1-antiquimotripsina, α 1-antitripsina y α 2-macroglobulina (rata), que son inducidas por citocinas de la familia de IL-6, las cuales incluyen a la misma IL-6 y sus miembros, factor inhibidor de leucemia (LIF), IL-11, oncostatina (OSM), factor neurotrófico ciliar (CNTF) y cardiotrofina-1 (CT-1). La redundancia en la capacidad de las citocinas sintetizadas en la inflamación para favorecer la producción de proteínas de fase aguda por el hígado es mediante la inducción de un factor de transcripción común, que es el factor nuclear- κ B (NF- κ B) (Fig. 11), el cual activa tanto la expresión de IL-6 como de IL-1 [Moshage, 1997; Gruys y cols., 2005; Vasto y cols., 2006].

NF- κ B es un factor de transcripción que juega un papel importante en la expresión de un amplio número de genes como es el caso de las citocinas pro-inflamatorias (Fig. 15). En células no estimuladas, NF- κ B es secuestrado en el citosol a través de interacciones con la proteína inhibitoria I κ B, en este contexto se ha reportado que el zinc juega un importante papel en el transporte de NF- κ B a núcleo debido a que suprime la fosforilación de las

proteínas inhibitorias dando lugar a su degradación, permitiendo que el factor de transcripción NF- κ B quede libre y entre a núcleo [Jeon y cols., 2000].

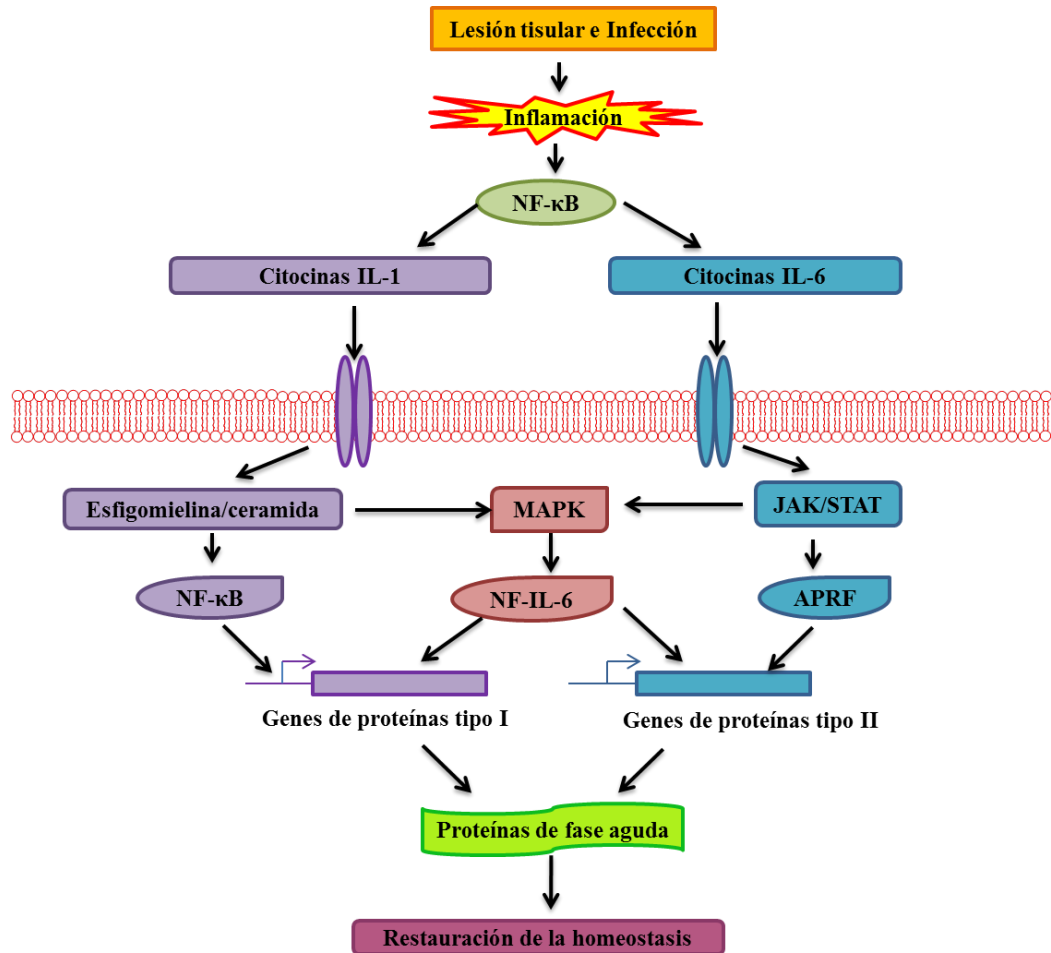


Figura 15. Diagrama de flujo que representa los hechos principales que conducen a la inducción de la respuesta de fase aguda. El disparo inicial conduce a la activación rápida del factor de transcripción NF- κ B, dando lugar a una mayor expresión de citocinas. La unión a receptores de citocinas inicia eventos de señalización, lo que lleva a la activación de varios factores de transcripción. Estos factores se unen a sus elementos de respuesta en las regiones promotoras de genes de fase aguda. La transcripción de los genes de fase aguda se induce y las proteínas de fase aguda son secretadas. En el medio extracelular, la función de las proteínas de fase aguda es restaurar la homeostasis. Modificado de Moshage y cols., 1997.

La IL-1 α humana fue empleada por Cousins y cols., para estudiar el curso temporal de sus efectos sobre el metabolismo del zinc como parte de la respuesta de fase aguda. Para ello administraron IL-1 α a ratas, lo que produjo una depresión transitoria en la

concentración de zinc sérico a las 6 horas posteriores a su administración, regresando a sus niveles basales a las 12 horas después de la administración; también observaron que la distribución de zinc entre varias proteínas plasmáticas no fue modificada, lo que no permitió explicar la reducción de zinc sérico. Para definir el efecto de IL-1 α sobre el metabolismo del zinc, analizaron la cinética de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ en los procesos inflamatorios, el cual fue administrado vía intravenosa; estos estudios mostraron un cambio dramático en la distribución de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ entre varios tejidos; encontrando una mayor concentración en timo y médula ósea, pero principalmente en hígado, sin embargo se observó una baja captación de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ por tejidos como hueso, piel e intestino, sugiriendo que la redistribución de zinc hacia algunos tejidos ocurre a expensas de otros (Fig. 16).

La redistribución de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ hacia hígado se vio acompañada por un incremento de metalotioneinas (MT) unidas a zinc, siendo 14 veces mayor en comparación con los animales testigo, estos datos sugirieron que la síntesis de metalotioneina estaba relacionada con la captación de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ por estos tejidos [Cousins y Leinart, 1988].

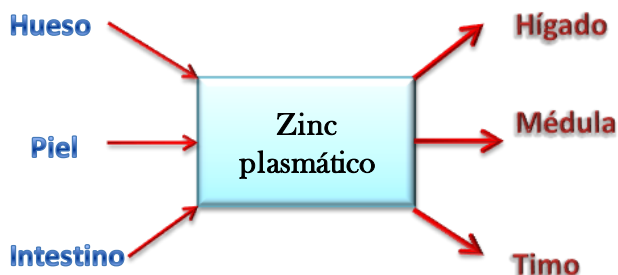


Figura 16. Redistribución de zinc inducido por IL-1 α . Hígado, timo y médula ósea acumulan más zinc y piel, hueso e intestino acumulan menos proporciones de zinc después de la administración de IL-1 α . Modificado de Cousins y Leinart, 1988.

Brambila y cols., investigaron los efectos tiempo-respuesta sobre la homeostasis del zinc y MT, durante las primeras 24 h de una cirugía abdominal en ratas, encontrando un incremento en el contenido de zinc hepático a las 20 y 24 h post-cirugía, y una disminución del nivel sérico de zinc, estos resultados nuevamente muestran una movilización de zinc desde plasma hacia hígado. Durante este mismo proceso, las metalotioneinas hepáticas incrementan significativamente a las 9 h post-cirugía, alcanzando un pico máximo hasta el doble del testigo a las 12 h post-cirugía, seguida por una disminución con el tiempo, sin llegar a los niveles testigo al término de las 24 h de estudio [Brambila y cols., 1999].

En otros modelos inflamatorios se demostró que la hipozinquemia era el resultado de la redistribución de zinc plasmático a otros tejidos, principalmente a hígado, sin embargo, hasta ese momento poco se sabía acerca del o los mecanismos que dan lugar a la redistribución tisular de zinc, por lo que Liuzzi y colaboradores, propusieron que la hipozinquemia podría estar dada por la participación de transportadores de zinc durante la inflamación. Para corroborar su hipótesis, seleccionaron transcritos de dos familias de genes que codifican para transportadores de zinc (ZnT y Zip) y evaluaron su expresión en hígado de ratón después de la administración de lipopolisacárido (LPS) y turpentina como agentes inflamatorios. Sus resultados mostraron que el ARN mensajero (ARNm) de Zip 14 fue regulado positivamente por la inflamación inducida por turpentina y LPS [Liuzzi y cols., 2005].

Debido a que la administración de turpentina y LPS también inducen la liberación de IL-6 como consecuencia del proceso inflamatorio, examinaron el papel de esta citocina sobre la expresión de Zip14 y MT en ratones knock-out para IL-6 (IL-6^{-/-}) que fueron administrados con Turpentina y LPS. Los resultados obtenidos mostraron que la turpentina no produjo hipozinquemia en ratones IL-6^{-/-}, ni incremento del nivel de ARNm de Zip14 y MT. Sin embargo, en ratones IL-6^{-/-}, la administración de LPS produjo una ligera respuesta hipozinémica, así como un marcado incremento en los niveles de ARNm de MT-1, pero no de los niveles de ARNm de Zip14. Estos resultados sugieren que la inducción de Zip14 por LPS requiere de IL-6 y no es influenciado por acumulación de zinc o MT en hígado, también revelaron que la regulación positiva de Zip14 fue específica para el hígado [Liuzzi y cols., 2005].

Mediante estudios de inmunohistoquímica, estos investigadores mostraron que tanto en la inflamación generada con turpentina como con LPS, se incrementó la expresión de Zip14 en la membrana plasmática de hepatocitos. Con todo lo descrito anteriormente se deja en claro que la regulación para la expresión de Zip14 ocurre a través de IL-6 y que este transportador es el que contribuye a la redistribución de zinc plasmático hacia hígado [Liuzzi y cols., 2005]. Una vía de señalización probable para la respuesta a esta citocina sería la vía STAT, aunque hasta el momento no se ha comprobado.

Posteriormente Lichten y colaboradores, investigaron otros posibles mecanismos por los cuales el LPS puede generar la hipozinquemia. Debido a que la sepsis inducida por

LPS produce la liberación de óxido nítrico (NO), postularon que éste podría actuar como un segundo mensajero y tener un papel importante en la redistribución tisular de zinc. Para demostrar esto, estimularon hepatocitos murinos con IL-1 β , una citocina pro-inflamatoria inducida por LPS y un potente activador de la sintasa de NO inducible (iNOS), que da lugar a la producción de NO. El tratamiento con IL-1 β incrementó hasta tres veces el ARNm de Zip14, potenciando así el transporte de zinc hacia el citoplasma de hepatocitos de ratón, pero no en hepatocitos iNOS^{-/-}. Estos datos sugieren que la vía de señalización activada por NO también es un factor importante en la regulación de Zip14, el cual media la acumulación de zinc y produce la hipozinemia durante la inflamación y sepsis [Lichten y cols., 2009].

Se ha reportado que la expresión de Zip14 incrementa en macrófagos estimulados con LPS y tratados con dexametasona, por lo tanto los glucocorticoides pueden ser inductores de la expresión de este transportador durante el proceso inflamatorio [Sayadi y cols. 2012]. Se ha observado que la acumulación de zinc y la síntesis de MT son estimuladas por glucagón, además de que se ha encontrado un incremento en la expresión de Zip14 en una línea celular que produce glucagón, por lo tanto esta hormona también puede ser un inductor de la expresión de Zip14 [Gyulkhandanyan y cols. 2008; Aydemir y cols. 2012].

1.4 Interleucina 6

Interleucina 6 (IL-6) es una citocina con actividad típica redundante y pleiotrópica. Después de sucesivas clonaciones del gen IL-6, se encontró que esta citocina ejerce una gran variedad de actividades biológicas en respuesta a poblaciones celulares a través de su unión con su receptor transmembrana (IL-6R) así como al IL-6R soluble. La producción transitoria de IL-6 contribuye a la defensa del hospedero contra infecciones y lesiones tisulares y cuando el estrés de la infección o de la lesión es retirado, la síntesis de IL-6 es removida. Sin embargo, la desregulación en la producción continua de esta citocina por distintas poblaciones celulares juega un papel patológico en varias enfermedades inflamatorias autoinmunes [Tanaka y cols., 2014].

IL-6 es una glicoproteína de 184 aminoácidos, la cual puede ser sintetizada por muchos tipos celulares incluyendo monocitos, células T, fibroblastos y células endoteliales. IL-6 se

une a su receptor específico, el cual es una proteína transmembrana de tipo 1 de 80 kDa. Una vez que IL-6 se une a su receptor se asocia con una segunda proteína transmembrana, gp130, el cual sirve como un transductor de la señal de la citocina. Interesantemente gp130 es la subunidad común del receptor de todos los miembros de la familia de citocinas tipo IL-6. La dimerización de gp130 conduce a la iniciación de varias vías de señalización intracelular [Schaper y cols., 2015].

Mientras gp130 es expresada en todas las células del cuerpo, la expresión de IL-6R es más restringida. IL-6R es principalmente encontrado en hepatocitos, neutrófilos, monocitos y linfocitos T CD4+. Dado que la IL-6 no muestra afinidad de unión para gp130 en ausencia de IL-6R, se deduce que sólo las células que expresan IL-6R pueden responder a la citocina IL-6 [Schaper y cols., 2015].

1.4.1 Transducción de la señal intracelular de IL-6

1.4.1.2 Activación de STAT3

La unión IL-6 al complejo receptor inicia la activación de proteínas- tirosinasa de la familia de Jaks, Jak1, Jak2 y Tyk2. Estas enzimas son constitutivamente asociadas a la cola poco estructurada de gp130. La interacción de Jak-cinasa con gp130 es mediada a través del dominio FERM, el cual se localiza dentro de los dominios de Jak cinasa (JH) JH7-JH5. En el sitio del receptor la región proximal a la membrana box1 y box2, contiene un motivo rico en prolina y un motivo hidrófobo respectivamente, contribuye a la interacción de Jaks y gp130. Las Jaks son activadas por autofosforilación en un motivo doble de tirosinas contenido en el dominio C-terminal JH1 [Schaper y cols., 2015]. La activación de las Jaks dan lugar a la fosforilación de motivos de tirosina dentro de la parte citoplásmica de gp130. Los cuatro dominios de fosfotirosina más distales de la membrana (Y767, Y814 y Y905) representan los sitios reclutamiento para STAT3 [Gerhartz y cols.,1996; Schmitz y cols., 2000a; Stahl y cols.,1995] los dos motivos que se encuentran más cercanos al dominio C-terminal (Y905, Y915) reclutan STAT1 [Gerhartz y cols., 1996]. La tirosina Y759 (Y757 en ratones) recluta tirosinfosfatasa SHP2, así como también el supresor de emisión de

señales de citocinas (SOCS3) [Nicholson y cols., 2000; Schmitz y cols., 2000; Eulendorf y cols. 2012].

La vía canónica de la JAK-STAT enfatiza la unión de monómeros de STAT1 o STAT3 a los motivos de tirosinas antes mencionados para dar lugar a la fosforilación de tirosinas de los factores STAT (STAT1:701; STAT3: 705) y posteriormente se forma los homo o heterodímeros que se translocan dentro del núcleo. En el núcleo estos factores de transcripción se unen a elementos potenciadores de promotores de genes inducibles por IL-6 [Schaper y cols., 2015].

1.4.1.3 Vías independientes de STAT activadas por IL-6

Además de la activación de factores de transcripción STAT, IL-6 estimula el inicio de la cascada de las protein cinasas activadas por mitogeno (MAPK) y de la cascada de fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K). Aunque actualmente los mecanismo subyacentes son pobremente entendidos (Fig. 17) [Eulendorf y cols. 2012].

La activación de las cinasas reguladas extracelularmente 1 y 2 (ERK 1/2) por IL-6 depende fuertemente de la fosfotirosina SHP2, la cual tiene como sitio de reclutamiento Y759 dentro de gp130 [Fukada y cols., 1996; Lai y cols., 1999]. Como ya se había descrito antes, este motivo de tirosina también está involucrado en la inhibición de la activación de STAT. Así, el balance entre la activación de MAPK y STAT es controlada por este motivo. Este balance fue encontrado crucial para el desarrollo de enfermedades inflamatorias y proliferativas [Judd y cols., 2004; Tebbutt y cols., 2002]. La hiperactivación de ambas vías de STAT3 y MAPK, es asociada con esplenomegalia y trombocitosis, donde la activación del daño de ambas vías es asociado con una reducida respuesta de fase aguda y trombocitopenia. Cambiando el balance de activación de STAT3 y MAPK hacia la activación de STAT3 correlaciona con además gástricos, artritis autoinmune y potencia la expresión de citocinas Th1. En contraste, el cambio de balance hacia la activación de MAPK reduce la expresión de genes e incrementa la expresión de citocinas Th2 [Ernst y Jenkins, 2004]. Una tercera vía activada por IL-6 es la de fosfoinositol-3-cinasa (PI3K)- vía protein cinasa B (Pkb)/Akt la cual es reclutada como JAK puede activar y fosforilar la enzima PI3K. Esta enzima posteriormente modifica ciertos fosfatidilinositidos para fosforilar fosfatidil inositol-4,5-bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol -3,4,5-trifosfato (PIP3).

PIP3 en turno fosforila y activa la cinasa treonina/serina cinasa PkB/Akt la cual es reclutada en la membrana plasmática [Hennessy y cols., 2005]. Akt activada fosforila varios blancos río abajo para regular positivamente las vías de señalización de supervivencia celular [Chien y cols., 2010].

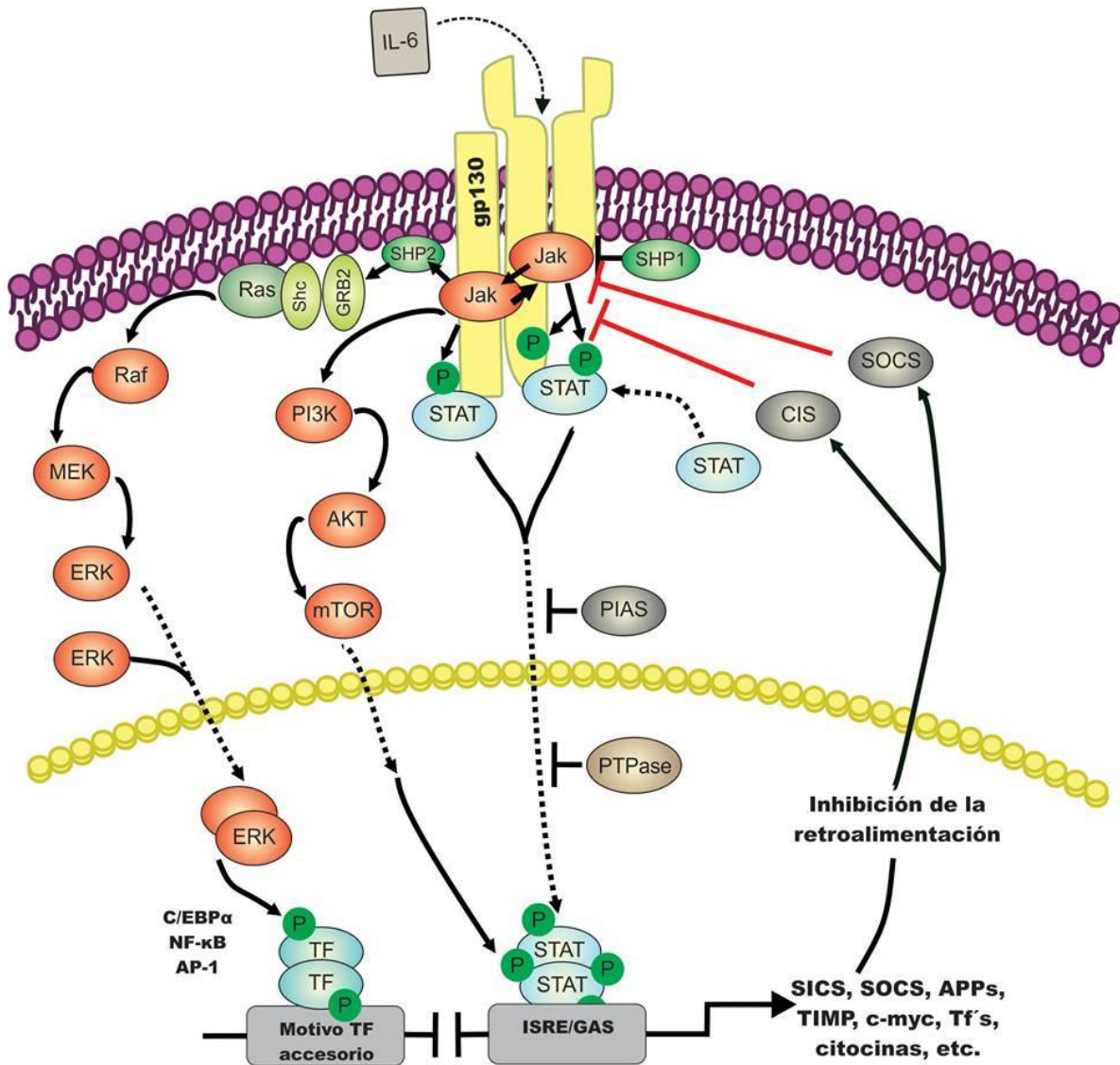


Figura 17. Vías de señalización activadas por IL-6. IL-6 se une a IL-6R para iniciar eventos celulares incluyendo la activación de la señalización mediada por JAK cinasas, MAPK y PI3K, las cuales dan a la activación de varios factores de transcripción SOCS y PIAS regulan negativamente la actividad de IL-6. Tomado y modificado de Ataie-Kachoe y cols., 2013; Eulenfeld y cols., 2012

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente se ha reportado que la hipozinquemia generada durante inflamación es explicada por la redistribución de zinc plasmático hacia hígado, proceso que es mediado por el importador de zinc Zip14.

Estudios previos han mostrado que la expresión del transportador Zip14 depende de IL-6 y NO como segundo mensajero. Sin embargo hasta el momento no se han estudiado las vías de señalización que pueden estar regulando la expresión del transportador durante el proceso inflamatorio.

En la inflamación inducida por cirugía abdominal se ha encontrado un incremento en el nivel del ARNm de Zip14, pero aún no se ha evaluado a la proteína ni los mecanismos de regulación para su expresión.

Una cuestión aun por responder en los modelos de inflamación experimental estudiados es el tiempo al cual el zinc retorna a su homeostasis y si este proceso es mediado por ZnT1, además de si su regulación depende del factor de transcripción de respuesta a metales tipo 1(MTF-1).

Con base a lo anterior se plantea las siguientes preguntas:

¿Cuál es el efecto de la administración de inhibidores de las vías de señalización para IL-6 e IL-1 sobre la expresión de Zip14?

¿Cuál es el papel del transportador ZnT1 en el retorno a la homeostasis del zinc hepático después de la inflamación inducida por cirugía abdominal en ratas?

5. JUSTIFICACIÓN

Las funciones esenciales del zinc en humanos fueron reconocidas hace más de 50 años. Desde esta fecha se han realizado una multitud de estudios, encontrando que el zinc es un bioelemento esencial en la regulación de la respuesta inmune. La deficiencia de zinc

afecta múltiples aspectos de la inmunidad innata y adaptativa, viéndose reflejados en alteraciones de la expresión de citocinas, transportadores de zinc y moléculas de señalización.

La inflamación es una respuesta inmune que es activada por diversos estímulos, dentro de los cuales se encuentra el trauma quirúrgico, en donde se ha descrito una redistribución de zinc desde circulación hacia hígado, sin que hasta el momento se haya determinado completamente el mecanismo involucrado en esta redistribución.

Recientemente se ha identificado al transportador Zip14 como una proteína involucrada en la captación de zinc hepático durante modelos de inflamación en roedores. Al mismo tiempo se ha reportado que la regulación de la expresión de este transportador depende de IL-6 e IL-1 β , las cuales son las principales citocinas pro-inflamatorias que desencadenan la respuesta de fase aguda durante la inflamación.

Previamente en modelos de inflamación inducida por una cirugía abdominal en ratas se ha reportado que existe un aumento en el nivel de ARNm de Zip14 a las 12 horas post-cirugía e incrementos en plasma de IL-6 e IL-1 β , por lo que cabe la posibilidad de que en este modelo la expresión del transportador dependa de estas citocinas.

El retorno a la homeostasis posterior a los procesos inflamatorios requiere de un equilibrio bioquímico, por lo que el incremento de zinc en los hepatocitos durante una cirugía abdominal debe retornar a sus niveles basales. Debido a esto, en este proyecto se estudiará la participación del exportador de zinc, ZnT1, durante este proceso.

Con los resultados obtenidos en este proyecto se ha podido ampliar la información acerca de los mecanismos bioquímicos involucrados en la redistribución de zinc desde plasma hacia hígado, además de dilucidar los mecanismos celulares empleados para el retorno de zinc a sus concentraciones basales durante un trauma quirúrgico.

6. HIPOTESIS

Hipótesis nula. La inhibición diferencial de los inductores de las vías de señalización para la expresión de Zip14 no afecta su síntesis, ni la redistribución de zinc desde plasma a hígado, y el transportador ZnT1 no participa en el retorno de la homeostasis de zinc hepático después de una cirugía abdominal en ratas.

Hipótesis alternativa. La inhibición diferencial de los inductores de las vías de señalización para la expresión de Zip14 afecta su síntesis y la redistribución de zinc desde plasma a hígado, y el transportador ZnT1 participa en el retorno de la homeostasis de zinc hepático después de una cirugía abdominal en ratas.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL:

Estudiar las vías de señalización involucradas en la expresión del transportador Zip14 usando inhibidores específicos, así como el papel del transportador ZnT1 en el control de la concentración hepática de zinc en ratas con una cirugía abdominal.

7.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

En ratas sometidas a una cirugía abdominal:

1. Evaluar el nivel de ARNm de Zip14 y su expresión en hígado a las 3, 6, 9, 12, 16, 20 y 24 horas después de realizar la cirugía.
2. Determinar los niveles de zinc hepático total a las 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 horas después de la cirugía.
3. Evaluar el efecto de los inhibidores de las vías de señalización de las citocinas IL-6 e IL-1 sobre la expresión de Zip14 a las 12 y 24 horas después de realizar la cirugía.
4. Evaluar el nivel de ARNm y la expresión del transportador ZnT1 a las 20, 24, 28, 32, 36 y 48 horas después de la cirugía.
- 5.
6. Evaluar la expresión del factor de transcripción MTF-1 a las 20, 24, 28, 32, 36 y 48 horas después de la cirugía.

8. METODOLOGÍA

8.1 Animales y Tratamiento

Animales y Tratamiento

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar, con un peso entre 170-220 g, provenientes del Bioterio Claude Bernard de la BUAP. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas y fueron alimentados con una dieta específica para rata (standard chow) y agua *ad libitum*. El número total de animales fue de 110, los cuales se dividieron en 2 grupos; “control” y “cirugía”. A su vez estos grupos fueron subdivididos en 11 subgrupos de 5 animales cada uno. Previo a la cirugía, ambos grupos fueron sometidos a un período de ayuno de 4 horas. Todos los animales fueron anestesiados con una mezcla de Xilacina/Ketamina (20/137 mg/Kg) y posteriormente al grupo “cirugía” se le realizó una incisión abdominal de 3 cm. Después de la cirugía las ratas fueron nuevamente anestesiadas a las 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 y 48 h, y mediante punción cardiaca se obtuvo una muestra de sangre total para obtener el suero. Una vez realizada la perfusión, posteriormente el hígado fue extraído y se almacenó a -70 °C hasta la realización de los análisis correspondientes. En la segunda serie de experimentos, las ratas (n=50) fueron divididas en un grupo denominado inhibidor (n= 25) y un grupo vehículo (n= 25). Antes de realizar el proceso quirúrgico, se administraron los siguientes inhibidores: el inhibidor de Jak2 (AG490) y su vehículo (DMSO 10 %); inhibidor de Stat3 (S3I-201) y su vehículo (DMSO 10 %); inhibidor de PI3K (wortmannin) y su vehículo (DMSO 15%); inhibidor de NFκB (PDTC) y su vehículo (solución salina), el inhibidor de JNK (SP600125) junto con el inhibidor de MAPp38 (SB239063) y su vehículos aceite de aliva y goma de tragacanto. Posterior a la cirugía las ratas fueron sacrificadas 9 horas después, y se obtuvo una muestra de sangre total por punción cardiaca para posteriormente obtener el suero. Una vez finalizada la perfusión, el hígado fue extraído y se almacenó a -70 °C hasta la realización de los análisis correspondientes.

8.2 Cuantificación de zinc en tejido hepático y suero

La concentración de zinc en hígado fue determinada por espectrometría de absorción atómica de flama (AAS). Se utilizaron 500 mg de tejido hepático y se colocaron en una mezcla de ácido perclórico (50%) y ácido nítrico (15.6 M) en una relación 1:1, esta mezcla fue incubada a 37 °C por 3 días en un baño seco ACCU BLOCK™ (Labnet) hasta su completa digestión, posteriormente las muestras fueron diluidas con agua desionizada. Para la determinación de zinc en suero, se realizó una dilución 1:5 suero-agua desionizada, respectivamente. El zinc presente en las soluciones obtenidas fue medido con un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer AAnalyst 100), el cual se calibró con soluciones estándar de ZnCl₂ con concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 ppm para generar una curva de calibración. La concentración final del metal fue obtenida mediante interpolación de la absorbancia de las muestras en la curva de calibración.

8.3 Tinciones de Zinquinina y Ditizona

Una solución recién preparada de Etil ester de Zinquinina in DMSO (5 mM) fue diluida en PBS a una concentración final de 25 µM y posteriormente se aplicó al tejido hepático contenidos en los portaobjetos. Después las muestras fueron lavadas tres veces con PBS para remover el exceso de Zinquinina, se dejaron secar y posteriormente se les adiciono medio de montaje (Vectashield). La fluorescencia de zinquinina fue visualizada por microscopía con una longitud de onda de excitación de 351-358 nm y de emisión a 460 nm.

La tinción de ditizona fue realizada de la siguiente manera: 100 µg de ditizona (sigma) fueron disueltos en acetona, al que se le adicionó un volumen igual de agua libre de zinc. Los portaobjetos fueron expuestos por 15 minutos, seguido por lavados de agua libre de Zn, y los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos, finalmente fueron observados con microscopio óptico.

8.4 Cuantificación de metalotioneina en hígado por el método de saturación con ¹⁰⁹Cadmio

La determinación de la concentración de MT hepática se realizó de acuerdo al método de saturación con ¹⁰⁹Cd/hemoglobina de Onosaka y Cherian (1978) como una modificación por Eaton y Toal, 1982. El método fue el siguiente: 1 g de tejido hepático fue homogenizado en frío con buffer Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7.4 (4 volúmenes), posteriormente se centrifugo a 18, 000 x g por 20 minutos. A 100 µL de sobrenadante se le adicionó 100 µL de solución de ¹⁰⁹Cd, posteriormente se incubó durante 10 minutos. Luego se adicionó 500 µL de una solución de hemolisado. Estos tubos fueron calentados en un baño de agua hirviendo por 2 minutos y posteriormente fueron enfriados en un baño de hielo por 5 minutos y finalmente fueron centrifugados a 18, 000 x g por 5 minutos. Se adicionó el hemolisado a la muestra y se calentó nuevamente en agua hirviendo, este paso se repitió por una vez más. La cantidad de ¹⁰⁹Cd fijado por la MT presente en el sobrenadante se midió mediante un detector de centelleo gamma (Perkin Elmer Wisard 1470 Automatic Gamma Counter).

8.5 Aislamiento de ARN total

El ARN total de hígado se aisló mediante el método de Trizol (life technologies) según las especificaciones del producto, las muestras fueron tratadas con DNasa I, grado amplificación, el ARN fue cuantificado por espectrofotometría (ND-1000 [V3.12], NanoDrop, Houston, TX, USA) y la integridad confirmada usando un gel de agarosa al 0.8 %. 400 ng de A RN total fueron sometidos a retrotranscripción usando 200 U con MMLV transcriptasa reversa (Thermo Scientific), 0,2 µg de random primer (Thermo Scientific), 10 mM dNTPs (Thermo Scientific), y 20 U de inhibidor RiboLock RNase (Thermo Scientific) en un volumen total de 15 µL.

Posteriormente el cDNA fue amplificado mediante PCR en tiempo real utilizando el sistema comercial TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol (Applied Biosystem). Como gen constitutivo se empleó β-actina fue usada como gen constitutivo. Para la

cuantificación fue usado el método de CT comparativo ($\Delta\Delta CT$), en el cual los resultados de los niveles de mRNA de las muestras fueron normalizados con los niveles de mRNA del gen constitutivo como referencia endógena.

8.6 Inmunohistoquímica

El tejido hepático fue fijado con formalina al 4 %. Todas las muestras fueron deshidratadas en soluciones de etanol de diferentes grados y posteriormente se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de tejido a 5 μ m y se montaron en portaobjetos con 3-aminopropiltrietoxisilano. Posteriormente los portaobjetos fueron calentados a 60 °C por 30 minutos y enfriados a temperatura ambiente, se desparafinaron y rehidrataron. La recuperación antigénica fue realizada con Diva Decloaker (Biocare Medical) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los portaobjetos se sumergieron en una solución al 0.3 % de H₂O₂ por 10 minutos para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, posteriormente se lavaron tres veces con PBS (pH 7.4). Después de los lavados, las muestras fueron incubadas con una solución al 2 % de albumina bovina (Sigma) a temperatura ambiente por 1 h en una cámara húmeda. El anticuerpo contra Zip14 (abcam) y ZnT1 (Santa Cruz) fue diluido (1:170 y 1:50 respectivamente) en una solución al 1 % de albumina bovina. Los tejidos fueron incubados a 4° C toda la noche con el anticuerpo primario en una cámara húmeda. La detección del anticuerpo primario fue realizada con la incubación con un anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rabano (HRP, 1:200, abcam) por 2 h en una cámara húmeda.

8.7 Ensayos de Western Blot

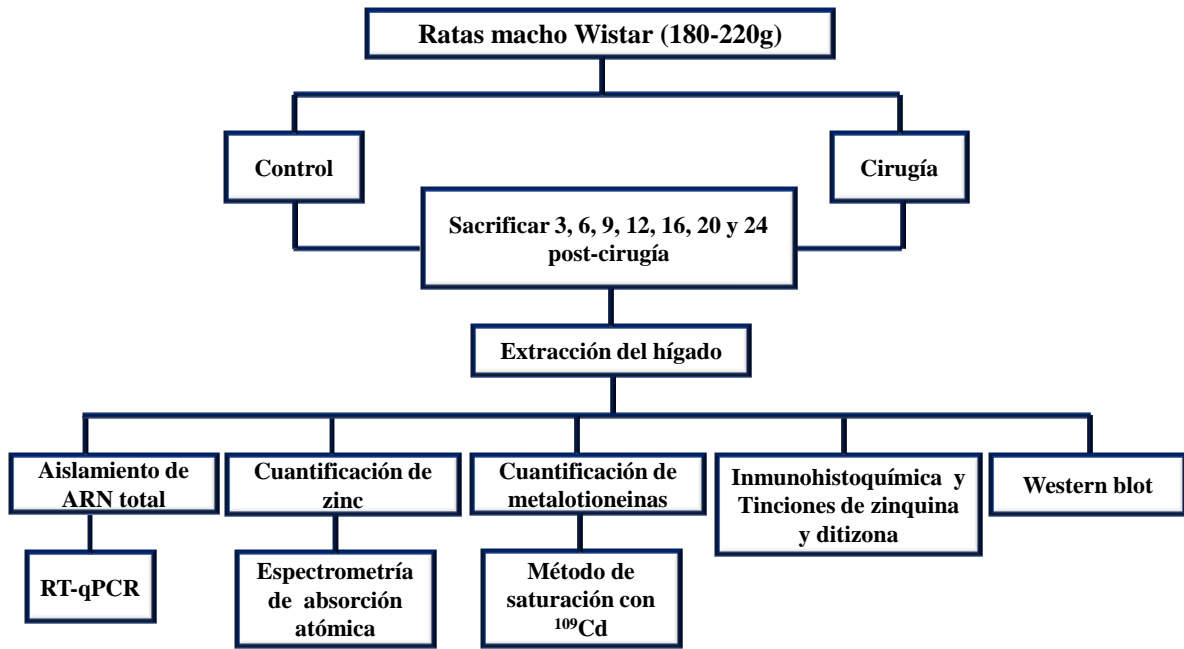
Muestras de hígado fueron homogenizados en buffer RIPA con inhibidores de fosfatasa y proteasas. Los homogenizados fueron centrifugados a 16, 000 x g durante 20 minutos a 4 °C. Las proteínas solubles totales fueron determinadas por el método de Lowry, y 40 μ g de éstas por carril fueron sometidos a una SDS electroforesis con geles de poliacrilamida a

través de geles al 4-20 % (Bio Rad geles, Bio Rad, México). Después de la electroforesis, las proteínas fueron electrotansferidas a membranas de PVDF al finalizar la transferencia la membrana fue teñida con rojo de Ponceau. La inmunodetección fue realizada con anticuerpos monoclonales y policlonales contra anti-conejo Zip14 (abcam), anti-ratón p-STAT3, anti-conejo STAT3, anti-conejo p-Akt 1/2/3, anti-conejo NFκB p65, anti-ratón p-p38, anti-ratón p-JNK, anti-cabra ZnT1, anti-conejo MTF-1, anti-conejo lamina A, anti-conejo β-actina (Santa Cruz). La detección del anticuerpo primario fue realizada después con la incubación con un anticuerpo anti-conejo, anti-cabra y anti-ratón conjugado con peroxidasa de rabano por 2 h en a temperatura ambiente en movimiento suave. Los inmunoblots fueron visualizados con un potenciador de quimioluminiscencia para medir la abundancia por densitometría digital.

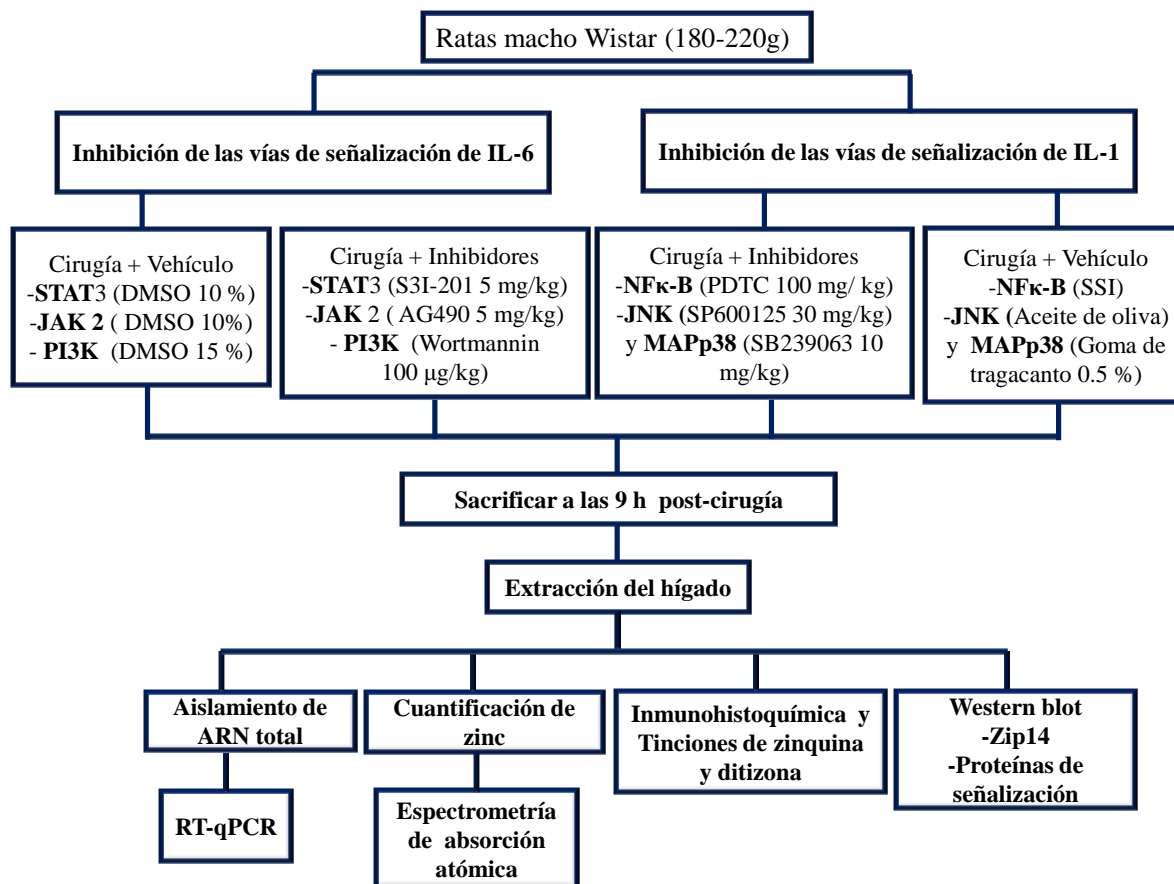
8.8 Análisis de datos

Los resultados obtenidos en los grupos problema se compararon con los obtenidos en los grupos testigo en cada variable de respuesta mediante la prueba “t” de student y análisis de varianza. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a un nivel de $p < 0.05$.

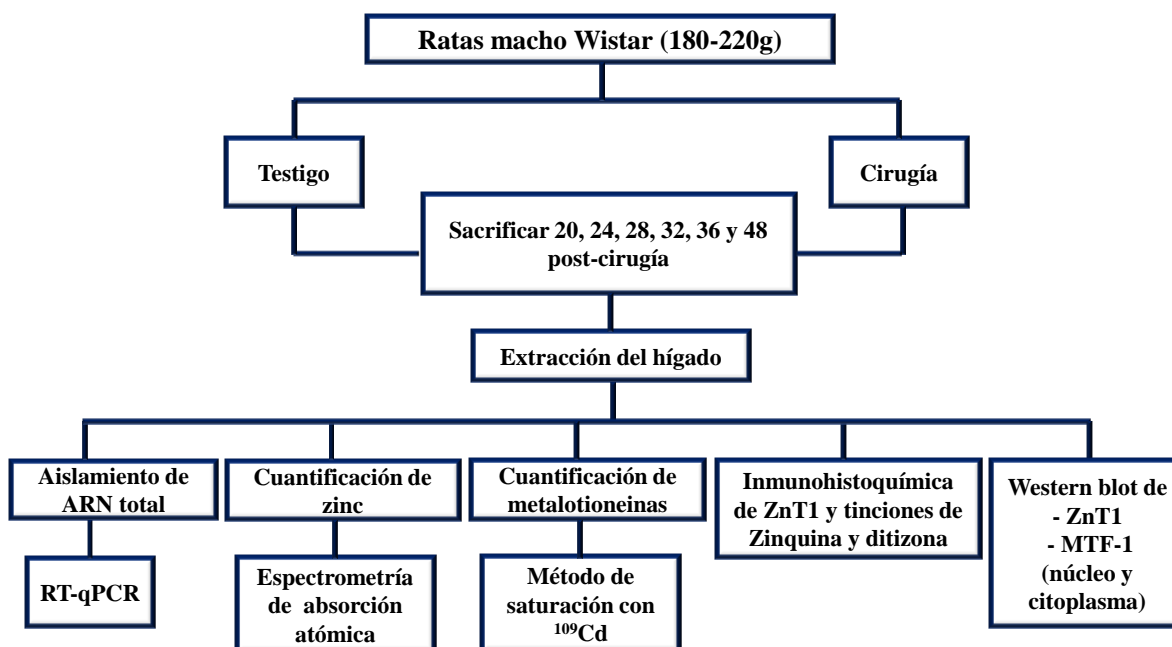
8.9 Esquema de trabajo para evaluar la expresión Zip14 durante el proceso inflamatorio agudo



8.8 Esquema de trabajo para evaluar el efecto de los inhibidores de las vías de señalización sobre la expresión de Zip14



8.9 Esquema de trabajo para evaluar la expresión de ZnT1



9. RESULTADOS

9.1 Zinc y metalotioneínas durante el proceso quirúrgico experimental

El proceso quirúrgico experimental practicado en los animales produjo una disminución en la concentración sérica de zinc a las 9 horas, manteniéndose así hasta las 20 h. Estas disminuciones oscilaron entre el 25 al 35%, al ser comparadas contra sus respectivos testigos. A las 24 horas el nivel de zinc sérico retornó a su nivel basal (Fig. 18). A nivel hepático, la concentración de zinc, en los animales con cirugía registró una disminución a las 3 h post-cirugía del 31% y un incremento significativo del 29% a las 24 h post-cirugía (Fig. 19). Estos resultados muestran que la inflamación desarrolló un proceso hipozinquémico y la redistribución de zinc sérico hacia hígado.

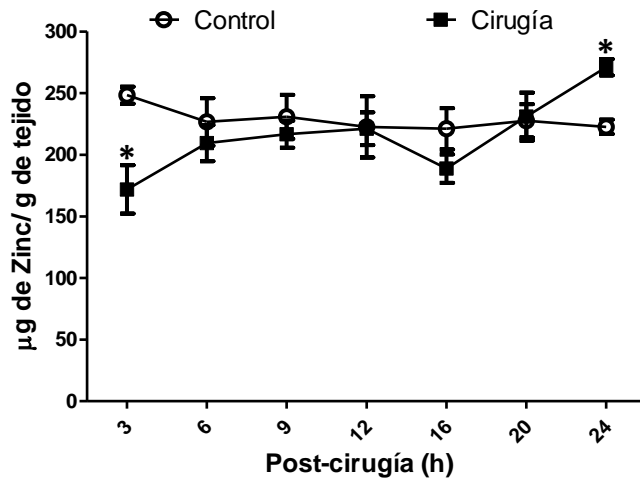


Figura 18. Verificación del proceso hipozinémico. Cada punto representa la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

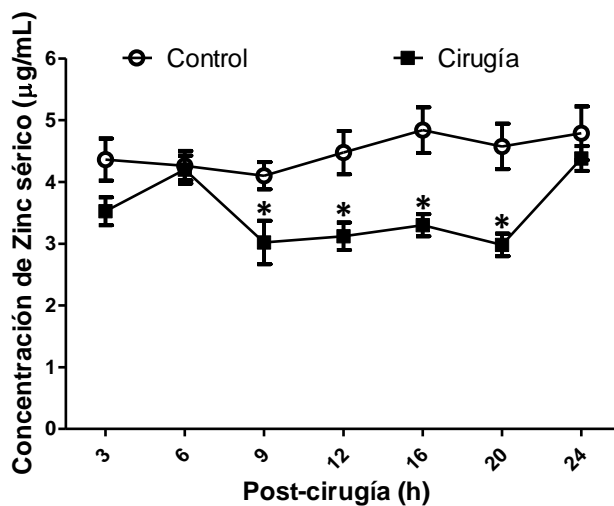


Figura 19. Redistribución de zinc sérico hacia hígado durante el proceso inflamatorio localizado. Cada punto representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

9.2 Detección de Zinc libre en tejido hepático

Con la finalidad de evaluar los niveles de zinc debilmente unido a proteínas se realizaron cortes del tejido hepático (5 μ m) que fueron teñidos con Zinquina, el cual es un compuesto fluorescente permeable a la membrana plasmática, altamente específico, capaz de detectar concentraciones nanomolares de zinc intracelular debilmente unido a proteínas. Las fotomicrografías mostradas en la Figura 3a evidencian una disminución en el canal de emisión a 490 nm, en los grupos de 3 h y 6 h (Figura 20a) comparado con su respectivo grupo testigo; sin embargo a las 9 horas de realizada la cirugía, la cantidad de Zn^{2+} es incrementada (Figura 3a). En los grupos de 12, 16, 20 y 24 horas es similar a la presentada

por el grupo testigo (Figura 20a). El análisis densitométrico de las fotomicrografías (Figura 20b) muestra una disminución en promedio del 13% y 18% del nivel de Zn^{2+} debilmente unido a proteínas a las 3 y 6 h post-cirugía respectivamente. A las 9 horas el aumento fue del 12 %, y posterior a este incrementos se observó un retorno a su nivel basal a partir de las 12 horas.

9.3 Localización de zinc compartimentalizado

Para definir el efecto del proceso quirúrgico sobre la distribución de zinc a nivel intracelular, se realizaron cortes del tejido hepático (5 μ m), los cuales fueron teñidos con ditizona. Las fotomicrografías (Figura 21a) y el análisis densitométrico (Figura 21b) evidencian que hubo una disminución del Zn^{2+} compartimentalizado a las 3 h y 6h, siendo en promedio del 14 % y 8 % respectivamente, posteriormente se observó un incremento en comparación con sus testigos a las 9 h, 12 h, 16 h, 20 h y 24 h, la estos incrementos fueron en promedio del 11 %, 4 %, 11 %, 6 % y 4 % respectivamente.

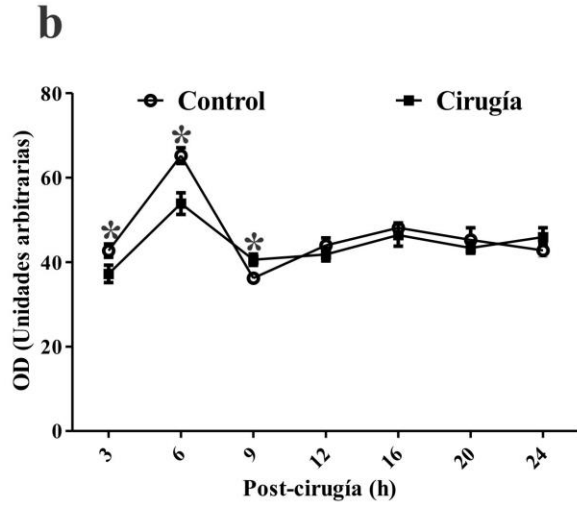
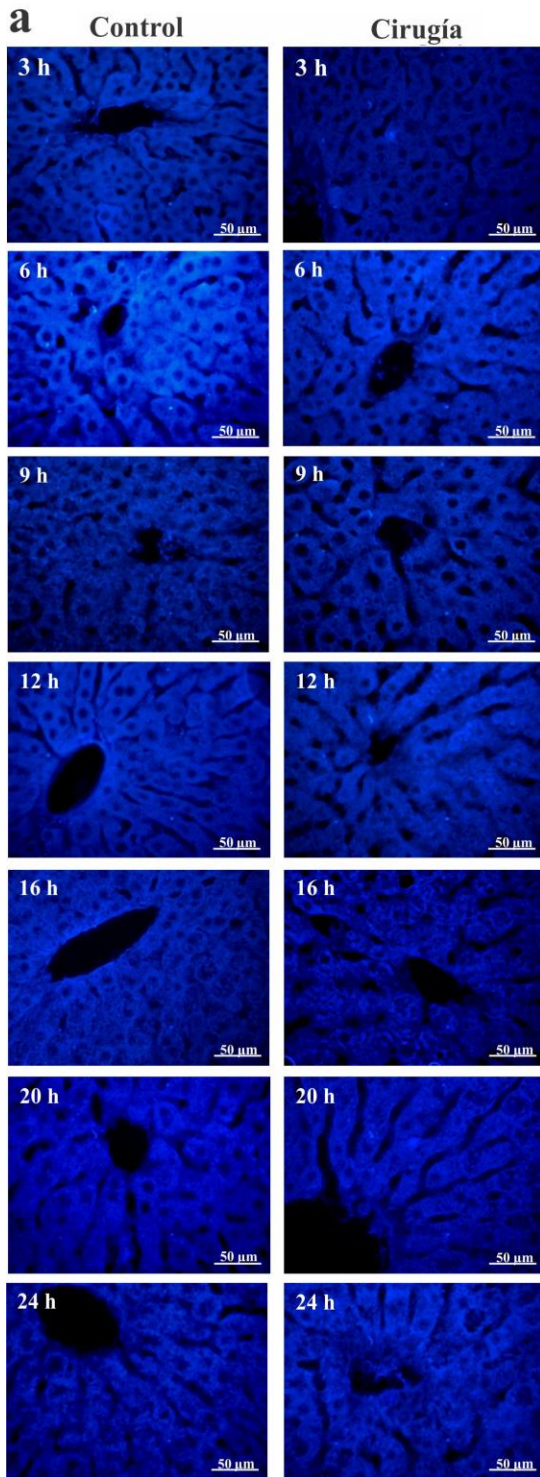


Figura 20. Efecto del proceso inflamatorio sobre el Zn^{2+} libre en tejido hepático. a, Tinción de zinquina. b, Análisis densitométrico del Zn^{2+} . Cada punto representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. El asterisco () indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student. Magnificación: 40X*

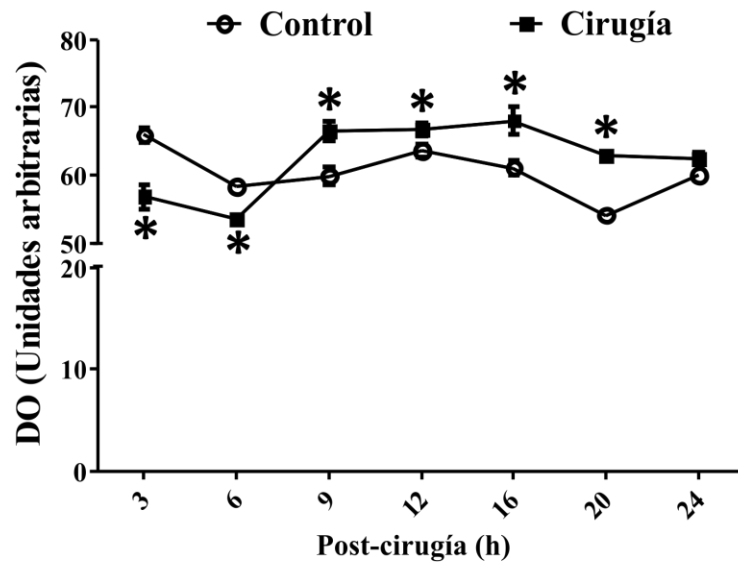
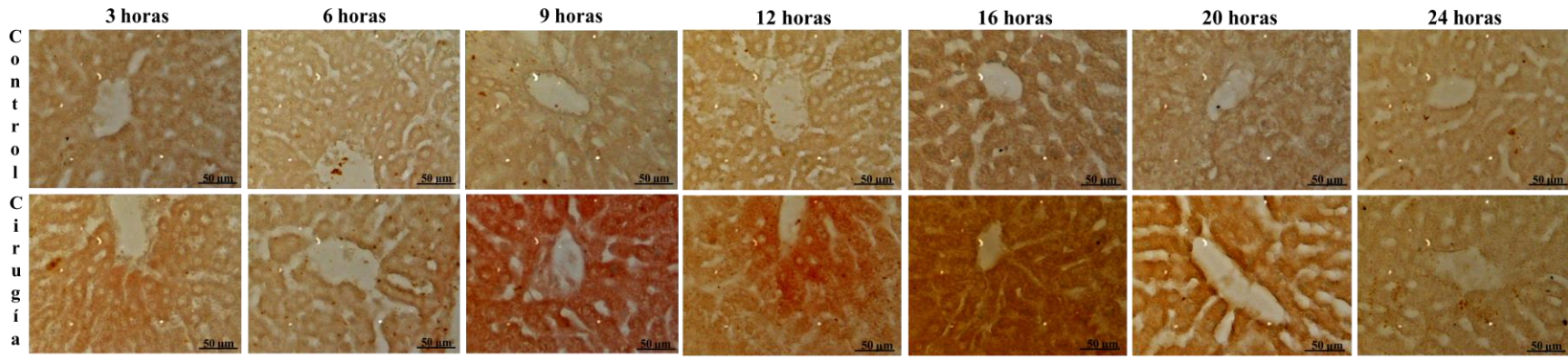


Figura 21. Efecto del proceso inflamatorio sobre el Zn²⁺ total en tejido hepático. a, Tinción de zinquina. b, Análisis densitométrico del Zn²⁺. Cada punto representan la media ± SEM de 5 experimentos independientes. El asterisco () indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student. Magnificación: 40X*

9.5 Expresión de metalotioneínas durante el proceso inflamatorio

Con relación a la determinación de la concentración hepática de metalotioneínas, estas proteínas mostraron incrementos significativos entre las 6 y 24 h de realizada la cirugía abdominal en los animales estudiados. El máximo incremento encontrado se presentó a las 9 h post-cirugía, siendo 3 veces mayor en comparación con el grupo de animales testigo. Seguido de este nivel máximo, el contenido de metalotioneínas disminuyó con el tiempo sin llegar a los niveles basales, presentando un segundo incremento a las 24 horas (Figura 22).

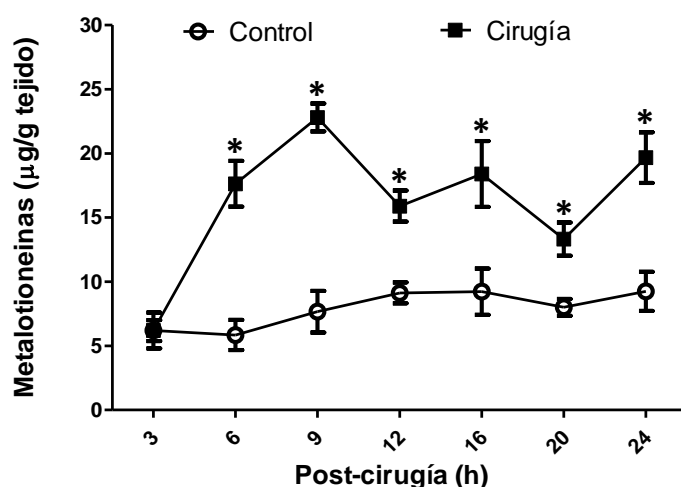


Figura 22. Incremento de la concentración de metalotioneínas en hígado. La concentración de MTs totales fue determinada por el método de saturación con ^{109}Cd . Cada punto representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. El asterisco () indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.*

9.6 Determinación del nivel de ARNm de Zip14 mediante RT-qPCR

Para estudiar si el proceso quirúrgico tuvo efecto sobre el nivel del ARNm de Zip14, se utilizó la técnica de RT-PCR en tiempo real, en la figura 23 se puede evidenciar que existen una disminución de este a las 3 h; sin embargo a partir de las 6 h y hasta las 20 h los niveles incrementan, teniendo un máximo a las 9 h el cual es de 2 veces más que el grupo testigo. A las 20 h ARNm retorna a su nivel basal.

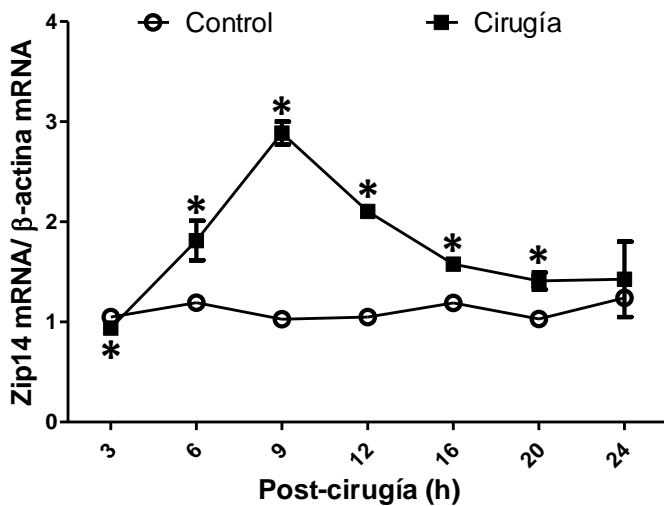


Figura 23. El nivel de ARNm de Zip14 es afectado por el proceso inflamatorio. La cantidad relativa del ARNm fue determinado por RT-PCR en tiempo real. El ARNm de Zip14 fue normalizado con el ARNm de β -Actina. Cada barra representa la media \pm EEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

9.10 Evaluación de la expresión de Zip14 mediante inmunohistoquímica

Para investigar el efecto que desencadena el proceso quirúrgico sobre la expresión de Zip14, se utilizaron cortes (5 μ m) de tejido hepático obtenido de animales previamente sometidos a una cirugía abdominal, para realizar estudios de inmunohistoquímica. En el panel de fotomicrografías se puede evidenciar un precipitado color marrón propiciado por la actividad de la peroxidasa al reaccionar con diaminobencidina, el cual es tomado como marca positiva de la interacción antígeno anticuerpo específica para detectar al transportador de zinc Zip14; esta marca fue localizada a nivel de citoplasma de hepatocitos de los grupos testigo y en el caso de los grupos con cirugía se presenta un incremento de la inmo-reactividad a nivel de citoplasma (Figura 24a). La densidad óptica de las fotomicrografías fue dividida entre el número de células por campo para obtener la inmunorreactividad promedio de cada célula. Con este análisis se encontraron incrementos del 16 %, 8 %, 26 %, 36 %, 19% y 7 % en los grupos de 3, 6, 9, 12, 16 y 20 horas respectivamente comparándolos con su grupo testigo (Fig. 24b); en el caso del grupo de 24 h no se detectaron cambios significativos (Fig. 24b). Estos resultados fueron corroborados con un análisis de Western blot (Fig. 25)

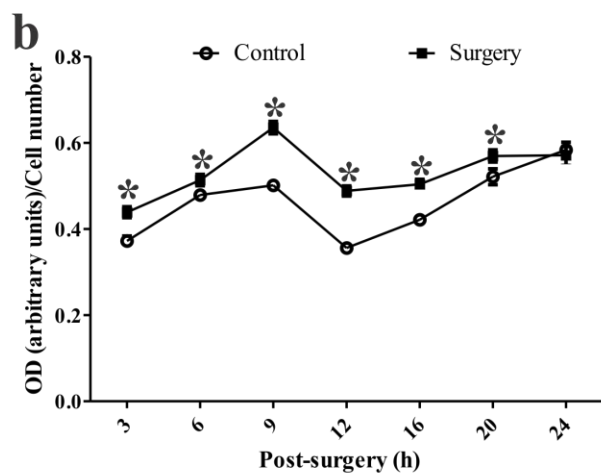
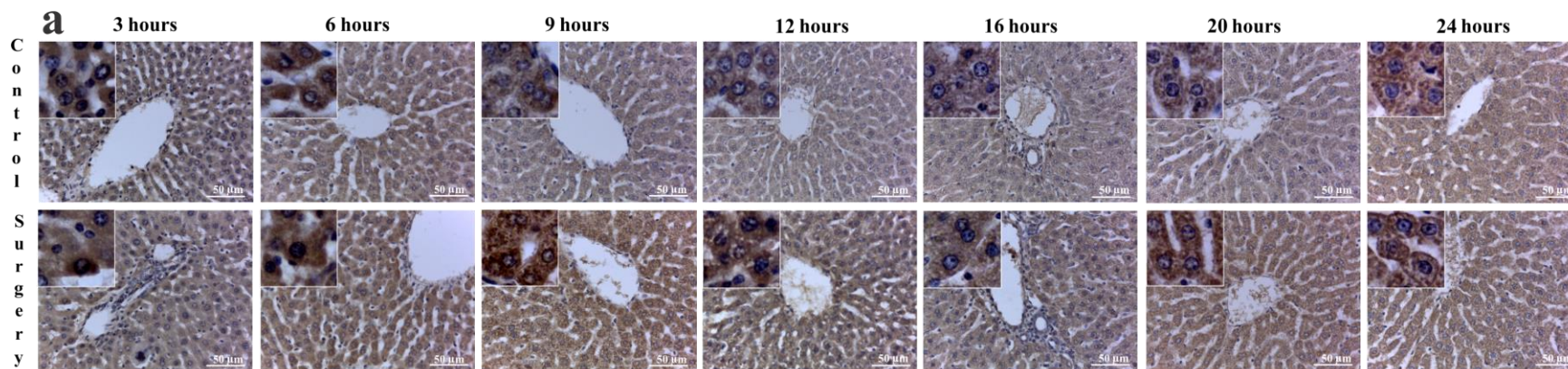


Figura 24. Detección inmunohistoquímica de la expresión de Zip14 durante el proceso inflamatorio. a, Fotomicrografías representativas muestran la inmunoreactividad para Zip14 (precipitado café). b, Análisis densitométrico de la inmunorreactividad de Zip14 generada por célula. Cada punto representa la media \pm EEM de 36 campos diferentes. El asterisco () indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba *t* de Student. Magnificación: 40X*

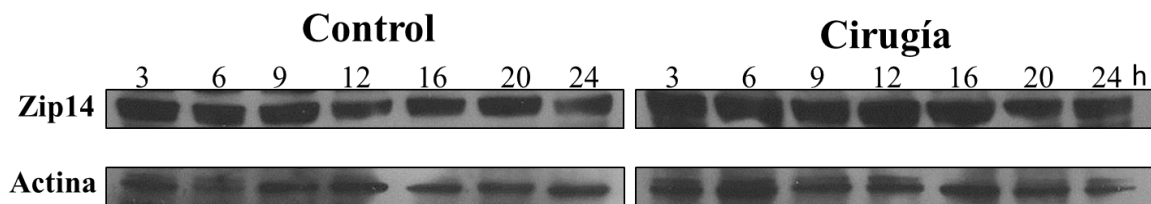


Figura 25. El trauma quirúrgico induce la expresión diferencial de Zip14. Análisis de Western blot del transportador Zip14 en hígado de ratas con cirugía.

9.11 Efecto de la inhibición de las vías de señalización de IL-6 sobre la expresión de Zip14

Durante las primeras 20 horas del proceso inflamatorio generado por un trauma quirúrgico se ha puesto de manifiesto que el nivel de ARNm del importador de zinc Zip14 incrementa, así como también su expresión proteica; en reportes previos se ha sugerido que los reguladores positivos en procesos infecciosos son IL-6 e IL-1, las cuales hemos descrito que se encuentran incrementadas durante el trauma quirúrgico. Para determinar si IL-6 es quien regula la expresión del transportador de Zip14 durante el proceso inflamatorio generado por la cirugía, se utilizó AG490 un inhibidor específico de Jak2, ya que es la primera enzima activada por para iniciar la transducción de señales regulada por IL-6. Debido a que Jak2 da lugar a la fosforilación de STAT3, para comprobar que ocurrió la inhibición se evaluó por western blot a STAT3 fosforilado (pSTAT3-Tyr 705) encontrando que al administrar el inhibidor se redujo la fosforilación de STAT3 en promedio ~75% al compararlo con su grupo vehículo (DMSO 10%) (Fig. 27), por el contrario cuando se evaluó a STAT3 total se observó un incremento de la proteína dos veces mayor cuando se comparó con su grupo vehículo (Fig. 27). Con estos resultados se demostró la inhibición de Jak2.

Posteriormente al evaluar el efecto de la inhibición sobre el nivel de ARNm de Zip14 se encontró una disminución de este en promedio del 26%, (Figura 26); por lo tanto se evaluó la expresión de la proteína del transportador por western blot se observó una disminución en la intensidad de la banda (Figura 27a) en el grupo al que se le administró el inhibidor,

con el análisis densitométrico se corroboró que la disminución fue del 66% de la síntesis comparado con su grupo vehículo (Figura 27b.)

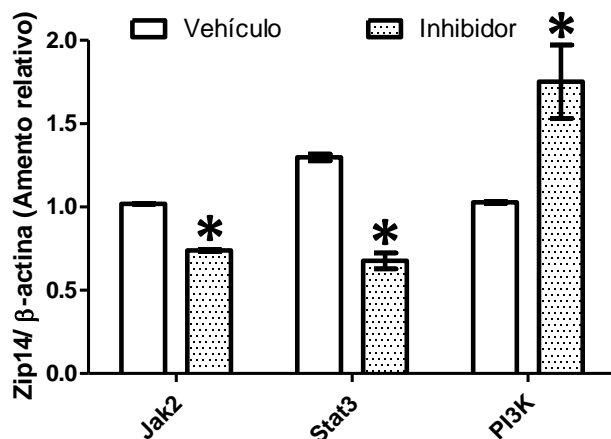


Figura 26. Efecto de los inhibidores de las vías de señalización de IL-6 sobre el nivel de ARNm de Zip14 durante el proceso quirúrgico. La cantidad relativa del ARNm fue determinado por RT-PCR en tiempo real. El ARNm de Zip14 fue normalizado con el ARNm de β -Actina. Cada barra representa la media \pm EEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo vehículo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

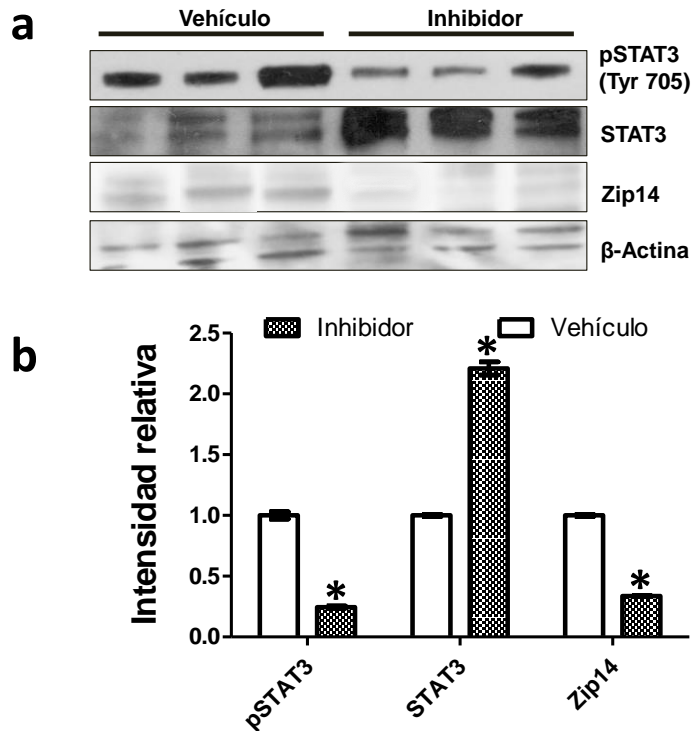


Figura 27. Efecto del inhibidor AG-490 sobre la expresión de Zip14 en hígado. *a*, La abundancia de las proteínas pSTAT3, STAT3 y Zip14 fueron examinadas por análisis de western blot. *b*, Representativos western blot de 3 ratas diferentes fueron utilizados para determinar la abundancia de las proteínas por análisis densitométrico de las bandas las cuales fueron normalizadas con la expresión de β-actina. Cada barra representa la media ± EEM de 3 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo vehículo, $p \leq 0.01$, prueba t de Student.

Los resultados obtenidos de la expresión de Zip14 mediante western blot también fueron corroborados por inmunohistoquímica. Para lo cual se utilizaron cortes (5 μm) de tejido hepático. En el panel de fotomicrografías se puede evidenciar un precipitado color marrón, el cual es tomado como marca positiva de la interacción antígeno anticuerpo específica para detectar al transportador; esta marca fue localizada a nivel de citoplasma de hepatocitos. En el panel de fotomicrografías del grupo del inhibidor de Jak2 se observó una disminución de la marca positiva al compararla con la de su grupo vehículo (Figura 28).

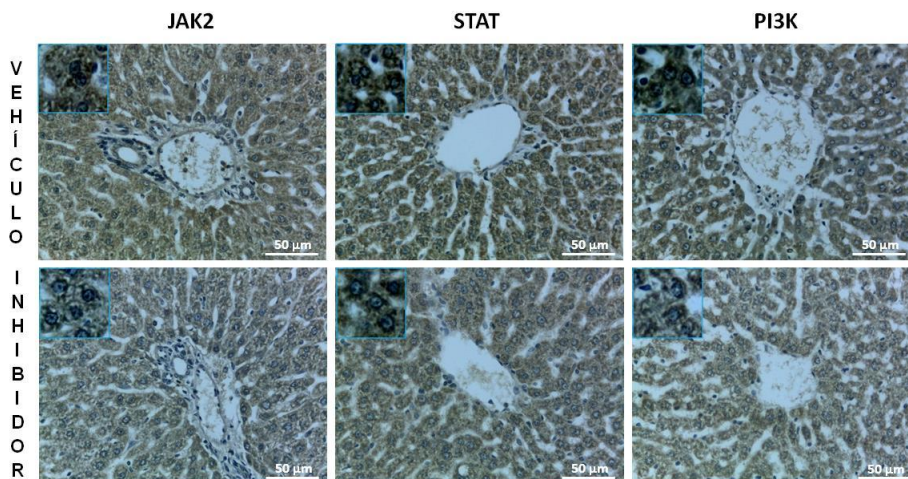


Figura 28. Detección inmunohistoquímica de la expresión de Zip14 al administrar los inhibidores de las vías de señalización de IL-6. Cortes de tejido hepático (5 μm) utilizados para la detección inmunorreactiva del importador. Magnificación: 40X.

Debido a que se observó una disminución de la expresión de Zip14 por la inhibición de Jak2 para poder determinar si la vía de señalización que regula a este transportador es mediante la vía JAK-STAT se utilizó S3I-201 un inhibidor de la fosforilación de STAT3, para comprobar que ocurrió la inhibición se evaluó por western blot a STAT3 fosforilado (pSTAT3-Tyr 705) encontrando que al administrar el inhibidor se redujo la fosforilación de esta proteína en promedio 24% al compararlo con su grupo vehículo (DMSO 10%) (Fig. 29), por el contrario cuando se evaluó a STAT3 total se observó un incremento de la proteína en promedio de 34% cuando se comparó con su grupo vehículo (Fig. 29). Con estos resultados se demostró la inhibición de la fosforilación de STAT3.

Posteriormente al evaluar el efecto de la inhibición sobre el nivel de ARNm de Zip14 se encontró una disminución de este en promedio del 40%, (Figura 26); por lo tanto al evaluar la expresión de la proteína del transportador por western blot se observó una disminución en la intensidad de la banda (Figura 29a) en el grupo al que se le administró el inhibidor, con el análisis densitométrico se corroboró que la disminución fue del 40% de la síntesis comparado con su grupo vehículo (Figura 29b)

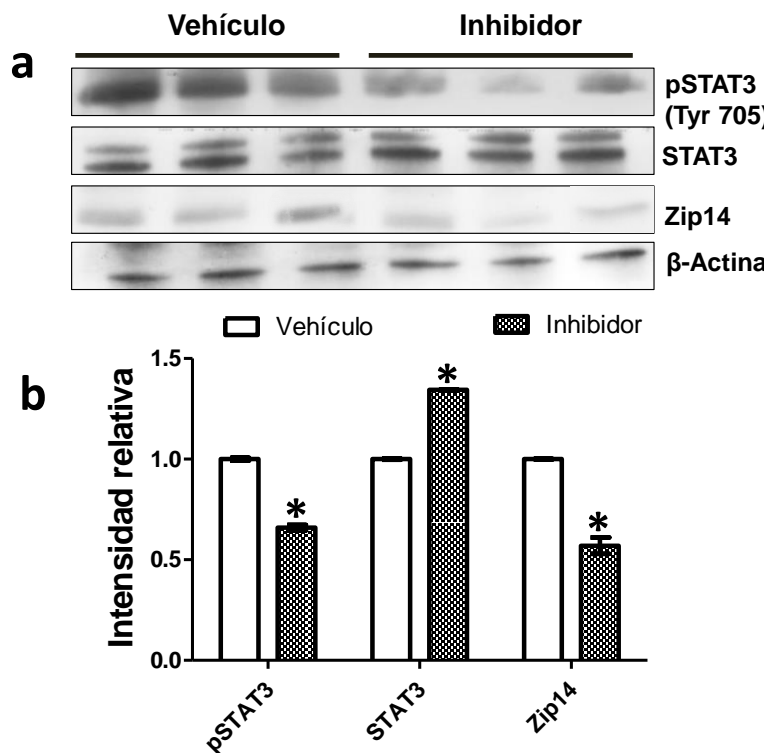


Figura 29. Efecto del inhibidor S3I-201 sobre la expresión de Zip14 en hígado. *a*, La abundancia de las proteínas pSTAT3, STAT3 y Zip14 fueron examinadas por análisis de western blot. *b*, Representativos western blot de 3 ratas diferentes fueron utilizados para determinar la abundancia de las proteínas por análisis densitométrico de las bandas las cuales fueron normalizadas con la expresión de β-actina. Cada barra representa la media ± EEM de 3 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo vehículo, $p \leq 0.01$, prueba *t* de Student.

Al evaluar la proteína por análisis de inmunohistoquímica se observó una disminución del precipitado café que corresponde a la marca positiva para detección de Zip14 (Fig. 28). La transducción de señales de IL-6 también involucra la activación de la cascada de PI3K (phosphatidylinositide-3-kinase), por lo que se utilizó wortmanina para inhibir a PI3K. Debido a que PI3K da lugar a la fosforilación de Akt (pAkt), se evaluó mediante análisis de western blot esta proteína para demostrar que la inhibición se llevó a cabo. El análisis demostró una disminución de pAkt cuando se compara contra su grupo vehículo (DMSO 15 %), con estos resultados se puso de manifiesto la inhibición de PI3K (Fig. 30). Cuando se administró el inhibidor se registró un incremento del ARNm de Zip14, siendo este aumento de casi el doble comparado con su grupo vehículo (Figura 26). Por el contrario la expresión de la proteína disminuyó (Fig. 30)

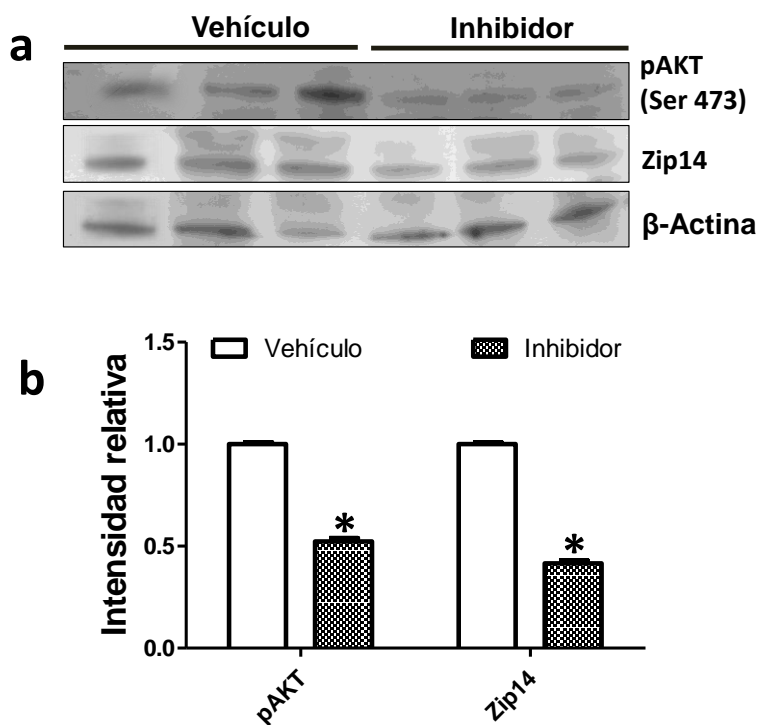


Figura 30. Efecto del inhibidor wortmanina sobre la expresión de Zip14 en hígado. *a*, La abundancia de las proteínas pAkt y Zip14 fueron examinadas por análisis de western blot. *b*, Representativos western blot de 3 ratas diferentes fueron utilizados para determinar la abundancia de las proteínas por análisis densitométrico de las bandas las cuales fueron normalizadas con la expresión de β-actina. Cada barra representa la media ± EEM de 3 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo vehículo, $p \leq 0.01$, prueba *t* de Student.

9.12 Detección de Zinc libre en tejido hepático

Con la finalidad de evaluar el efecto que podían ocasionar los inhibidores de las vías de señalización de IL-6 sobre los niveles de zinc débilmente unido a proteínas se realizaron cortes del tejido hepático (5 μm) que fueron teñidos con Zinquina. Las fotomicrografías mostradas en la Figura 31 muestran una disminución en el canal de emisión a 490 nm, cuando fue administrado el inhibidor específico para Stat3 (S3I-201) comparado con su respectivo grupo vehículo (DMSO 10%); por otro lado cuando se utilizó el inhibidor para Jak2 (AG490) y PI3K (wortmanina) no se observaron cambios en la fluorescencia al ser comparados con su grupo vehículo (DMSO 10% y 15% respectivamente). El análisis densitométrico de las fotomicrografías (Fig. 32) muestra una disminución en promedio del 21% del nivel de Zn^{2+} débilmente unido a proteínas al inhibir a Stat3.

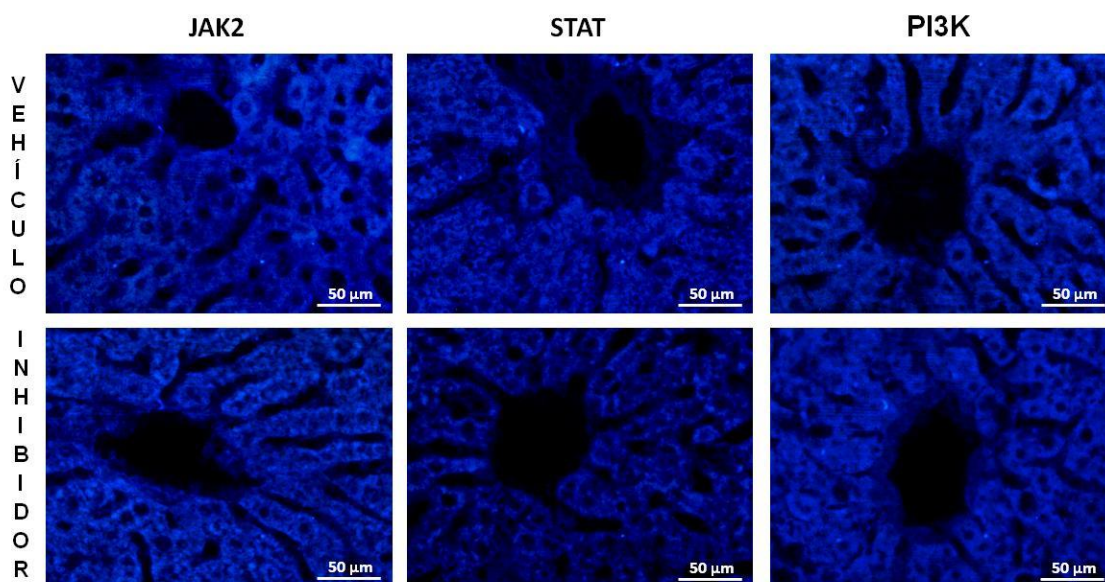


Figura 31. Efecto de los inhibidores de las vías de señalización de IL-6 sobre el Zn^{2+} libre en tejido hepático. Fotomicrografías de tejido hepático (5 μm) teñido con Zinquina. Aumento 40X.

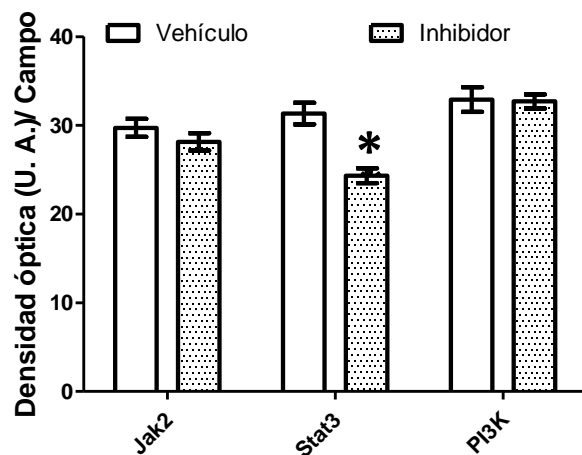


Figura 32. Efecto de los inhibidores de las vías de señalización de IL-6 sobre el Zn^{2+} libre en hígado durante el proceso inflamatorio. Análisis densitométrico por campo de la tinción de zinquina. Las barras representan la media \pm EEM de 34 campos diferentes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo vehículo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

9.13 Localización de zinc total

Para definir el efecto de los inhibidores sobre la distribución de zinc a nivel intracelular durante el proceso inflamatorio, se realizaron cortes del tejido hepático ($5\mu m$), los cuales fueron teñidos con ditizona. Las fotomicrografías (Fig. 33) y el análisis densitométrico (Fig. 34) en los grupos con los inhibidores de la vías de señalización de IL-6 evidencian que hubo una disminución del Zn^{2+} compartimentalizado cuando se administró el inhibidor específico para Jak2 y Stat3 en promedio estas disminuciones fueron del 13 % y 9 % respectivamente. Para el caso del inhibidor de PI3K (Fig. 34) no se observaron cambios.

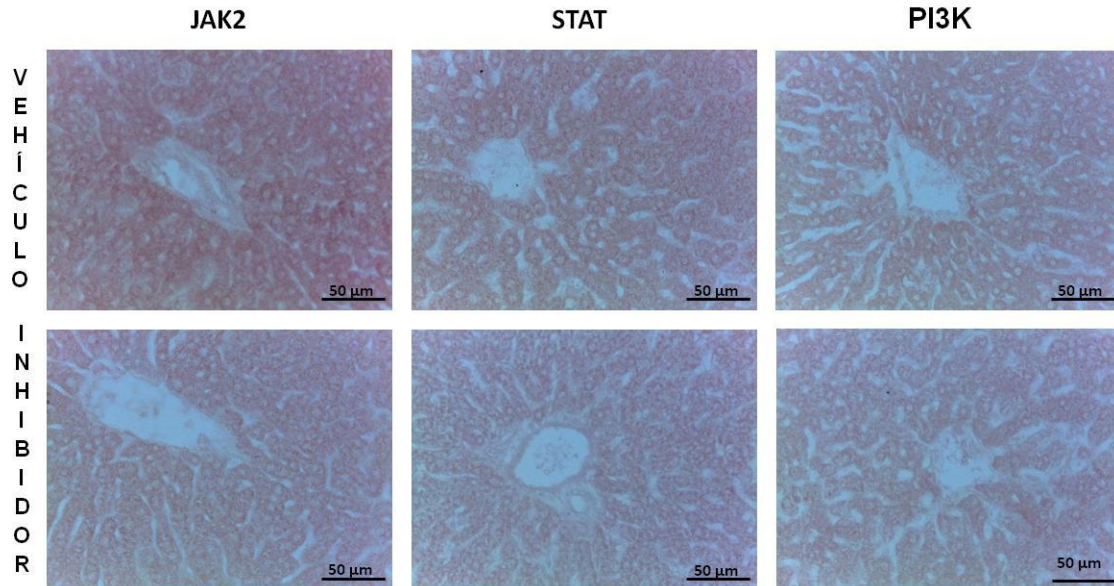


Figura 33. Efecto de los inhibidores de las vías de señalización de IL-6 sobre el Zn^{2+} compartimentalizado en tejido hepático. Fotomicrografías de tejido hepático (5 μm) teñido con Ditzona. Aumento 40X.

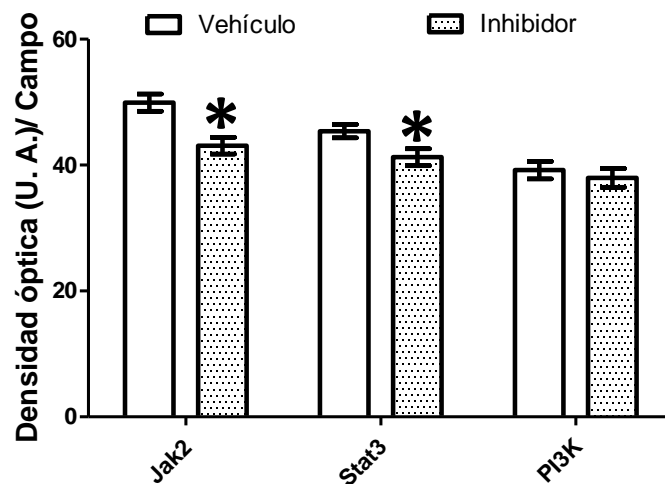


Figura 34. Efecto de los inhibidores de las vías de señalización de IL-6 sobre el Zn^{2+} compartimentalizado en hígado durante el proceso inflamatorio. Resultados del análisis densitométrico por campo de las microfotografías. Las barras representan la media \pm EEM de 32 campos diferentes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

9.14 Efecto de la inhibición de las vías de señalización de IL-1 β sobre la expresión de Zip14

Los inhibidores utilizados para las vías de IL-1 fueron PDTC un inhibidor específico de NF κ B, SB239063 y SP600125 estos dos últimos utilizados para inhibir a MAPp38 y JNK respectivamente. Para demostrar la inhibición se evaluó la abundancia de NF κ B mediante análisis de Western blot con el cuál se pudo evidenciar que hubo una disminución de la marca comparada con respecto a su grupo vehículo (Fig. 35). Al administrar el inhibidor se detectó un incremento del nivel de ARNm de Zip14 de casi el doble (Fig.36) al compararlo con su grupo vehículo (solución salina isotónica), lo mismo ocurrió con la expresión (Fig. 36a) de la proteína la cuál aumento 1.5 veces más comparado con su grupo vehículo (Fig. 36b), estos resultados fueron corroborados con la inmunohistoquímica donde se observó una mayor marca positiva para Zip14 en el grupo al que se le administró el inhibidor (Fig. 37).

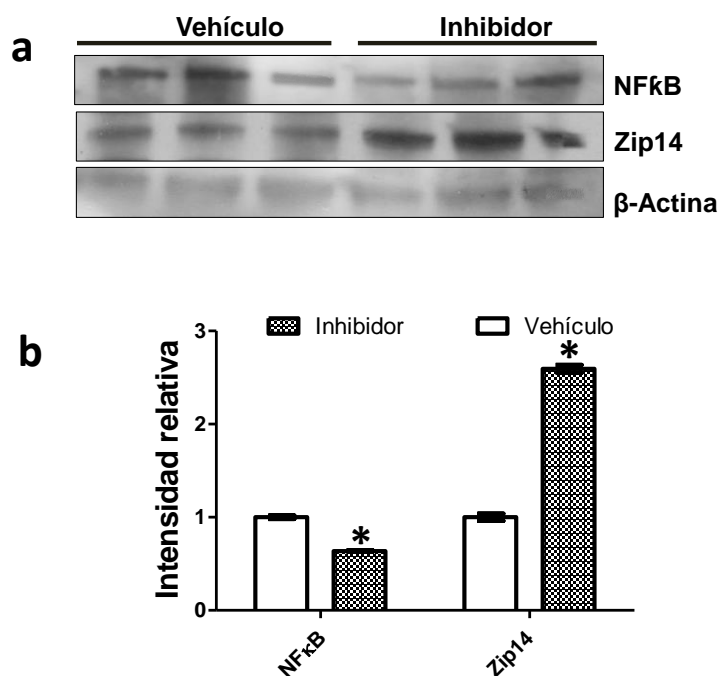


Figura 35. Efecto del inhibidor PDTC sobre la expresión de Zip14 en hígado. a, La abundancia de las proteínas NFκB y Zip14 fueron examinadas por análisis de western blot. b, Representativos western blot de 3 ratas diferentes fueron utilizados para determinar la abundancia de las proteínas por análisis densitométrico de las bandas las cuales fueron normalizadas con la expresión de β-actina. Cada barra representa la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. El asterisco () indica diferencia significativa con respecto al grupo vehículo, $p \leq 0.01$, prueba t de Student.*

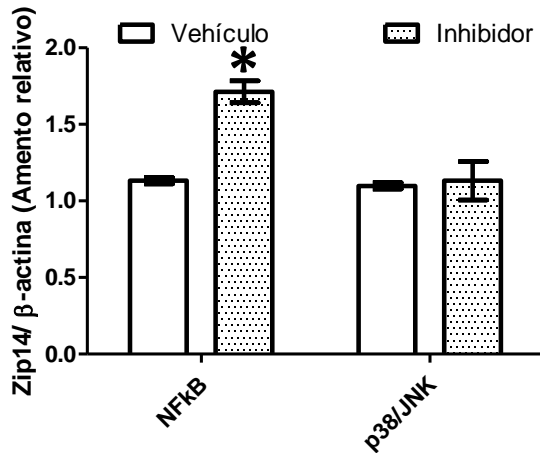


Figura 36. Efecto de los inhibidores de las vías de señalización de IL-1 sobre el nivel de ARNm de Zip14 durante el proceso quirúrgico. La cantidad relativa del ARNm fue determinado por RT-PCR en tiempo real. El ARNm de Zip14 fue normalizado con el ARNm de β -Actina. Cada barra representa la media \pm EEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

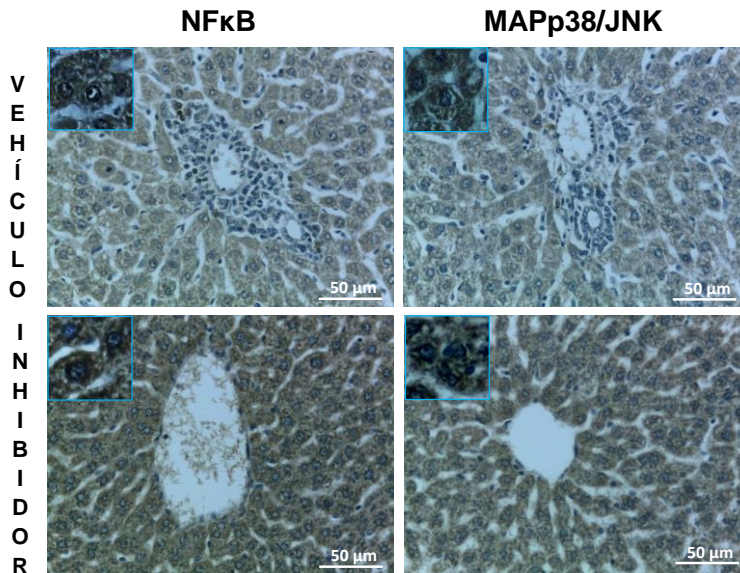


Figura 37. Detección inmunohistoquímica de la expresión de Zip14 al administrar los inhibidores de las vías de señalización de IL-1. Cortes de tejido hepático (5 μ m) utilizados para la detección inmunorreactiva del importador de Zinc Zip14 Aumento 40X.

Cuando se administraron los inhibidores de la fosforilación de MAPp38 y JNK se observó solo la disminución de pMAPp38 (Fig. 38). Al evaluar el nivel de ARNm de Zip14 no se encontraron cambios entre el grupo vehículo (goma de tragacanto 0.5% y aceite de olivo) e inhibidor (Fig. 36). Sin embargo al analizar la expresión de la proteína mediante inmunohistoquímica (Fig. 37) y western blot (Fig. 38) se observó un incremento en el nivel de la proteína.

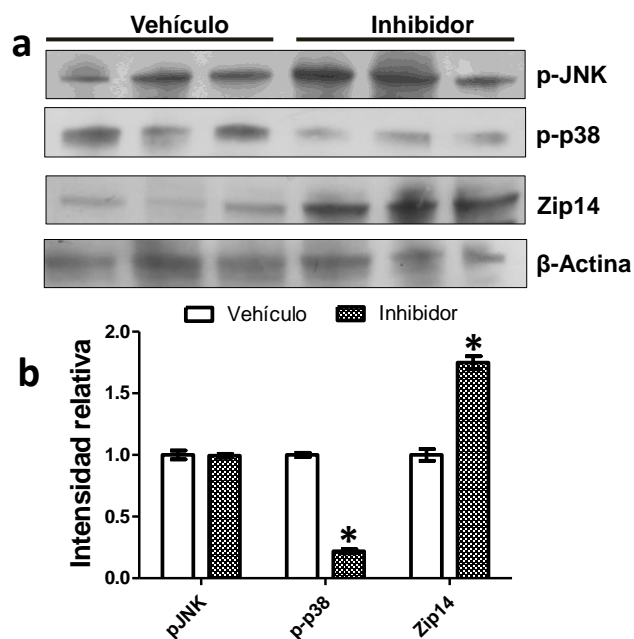


Figura 38. Efecto de los inhibidores SB239063 y SP600125 sobre la expresión de Zip14 en hígado. *a*, La abundancia de las proteínas pJNK, pMAP38 y Zip14 fueron examinadas por análisis de western blot. *b*, Representativos western blot de 3 ratas diferentes fueron utilizados para determinar la abundancia de las proteínas por análisis densitométrico de las bandas las cuales fueron normalizadas con la expresión de β-actina. Cada barra representa la media ± EEM de 3 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo vehículo, $p \leq 0.01$, prueba t de Student.

9.15 Efecto de los inhibidores de las vías de señalización de IL-1β sobre el zinc libre en tejido hepático

Los inhibidores de las vías de señalización IL-1β causaron un ligero incremento del zinc libre (Figura 39) cuando se administraron juntos el inhibidor de MAPp38 (SB239063) y JNK (SP600125) comparándolo con su grupo vehículo (goma de tragacanto 0.5% y aceite de olivo). Cuando se realizó el análisis densitométrico de estas fotomicrografías se detectó un incremento en promedio del 9%; sin embargo cuando se utilizó el inhibidor PDTC específico para NFκB no se observaron cambios significativos (Figura 40).

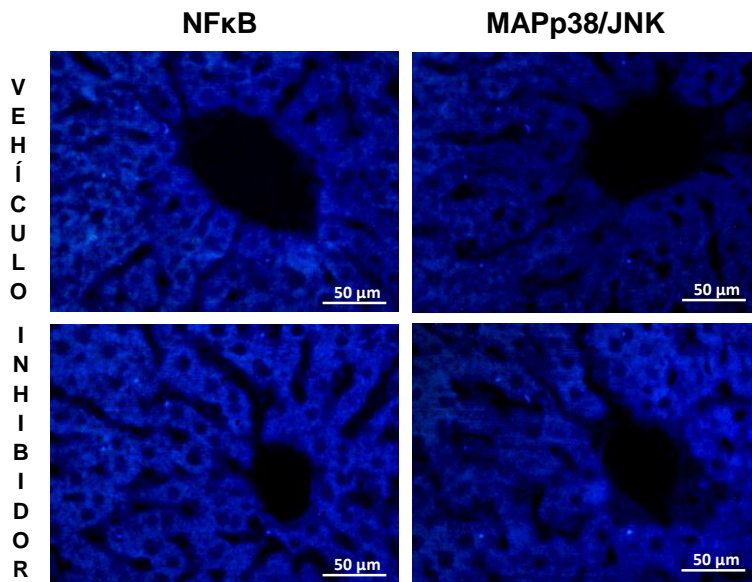


Figura 39. Efecto de los inhibidores de las vías de señalización de IL-1 sobre el Zn^{2+} libre en tejido hepático. Fotomicrografías de tejido hepático (5 μ m) teñido con Zinquina. Aumento 40X.

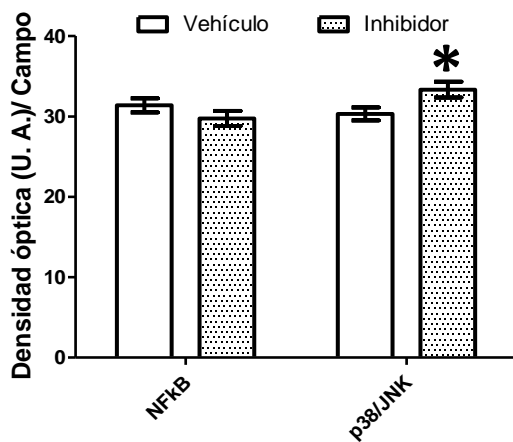


Figura 40. Efecto de los inhibidores de las vías de señalización de IL-1 β sobre el Zn^{2+} libre en hígado durante el proceso inflamatorio. Análisis densitométrico por campo de la tinción de zinquina. Las barras representan la media \pm EEM de 34 campos diferentes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo vehículo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

9.16 Efecto de la inhibición de la señalización de IL-1 β sobre el zinc compartimentalizado

Para definir el efecto de los inhibidores sobre la distribución de zinc a nivel intracelular durante el proceso inflamatorio, se realizaron cortes del tejido hepático (5 μ m),

los cuales fueron teñidos con ditizona. Las fotomicrografías (Figura 41) y el análisis densitométrico (Fig. 42) del grupo al que se le administró el inhibidor de MAPp38 junto con el inhibidor de JNK se evidenciaron un incremento de este zinc, que en promedio fue del 17.5 % (Fig. 25). Con el inhibidor específico para NFκB no se observaron cambios (Fig. 25).

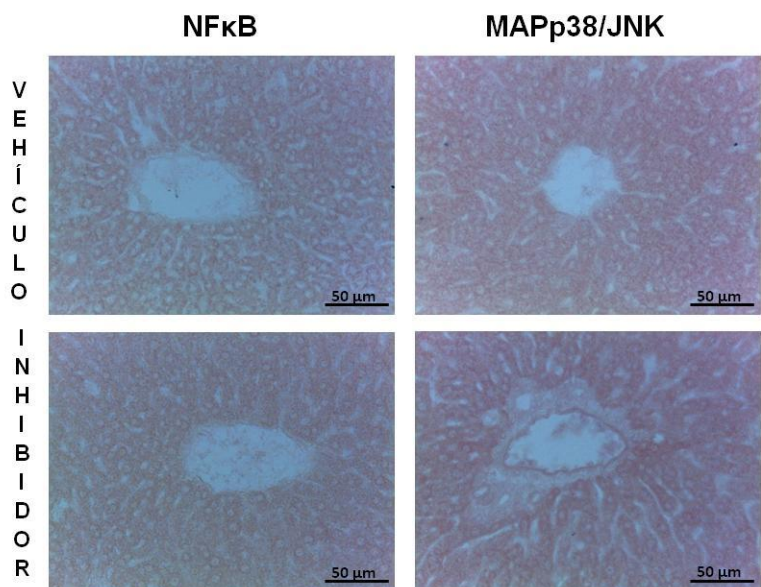


Figura 41. Efecto de los inhibidores de las vías de señalización de IL-1β sobre el Zn²⁺ compartimentalizado en tejido hepático. Fotomicrografías de tejido hepático (5 μm) teñido con Ditizona. Aumento 40X.

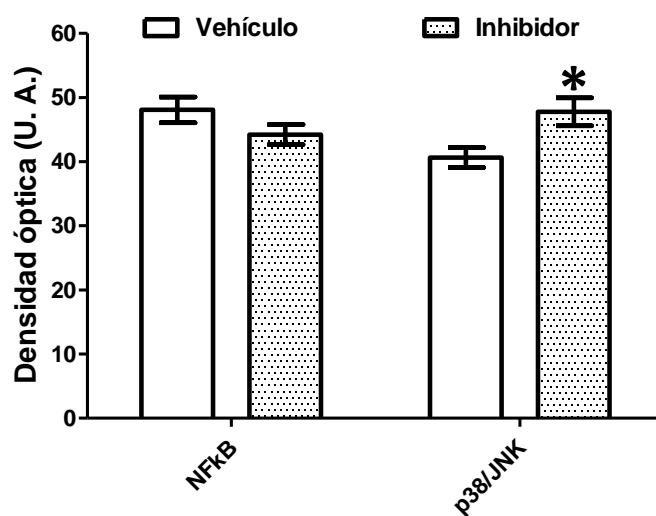


Figura 42. Efecto de los inhibidores de las vías de señalización de IL1-β sobre el Zn²⁺ compartimentalizado en hígado durante el proceso inflamatorio. Resultados del análisis densitométrico por campo de las microfotografías. Las barras representan la media ± EEM de 32 campos diferentes. El asterisco () indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.*

9.17 Efecto del proceso inflamatorio sobre la regulación de ZnT1

9.18 Cuantificación de zinc total en hígado

El proceso quirúrgico inducido en las ratas generó un incremento en la concentración de zinc hepático desde las 20 h hasta las 36 h posteriores a la cirugía, estos incrementos oscilaron entre el 8% y 20%, en comparación con los respectivos grupos control para cada hora estudiada; sin embargo a las 48 horas post-cirugía la concentración de zinc retornó a su nivel basal (Figura 43). Estos resultados ponen de manifiesto la redistribución de zinc hepático durante el proceso quirúrgico el cual se mantiene hasta las 36 horas.

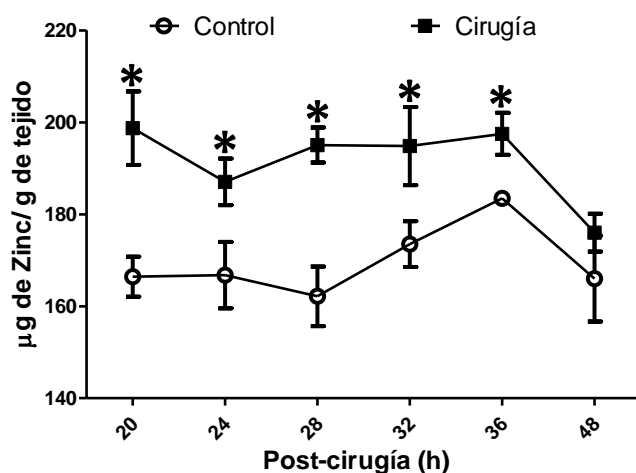


Figura 43. Concentración de zinc hepático. La concentración de zinc fue determinada por espectrometría de absorción atómica. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba *t* de Student.

9.19 Evaluación de MTF-1 en la fracción nuclear y citoplásmica durante el proceso inflamatorio

MTF-1 juega un papel central en la homeostasis del zinc, ya que llega a actuar como un sensor de este metal. Por lo tanto MTF-1 se localiza tanto en núcleo como en citoplasma. Y se ha descrito que regula positivamente la expresión de MT y ZnT1. El trauma quirúrgico generó un incremento de MTF-1 en la fracción citoplásmica a las 20 h post-cirugía al

compararlo con su respectivo grupo control, sin embargo en los demás tiempos evaluados no se observaron cambios (Fig. 44).

Al evaluar los niveles de este factor de transcripción en la fracción nuclear no se encontraron cambios significativos en los diferentes tiempos evaluados al compararlos con su respectivo control (Fig. 45)

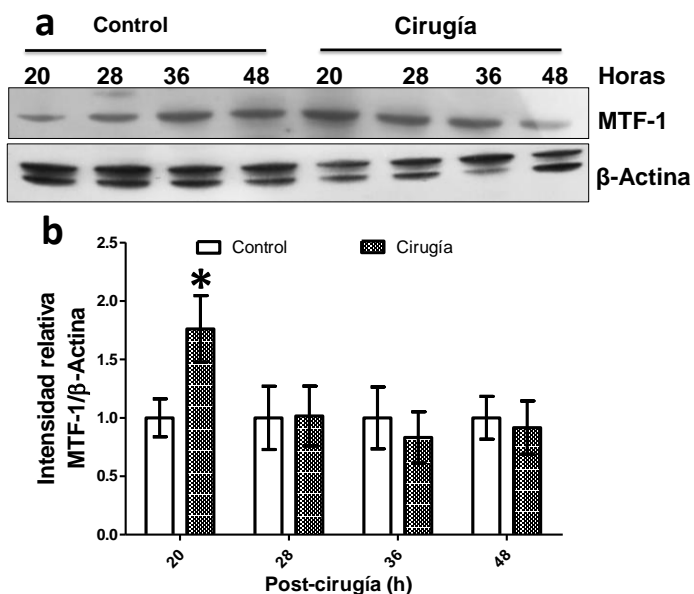


Figura 44. El trauma quirúrgico generó un incremento de MTF-1 en citoplasma. **a**, La abundancia de la proteína fue examinada por análisis de western blot. **b**, Representativos western blot de 3 ratas diferentes fueron utilizados para determinar la abundancia de las proteínas por análisis densitométrico de las bandas las cuales fueron normalizadas con la expresión de β -actina. Cada barra representa la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo vehículo, $p \leq 0.01$, prueba t de Student.

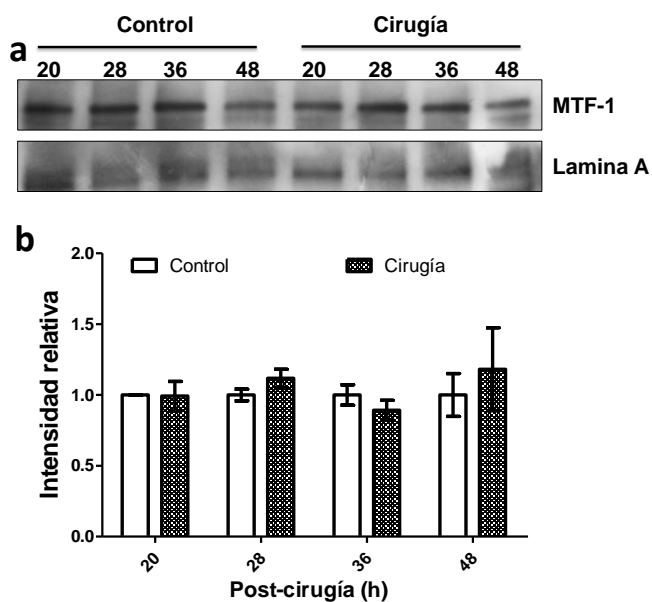


Figura 45. Los niveles de MTF-1 en núcleo no cambian durante el trauma quirúrgico. **a**, La abundancia de la proteína fue examinada por análisis de western blot. **b**, Representativos western blot de 3 ratas diferentes fueron utilizados para determinar la abundancia de las proteínas por análisis densitométrico de las bandas las cuales fueron normalizadas con la expresión de β -actina. Cada barra representa la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo vehículo, $p \leq 0.01$, prueba t de Student.

9.20 Cuantificación de Metalotioneina total en hígado

El proceso inflamatorio generado por el trauma quirúrgico produjo un aumento desde las 20 h hasta las 36 h en la concentración de metalotioneinas (MTs) en hígado, estos incrementos representan en promedio casi el doble de la concentración de MT al compararse con su respectivo grupo testigo, en casi todos los tiempos evaluados. El máximo nivel de MT fue observado a las 20 h posteriores al proceso quirúrgico, siendo 3 veces mayor al nivel de MT determinado en el grupo testigo (Figura 46).

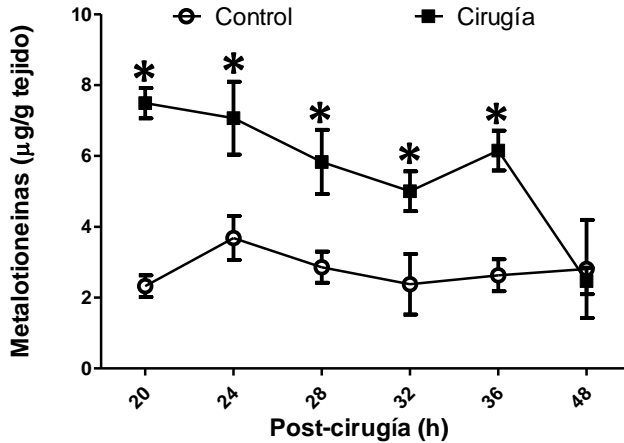


Figura 46. Efecto del trauma quirúrgico sobre la concentración de las metalotioneinas. La concentración de MTs totales fue determinado por el método de saturación con ^{109}Cd . Los puntos representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

9.21 Determinación del nivel de ARNm de ZnT1 mediante RT-qPCR

Para estudiar el sí el proceso quirúrgico tuvo efecto sobre el nivel del ARNm de ZnT1, se utilizó la técnica de RT-PCR en tiempo real en la figura 7 se puede evidenciar que existen cambios desde las 12 h hasta las 36 h post-cirugía. A las 12 h se observó una disminución del nivel de ARNm y de las 20 h a las 36 h después de realizar la cirugía se observaron incrementos significativos (Figura 47).

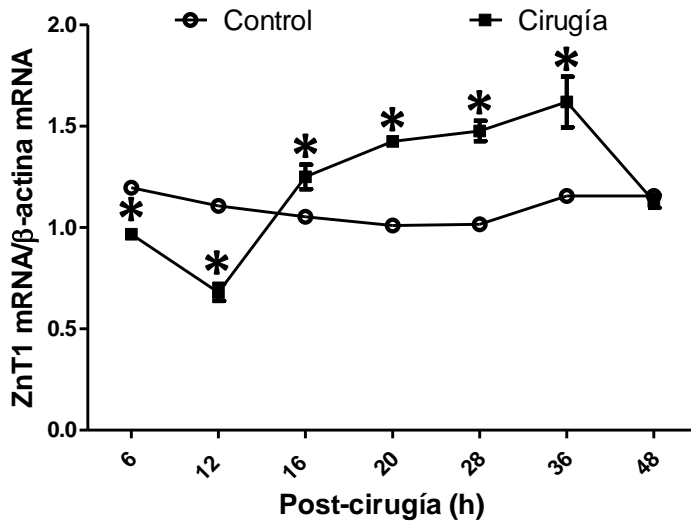


Figura 47. El nivel de ARNm de ZnT1 es afectado por el proceso quirúrgico. La cantidad relativa del ARNm fue determinado por RT-PCR en tiempo real. El ARNm de ZnT1 fue normalizado con el ARNm de β-Actina. Cada barra representa la media ± EEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. El asterisco () indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.*

9.22 Evaluación de la expresión de ZnT1 durante el trauma quirúrgico

Para investigar el efecto que desencadena el proceso inflamatorio sobre la expresión de ZnT1, se utilizaron cortes (4 μ m) de tejido hepático para realizar estudios de inmunohistoquímica para este transportador. En el panel de fotomicrografías se puede evidenciar un precipitado color marrón propiciado por la actividad de la peroxidasa al reaccionar con diaminobencidina, el cual es tomado como marca positiva de la interacción antígeno anticuerpo específica para detectar al exportador de zinc ZnT1; esta marca fue localizada a nivel de citoplasma de hepatocitos de los grupos control y cirugía (Fig. 48a)

La densidad óptica de las fotomicrografías fue dividida entre el número de células por campo, para obtener la inmunoreactividad de cada célula. con este análisis se encontraron incrementos en promedio del 40%, 73%, 111%, 184 % y 98% en los grupos de 20, 24, 28, y 32 respectivamente (Figura 48b)

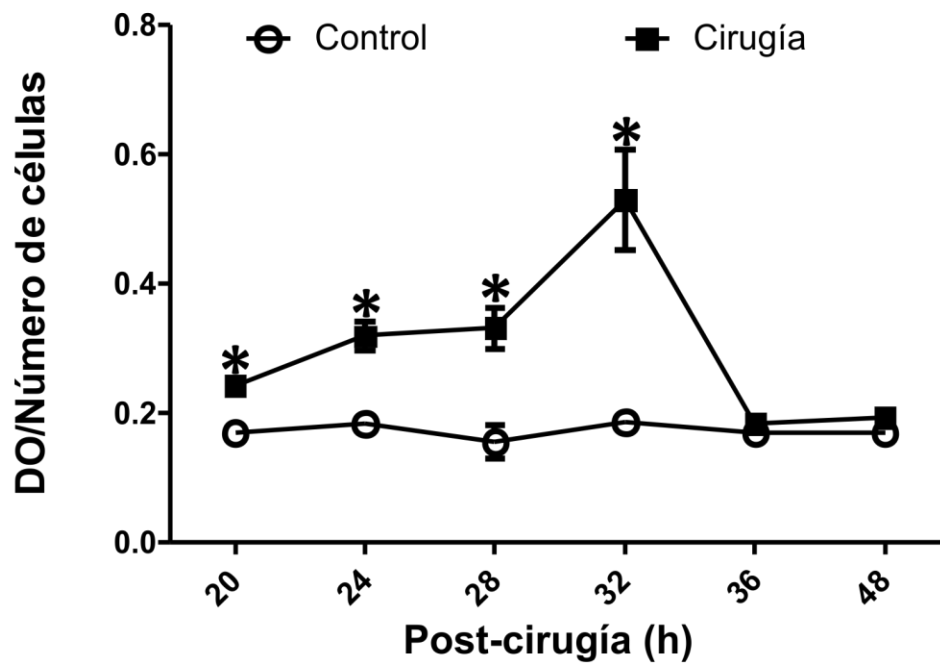
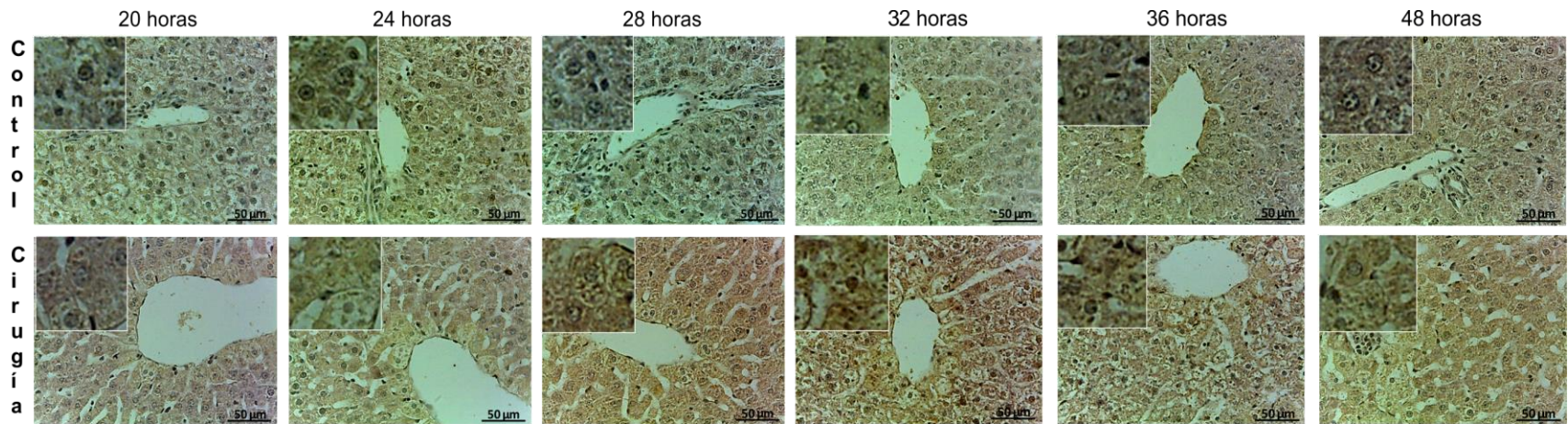


Figura 48. Detección de la expresión de ZnT1 durante el proceso inflamatorio. Análisis densitométrico de la inmunorreactividad de ZnT1 generada por célula. Cada barra representa la media \pm EEM de 9 campos diferentes. El asterisco () indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo, $p \leq 0.05$, prueba t de Student.*

9.23 El trauma quirúrgico afecta la expresión de ZnT1 durante el proceso inflamatorio

Uno de los transportadores regulados por MTF-1 es ZnT1. El trauma quirúrgico generó un incremento en la abundancia de ZnT1 desde las 20 hasta las 28 h post-cirugía al compararlo con su respectivo grupo control (Fig. 49a), retornando a sus niveles basales desde las 36 h post-cirugía. Estos datos fueron corroborados cuando se realizó el análisis densitométrico (Fig. 49b).

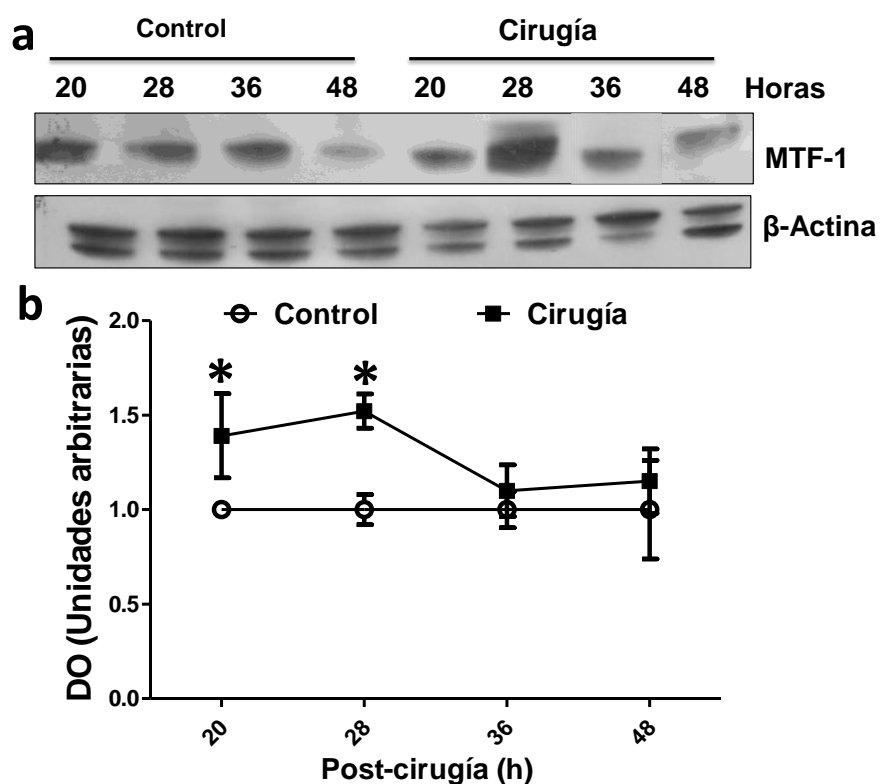


Figura 49. El trauma quirúrgico generó un incremento en la expresión de *MTF-1* en citoplasma. **a**, La abundancia de la proteína fue examinada por análisis de western blot. **b**, Representativos western blot de 3 ratas diferentes fueron utilizados para determinar la abundancia de las proteínas por análisis densitométrico de las bandas las cuales fueron normalizadas con la expresión de β -actina. Cada barra representa la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo vehículo, $p \leq 0.01$, prueba *t* de Student.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La respuesta de fase aguda generada por estrés, infección o trauma, se caracteriza por cambios en la concentración de proteínas plasmáticas, así como una disminución de la concentración de hierro y zinc plasmáticos como parte de la respuesta inflamatoria. La propuesta de esta respuesta es para ayudar a inhibir el crecimiento de patógenos, modular el grado de inflamación y activar la coagulación [Myers y cols., 1984; Okada y cols., 1990].

La homeostasis del zinc cambia rápido y dinámicamente en humanos en respuesta a la inflamación como una extensión de la respuesta de fase aguda. La principal y más aparente alteración observada es el rápido decline del zinc en plasma comúnmente referido como hipozinquemia [Gaetke y cols., 1997].

Previamente, hemos descrito resultados similares, pero utilizando una cirugía abdominal en ratas como modelo de inflamación experimental [Brambila y cols., 1999]. Estos resultados se han confirmado en este trabajo, en el cual se mostró que la cirugía provocó una hipozinquemia transitoria, los resultados concuerdan también con modelos de inflamación en roedores generados con LPS, tuerpentina entre otros estimulantes inflamatorios [Cousins y Leinart, 1988; Liuzzi y cols., 2005; Aydemir y cols. 2012].

Aunque a la fecha se desconoce con certeza cuál es el papel que juega la hipozinquemia en los procesos inflamatorios, previamente se ha demostrado la importancia del zinc en la reparación de heridas, sobre todo en pacientes con hipozinquemia que son suplementados con este metal [Okada y cols., 1990]. También a la hipozinquemia se le ha relacionado con la protección del hospedero contra el desarrollo de infecciones, ya que el zinc es un factor importante para el crecimiento bacteriano, por lo que al disminuir durante la respuesta de fase aguda, la menor biodisponibilidad de este bioelemento para los microorganismos reduce el desarrollo de la infección [Schapiro y cols., 2003; Kim y cols., 2004].

La disminución de los niveles de zinc no pueden ser explicados por los cambios en circulación de albúmina, unión a proteínas de plasma o excreción urinaria [Gaetken y cols., 1997]. Por lo que ahora se aclarado que en la respuesta de fase aguda resulta en una redistribución de zinc hacía de órganos vitales, tales como el pulmón, células inmunes e hígado [Cousins y Leinart, 1988; Brambila y cols., 1999; Liuzzi y cols., 2005; Aydemir y cols., 2012; Liu y cols., 2013]

El trauma quirúrgico, así como otros modelos de inflamación en roedores se han asociado con una redistribución de zinc desde circulación hacia hígado [Cousins y Leinart, 1988; Liuzzi y cols., 2005; Brambila y cols., 1999]. En este trabajo se empleó un proceso quirúrgico abdominal como modelo de inflamación, en el cual se puso de manifiesto que el zinc plasmático es redistribuido al hígado en un intervalo de las 20 a las 24 horas del proceso quirúrgico. La redistribución dentro del hígado facilita la reprogramación de la síntesis hepática de proteínas de fase aguda, regulación de la gluconeogénesis, control de especies reactivas (óxido nítrico o radicales hidroxilo) [Liuzzi y cols., 2005].

El hígado es un órgano clave en la homeostasis del zinc, además de controlar su metabolismo, tiene un papel importante en la excreción de zinc endógeno, la cual ocurre principalmente por la vía gastrointestinal [Lansdown y cols., 2007].

A nivel intracelular en condiciones normales, del 30 al 40% del zinc se encuentra unido a proteínas en el núcleo, el 50% se localiza en el citoplasma y el restante está presente en membranas plasmáticas [Lansdown y cols., 2007]. Usando tinciones de zinquina y ditizona nosotros encontramos cambios en la movilización de zinc intracelular producidos por la cirugía. El nivel de zinc débilmente unido a proteínas y total en hígado se encontró disminuido durante las primeras 6 h post-cirugía, estos resultados coinciden con reportes que han evidenciado que la disminución de la concentración de zinc intracelular durante la inflamación es un paso importante para la activación de vías de señalización como la de NFκB y JAK-STAT importantes para la regulación de la respuesta de fase aguda [Liu y cols., 2013]. Posteriormente consistente con la hipozinquemia la concentración de zinc lábil incrementa rápidamente en respuesta a los mediadores inflamatorios, en hepatocitos esta acumulación es directamente dependiente de IL-6 [Liuzzi y cols., 2005] hecho que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo en donde se observó un incremento de zinc lábil a las 9 horas, lo mismo ocurrió con el zinc total pero en este caso permaneció incrementado hasta las 20 horas. En este contexto las fluctuaciones de zinc o translocación intracelular, movilización de zinc lábil son vistas como una “señal de Zn”. Se ha demostrado que este metal, regula la función de muchas proteínas incluyendo cinasas y fosfatasas, muchas de las cuales juegan un papel decisivo en la regulación de la respuesta inflamatoria [Haase y Maret, 2003; Nishida y cols., 2009; Liu y cols., 2013]

Dentro de los 4 pools de zinc celular, el más destacado durante los procesos inflamatorios es el de MT. En los hepatocitos humano las MT enlazan del 5 al 10% del zinc que se localiza en citoplasma [Haq y cols., 2003]. Durante la respuesta de fase aguda en los procesos inflamatorios, las MT son sintetizadas *de novo* en hígado, su expresión es estimulada por citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α , así como por glucocorticoides [Davis y Cousins, 2000; Haq y cols., 2003; John y cols., 2010]. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la cirugía abdominal practicada dio lugar al incremento en las concentraciones de MTs totales, registrando dos máximos, a las 9 y 24 horas. El incremento observado a las 24 h concuerda con los resultados obtenidos para la concentración de zinc hepático, que aumenta a las 24 h del proceso quirúrgico, lo cual sugiere un efecto inductor del metal sobre la síntesis de MTs, a diferencia de las primeras horas después de la cirugía, en donde la inducción de la síntesis de MTs es mediada seguramente por citocinas y hormonas [Schroeder y cols., 1990; Scott, 2007; Hernández Bautista, 2007]. Los resultados obtenidos también mostraron que entre las 12 y 20 h post-cirugía, los niveles de MT disminuyeron sin llegar a los niveles basales. Este comportamiento puede ser debido a que los niveles de MTs en estos procesos inflamatorios aumentan en circulación después de las 12 h y registran un aumento creciente hasta las 48 h [Akintola y cols., 1997]. Las MTs son proteínas que tienen la capacidad de enlazar metales pesados y promover la desintoxicación de estos, protegiendo así contra el estrés oxidativo y supresión de la muerte celular por la vía apoptótica. La función que MTs pueden tener durante este proceso en una primera etapa es la de proteger a las células del estrés nitrosativo que es generado por las citocinas pro-inflamatorias al estimular a la iNOS dando lugar al incremento de la concentración de NO y por lo tanto lleva a la nitrosación de las MTs liberando así al zinc que puede ser utilizado como un cofactor enzimático o estructural de proteínas zinc [Cousins y cols., 2006; Colvin y cols., 2010; Namdarghanbari y cols., 2011; Maret, 2011].

Debido a que el zinc es un ión pequeño, hidrofílico y posee carga positiva, no puede ser transportado a través de las membranas plasmáticas, o ingresar a un organelo intracelular por difusión pasiva, por lo que los organismos han desarrollado vías específicas de regulación homeostática para la disponibilidad de este micronutriente en sitios específicos de la célula a través de un arreglo de transportadores.

IL-6 es la principal estimulante de hepatocitos que regula los genes de respuesta de fase aguda [Castell y cols., 1988; Siewert y cols., 2004; Fonseca y cols., 2009] y se ha sugerido que es un importante modulador de transportadores de solutos hepáticos, controlando el tráfico de metabolitos y nutrientes durante la respuesta de fase aguda [Liuzzi y cols. 2005; Siewert y cols., 2004]. Se ha evidenciado que el nivel de RNAm de Zip14 llega a ser de 2 a 3 veces más alto después de la administración de LPS o turpentina, este transportador se localiza en la membrana plasmática de hepatocitos, por lo que la redistribución de zinc plasmático que se observa durante el proceso inflamatorio esta mediada por Zip14. [Liuzzi y cols., 2005; Aydemir y col., 2012].

En el presente estudio se puso de manifiesto el incremento del nivel RNAm de Zip14 que fue hasta 2 veces mayor que el grupo control durante las primeras 24 h de la respuesta de fase aguda generada por el trauma quirúrgico, así como también el aumento en la abundancia proteica del transportador; de acuerdo a estos resultados, se puede plantear que Zip14 es el transportador responsable de redistribuir el zinc desde plasma hacia tejido hepático, contribuyendo así a la hipozinquemia generada por el trauma quirúrgico.

Los resultados obtenidos en este trabajo coincide con otros modelos de inflamación en donde también han reportado una regulación positiva del transportador y con lo cual se ha propuesto que Zip14 es un gen de fase aguda ya que su regulación depende de IL-6 [Liuzzi y cols., 2005; Lang y cols., 2007; Kobayashi y cols., 2007; Aydemir y col., 2012; Sayadi y cols., 2012; Min y cols., 2013]. Esto quedó demostrado por Liuzzi y cols. [2005] que al administrar turpentina a ratones IL-6^{-/-} no producen hipozinquemia, por otro lado recientemente se ha evidenciado que ratones Zip14^{-/-} poseen niveles bajos de IL-6 al ser administrados con LPS [Sayadi y cols. 2012] dejando en claro la dependencia que tiene el transportador con esta citocina.

Para explorar si IL-6 es el regulador positivo de Zip14 en la inflamación generada por el proceso quirúrgico, nosotros utilizamos Tyrphostin AG490 un inhibidor de JAK2, ya que el primer paso enzimático en la transducción de señales de IL-6 es la activación de Janus quinasas por autofosforilación (JAK) [Schaper y cols., 2015], esta activación conduce a la fosforilación del motivo de tirosinas dentro de la región citoplásmica del receptor gp130 activando así diferentes vías de señalización [Eulenfeld y cols., 2012].

La inhibición de Jak fue asociada con la disminución tanto del nivel de RNAm de Zip14 al igual que la expresión proteica. Además Tyrphostin AG490 provocó una disminución del zinc compartimentalizado. Estos resultados sugieren que IL-6 es un regulador positivo para Zip14 durante la cirugía.

Una probable vía de señalización para esta respuesta mediada por IL-6 es a través de la regulación de factores de transcripción de la familia de transductores de la señal y activadores de la transcripción (STAT) [Cousins y cols., 2006] que son las proteínas más destacadas reclutadas por gp130. En el núcleo, los dímeros de STAT3 fosforilados se unen a elementos potenciadores de genes regulados por IL-6 [Schaper y cols., 2015], como lo son los genes de fase aguda tipo II [Moshage, 1997]. La inhibición de pSTAT3 con S3I-201 provocó una disminución del nivel de mRNA Zip14, lo mismo indujo con la expresión proteica del transportador. Además de que también afectó el nivel de zinc libre y compartimentalizado los cuales se encontraron disminuidos. Con todos estos resultados se demuestra que la vía que regula la expresión de Zip14 durante la inflamación generada por el trauma quirúrgico es mediante JAK2-STAT3.

Además de la activación de factores de transcripción STAT, la estimulación de IL-6 conduce a la iniciación de la cascada de proteína quinasa activadas por mitógenos (MAPK) y la cascada de fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) [Eulenfeld y cols., 2012]. La vía PI3K/Akt también incrementa la síntesis de proteínas y el crecimiento celular vía la diana de rampamicina en células de mamífero (mTOR), una quinasa Ser/Thr que regula el crecimiento celular y el metabolismo. Para determinar la relación de la vía PI3K sobre la expresión de Zip14 se administró wortmanina a las ratas, el cual es un inhibidor irreversible de PI3K, en el presente trabajo se mostró un incremento tanto del nivel de mRNA del transportador como de la proteína. La vía PI3K/Akt también contribuye a la activación de NF- κ B la cual es importante para la regulación de la síntesis de proteínas de fase aguda, además de conferir propiedades anti-apoptóticas [Ataie-Kachoeie y col., 2013]. El incremento en la expresión de Zip14 al inhibir PI3K puede asociarse con las evidencias de que NF κ B inhibe la síntesis de Zip14 en macrófagos y debido a que Akt contribuye a potenciar la está vía, la verse inhibida se sale de control la regulación de Zip14. Sin embargo los niveles de zinc libre y total no se observaron afectados aun con el incremento de la proteína, por lo que puede ser que no sea funcional.

IL-1 β puede estimular la producción de NO y elevar la expresión de Zip14 a través de la vía de señalización que conduce a la activación de AP1, que a su vez conduce a la acumulación de zinc hepático durante la inflamación provocada por LPS, por lo que la estimulación de NO generada por IL-1 β es otro mecanismo de regulación positiva de Zip14 [Lichten y cols., 2009].

Después de una cirugía IL-1 es una de las principales citocinas liberadas [Desborough y cols., 2000] hipotetizando que esta citocina podría ser un regulador positivo para la expresión de Zip14 durante la inflamación generada en este proceso, se analizó la inhibición de diferentes vías de señalización activadas por IL-1 β . Tanto JNK como MAPp38 activan a c-Jun la cual al formar homodímeros o heterodímeros con proteínas Fos conforman la familia de AP1 [Chinenov y cols., 2001]. En este trabajo no se observó afectado el nivel de mRNA al inhibir a JNK y MAPp38, sin embargo se registró un aumento de la proteína, esto puede ser explicado de la misma manera que la inhibición de PI3K ya que MAPp38 igualmente potencia la acción de NF κ B.

La señalización intracelular inducida por IL-1 también involucra la activación del factor de transcripción NF- κ B que en conjunto con AP1 regulan la expresión de proteínas de fase aguda de tipo 1 [Ramadori y cols., 2001]. La inhibición de NF- κ B con el inhibidor PDTC, provocó un incremento del nivel de mRNA de Zip14 y de la expresión de la proteína, estos resultados coinciden con los reportados por Sayadi y cols., que tras administrar un inhibidor de NF- κ B a macrófagos estimulados con LPS también existe un aumento en la transcripción de Zip14 [Sayadi y cols., 2012]. Esta idea puede ser consistente con la propuesta de una estrecha relación regulatoria entre las señales pro-inflamatorias de NF- κ B y las cantidades de zinc intracelular [Sayadi y cols. 2012]. De hecho, un reporte mostró que la baja disponibilidad de zinc puede potenciar la señal pro-inflamatoria de NF- κ B mientras que altos niveles de zinc intracelular reducen esta señal [Bao y cols., 2010].

Considerando que la valoración del efecto de la inhibición de NF- κ B sobre la expresión de Zip14 en este trabajo se realizó 9 h después de haber realizado la cirugía, tiempo en el cual existe un incremento del zinc libre y que no se observaron modificaciones de este metal con la inhibición se sugiere que los niveles altos de zinc pueden estar potenciando la reducción de la señal de NF- κ B, ya que se ha comprobado que el zinc inhibe la actividad de IKK [Jeo y cols., 2000]. Por lo que al verse afectada esta vía se abre

paso para la activación de otros reguladores positivos solo del nivel de mRNA de Zip14 y su traducción.

El modelo de inflamación generó aumento en la cantidad de zinc hepático en tejido total desde las 20 h hasta las 36 h; estos resultados concuerdan con los reportados por Cousins y Leinart en 1988, en donde al administrar IL-1 α y ^{65}Zn a ratas se induce una hipozinqueemia y el incremento de ^{65}Zn hepático desde las 6 h hasta las 36 h.

Cuando los niveles de zinc citoplásmico incrementan, MTF-1 juega un papel central en la homeostasis del metal ya que incrementa la transcripción de genes anfitriones involucrados en reducir la toxicidad de las concentraciones altas del zinc, tales como MTs y ZnT1. Por lo tanto MTF-1 se localiza en citoplasma y en núcleo. Se ha referido que existe una acumulación de este factor de transcripción en núcleo bajo concentraciones altas del metal [Günther y cols., 2012]. En este trabajo no se encontraron cambios en los niveles del factor de transcripción en núcleo en los tiempos evaluados, posiblemente puede existir una acumulación después de la 9 h post-cirugía ya que es cuando existe un incremento de zinc libre y como es mostrado en los resultados por el aumento en la transcripción de ZnT1 que fue detectado a las 16 h, es posible que MTF-1 pueda estar acumulado en núcleo antes de este tiempo.

Se ha descrito que la expresión de MT con excepción de MT-3 es regulada por la unión de zinc a MTF-1 [Colvin y cols., 2010], en este modelo el incremento de MT se prolongó hasta las 36 horas retornando a sus niveles basales a las 48 horas, estos datos coinciden con el modelo de inflamación generado por IL-1 α [Cousins y cols., 1988]. Es posible que la expresión de MT durante el trauma quirúrgico haya sido inducida por el incremento de zinc hepático, el cual se da a partir de las 9 h post-cirugía, con la finalidad de mantener las concentraciones de zinc libre a niveles no tóxicos.

Trabajos previos han mostrado que ZnT1 es el único transportador de la familia ZnT que se encuentra localizado a nivel de membrana plasmática y tiene como función exportar al zinc intracelular hacia el exterior de las células [Palmiter y Findley, 1995; McMahan y Cousins, 1998]. La síntesis de ZnT1 es regulada por el incremento en la concentración de zinc tisular y por lo tanto su expresión depende de la activación del factor de transcripción MTF-1 por este metal [Lichten y Cousins, 2009; Langmade y cols., 2002]. En este estudio los resultados de la evaluación en el nivel del ARNm de ZnT1 mostró cambios en respuesta

al trauma quirúrgico; los estudios por RT-PCR tiempo real indican que a las 12 h posteriores al proceso quirúrgico se presenta una regulación negativa del ARNm de ZnT1. Estos resultados coinciden con el reporte de Liuzzi y cols., en 2005, quienes muestran que a las 16 h de la administración de lipopolisacárido a ratones hay una regulación negativa del nivel de ARNm de ZnT1. Esta disminución del ARNm posiblemente da lugar a una disminución de la síntesis de la proteína, para de esta manera mantener niveles elevados de zinc hepático, como fue evidenciado en nuestros resultados, la cual inicia y se mantiene desde las 20 a las 32 h. Actualmente no se tienen comunicaciones acerca de la presencia de un regulador o reguladores negativos del nivel de ARNm de ZnT1 en este proceso, si los hubiere, lo que sería de gran interés ya que solo se tienen reportes que la regulación positiva de este transportador, la que depende de las concentraciones de zinc intracelular. Desde las 16 y hasta las 36 h se observó una regulación positiva, del mensajero de ZnT1, presentando un incremento que fue dependiente del tiempo posterior al proceso quirúrgico. Esta regulación positiva coincide con el incremento en la concentración de la proteína la cual se observa desde las 20 h y permanece elevada hasta las 32 h. La máxima expresión de ZnT1 se presentó entre las 28 y 32 h posteriores a la cirugía experimental, lo que constituye un dato relevante para nuestro trabajo, ya que sería el primer hallazgo del retorno a las concentraciones basales de zinc en hígado durante los procesos inflamatorios.

11. CONCLUSIONES

1. La inflamación generada por una cirugía abdominal experimental en ratas produce una redistribución de zinc desde plasma hacia hígado, dando lugar a una hipozinquemia.
2. La captación de zinc por hígado se produce como una consecuencia del incremento del transportador Zip14. Este incremento ocurre debido principalmente a la liberación de IL-6 durante el proceso inflamatorio, interleucina que induce la expresión de Zip14 mediante la vía Jak2-STAT3.
3. A nivel intracelular, los niveles tanto de zinc libre, como zinc total presentan cambios a diferentes tiempos después de la cirugía.

4. En las etapas posteriores al proceso inflamatorio producido por la cirugía en los animales de experimentación, se produce un incremento en la expresión de MT el cual puede regular las concentraciones de zinc libre.
5. Durante el proceso quirúrgico experimental en ratas se presenta una regulación negativa en el ARNm de ZnT1 durante las primeras 12 horas, proceso que posiblemente contribuye a la acumulación de zinc libre en los hepatocitos.
6. Posterior a las 20 horas de la cirugía abdominal en las ratas se produce un incremento en la expresión del exportador de zinc, ZnT1, lo que explica el retorno de zinc hepático a sus niveles basales. Este último proceso es de suma importancia ya que impide la toxicidad de los altos niveles de zinc en la inflamación y favorece el retorno a la homeostasis hepática durante el proceso inflamatorio.
7. Durante la cirugía no se observaron cambios en los niveles proteicos del factor de transcripción MTF-1 en núcleo en los tiempos evaluados, éstos resultados sugieren que el mecanismo involucrado en su participación para la síntesis de MT y ZNT1 ocurre más por su activación por zinc, que por su expresión proteica.

12. REFERENCIAS

1. Akintola, D. F.; Sampson, B.; Burrin, J.; Fleck, A.; Price, C.; Hall, G. **1997**. Changes in plasma metallothionein-1, interleukin-6, and C-reactive protein in patients after elective surgery. *Clin. Chem.* 43:845-847.
2. Andrews, G. K. **2008**. Regulation and function of Zip4, the acrodermatitis enteropathica gene. *Biochem. Soc. Trans.* 36:1242-1246.
3. Angele, M. K.; Frantz, M. C.; Chaudry, I.H. **2006**. Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches. *Clinics (Sao Paulo)*. 61:479-488.
4. Ataie-Kachoie, P.; Pourgholami, M.H.; Morris, D.L. **2013**. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: A strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2:163-73
5. Aydemir, T. B.; Chang, S-M.; Guthrie, G. J.; Maki, A. B.; Ryu, M-S.; Karabiyik, A.; Cousins, R. J. **2012**. Zinc transporter Zip14 functions in hepatic zinc, iron and glucose homeostasis during de innate immune response (endotoxemia). *PloS ONE*. 7:e48679.

6. Bao, H; Liu, M-J; Knoell, D. L. **2010**. Zinc modulates the innate immune response in vivo to polymicrobial sepsis through regulation of NFκB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298:L744–L754.
7. Brambila, E.; Sánchez, J. L.; Albores, A.; Waalkes, M. **1999**. Early effects of surgery on zinc and metallothionein levels in female rats. *Biol Trace Elem Res.* 70:173-182.
8. Brechenmacher, S. A.; Bruns, C. J.; Van den Engel, N.K.; Angele, P.; Loehe, F.; Jauch, K. W.; Angele, M. K. **2008**. Influence of surgical trauma on the mRNA expression of sex hormone receptors in PBMCs in male and female patients. *Langenbecks Arch Surg.* 393:871–876.
9. Cardinale, F.; Chinellato, I.; Caimmi, S.; Peroni, D. G.; Franceschini, F.; Miraglia Del Giudice, M.; Bernardini, R. **2011**. Perioperative period: immunological modifications. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 24:S3-S12.
10. Castell, J. V.; Gómez, L. M.; David, M.; Hirano, T.; Kishimoto, Heinrich. **1988**. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 232:347-50
11. Chen, Y.; Maret, W. **2001**. Catalytic selenols couple the redox cycles of metallothionein and glutathione. *Eur. J. Biochem.* 268:3346-3353.
12. Cherian, M. G.; Kang, Y. J. **2006**. Metallothionein and cell liver regeneration. *Exp. Biol. Med.* 231:138-144.
13. Chien, C.M.; Lin, K.L.; Su, J.C.; Chuang, P.W.; Tseng, C.H.; Chen, Y.L.; et al. **2010**. Naphtho[1,2b]furan-4,5-dione induces apoptosis of oral squamous cell carcinoma: involvement of EGF receptor/PI3K/Akt signaling pathway. *The European Journal of Pharmacology.* 636:52–8.
14. Chimienti, F.; Devergnas, S.; Favier, A.; Seve, M. **2004**. Identification and cloning of a β-cell-specific zinc transporter, ZnT-8 localized into insulin secretory granules. *Diabetes.* 53:2330–2337.
15. Chinenov, Y.; Kerppola, T.K. **2001**. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene.* 20(19):2438-52.
16. Colvin, R. A.; Holmes, W. R.; Fontaine, C. P.; Maret, W. **2010**. Cytosolic zinc buffering and muffling: Their role in intracellular zinc homeostasis. *Metalomics.* 2:306-317.

17. Cousins, R. J., Leinart AS. **1988**. Tissue-specific regulation of zinc metabolism and metallothionein genes by interleukin. *FASEB J.* 2:2884–90.
18. Cousins, R. J.; Liuzzi, J. P.; Lichten, L. **2006**. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *A. J. Biol. Chem.* 281:24084-24089.
19. Cray, C; Zaias, J.; Altman, N. H. **2009**. Acute phase response in animals: A review. *Com. Med.* 59:517-526.
20. Davis, S. R.; Cousins, R. J. **2000**. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J. Nutr.* 130: 1085–1088.
21. Desborough, J. P. **2000**. The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth.* 85:109-117.
22. Dufner-Beattie, J.; Langmade, S. J.; Wang, F.; Eide, D.; Andrews, G. K. **2003**. Structure, function, and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter genes. *J. Biol. Chem.* 278:50142-50150.
23. Eaton, D. L.; Toal, B. F. **1982**. Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 66:134-142.
24. Eide, D.; Broderius, M.; Fett, J.; Guerinot, M. L. **1996**. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:5624-5628.
25. Eide, D. **2004**. The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch.* 447:786-800.
26. Eng, B. H.; Guerinot, D. E.; Saier, M. H. **1998**. Sequence Analyses and phylogenetic characterization of the zip family of metal ion transporters proteins. *J. Membr. Biol.* 166:1-7.
27. Ernst, M.; Jenkins, B.J.; **2004**. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet.* 20, 23–32.
28. Eulendorf, R.; Dittrich, A.; Khouri, C.; Müller, P. J.; Mütze, B.; Wolf, A.; Schaper, F. **2012**. Interleukin-6 signalling: More than Jaks and STATs. *European Journal of Cell Biology* 91:486– 495.
29. Fonseca, J.E.; Santos, M.J.; Canhão, H.; Choy, E.; Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmunity Reviews* 8:538–542.

30. Fraker, P. J.; King, L. E.; Laakko, T.; Wollmer, T. L. **2000**. The dynamic link between the integrity of the immune system and status zinc. *J. Nutr.* 130:1399S-1406S.
31. Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., Hirano, T., **1996**. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity.* 5, 449–460.
32. Fukada, T.; Yamasaki, S.; Nishida, K.; Murakami, M.; Hirano, T. **2011**. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases. *J. Biol. Inorg. Chem.* 16:1123-1134.
33. Fukada, T.; Kambe, T. **2011**. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics.* 3:662-674.
34. Fukunaka, A.; Suzuki, T.; Kurokawa, Y.; Yamazaki, T.; Fujiwara, N.; Ishihara, K.; Migaki, H.; Okumura, K.; Masuda, S.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Nagao, M.; Kambe, T. **2009**. Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 284:30798-30806.
35. Gaetke, L.M.; McClain, C.J.; Talwalkar, R.T.; Shedlofsky, S.I. **1997**. Effects of endotoxin on zinc metabolism in human volunteers. *Am J Physiol.* 272:E952–E956
36. Gaither, L. A.; Eide, D. J. **2000**. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *J. Biol. Chem.* 275:5560-5564.
37. Gaither, L. A.; Eide, D. J. **2001**. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals.* 14:251–270.
38. Gerhartz, C.; Heesel, B.; Sasse, J.; Hemmann, U.; Landgraf, C.; Schneider-Mergener, J.; Horn, F.; Heinrich, P.C.; Graeve, L. **1996**. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. 1. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J. Biol. Chem.* 271, 12991–12998
39. Gitan, R. S.; Luo, H.; Rodgers, J.; Broderius, M.; Eide, D. **1998**. Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J. Biol. Chem.* 273:28617-28624.
40. Goldsby, R. A.; Kindt, J. T.; Osborne, B. A.; Kuby, Janis. **2004** <<Cap. 15 Migración de los leucocitos e inflamación >>. *Inmunología*. Quinta edición. Mc Graw Hill. 357-380.

41. Gruys, E.; Toussaint, M. J. M.; Niewold, T. A.; Koopmans, S. J. **2005**. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ SCI*. 6B:1045-1056.
42. Grzywacz, A.; Gdula-Argasinska, J.; Muszynska, B.; Tyszka- Czochara, M.; Librowski, T.; Opoka, W. **2015**. Metal responsive transcription factor 1 (MTF-1) regulates zinc dependent cellular processes at the molecular level. *Acta Biochim Pol*. 62(3):491-8.
43. Guerinot, M. L. **2000**. The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta*. 1465:190-198.
44. Günther, V.; Lindert, U.; Schaffner, W. **2012**. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1823:1416–1425.
45. Haase, H.; Maret, W. **2003**. Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp Cell Res*. 291(2):289–298
46. Hao, Q.; Hong, S. H.; Maret, W. **2007**. Lipid raft-dependent endocytosis of metallothionein in HepG2 cells. *J. Cell. Physiol*. 210:428–435.
47. Haq, F.; Mahoney, M.; Koropatnick, J. **2003**. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat. Res*. 533:211-222.
48. Hennessy, B.T.; Smith, D.L.; Ram, P.T.; Lu, Y.; Mills, G.B. **2005**. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*; 4: 988–1004.
49. Hernández, Bautista. R. J. Diciembre **2007**. Tesis de Maestría. Papel de las citocinas TNF-alfa, IL-1 e IL-6 en la inducción de la síntesis de metalotioneína hepática durante un proceso quirúrgico experimental en animales de laboratorio. Página (50)
50. Huang, L.; Kirschke, C. P.; Gitschier, J. **2002**. Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J. Biol. Chem*. 277:26389-26395.
51. Huang, L.; Kirschke, C. P. **2007**. A di-leucine sorting signal in Zip1 (SLC39A1) mediates endocytosis of the protein. *FEBS J*. 274:3986-3997.
52. Huber, K. L.; Cousins, R. J. **1992**. Metallothionein expression in rat bone marrow is dependent on dietary zinc but not dependent on interleukin-1 or interleukin-6. *J. Nutr*. 123:642-648
53. Inoue, K.; Takano, H.; Shimada, A.; Satoh, M. **2009**. Metallothionein as an Anti-Inflammatory Mediator. *Mediators Inflamm*. 2009:1-7.

54. Jackson MJ. **1989**. Physiology of zinc: general aspects. In: Zinc in Human Biology, edited by Mills CF. *New York: Springer*. 1-14
55. Jeon, K-I; Jeong, J-Y; Jue, D-M. **2000**. Thiol-reactive metal compounds inhibit NF- κ B activation by blocking I κ B kinase. *J. Immunol.* 64:5981-5989.
56. John, E.; Laskow, T. C.; Buchser, W. J.; Pitt, B. R.; Basse, P. H.; Butterfield, L. H.; Kaliski, P. **2010**. Zinc in innate and adaptive tumor immunity. *J Transl Med.* 8:118.
57. Jou, M-Y; Hall, A. G.; Philipps, A. F.; Kelleher, S. L.; Lönnerdal, B. **2009**. Tissue-specific alterations in Zinc transporter expression in intestine and Liver reflect a threshold for homeostatic compensation during dietary Zinc deficiency in weanling rats. *J. Nutr.* 139:835-841.
58. Judd, L.M., Alderman, B.M., Howlett, M., Shulkes, A., Dow, C., Moverley, J., Grail, D., Jenkins, B.J., Ernst, M., Giraud, A.S. **2004**. Gastric cancer development in mice lacking the SHP2 binding site on the IL-6 family co-receptor gp130. *Gastroenterology.* 126, 196–207.
59. Jurado, R. L. **1997**. Iron, Infections, and Anemia of Inflammation. *Clin. Infect. Dis.* 25:888-895.
60. Kägi, J. H. R.; Vallee, B. **1960**. Metallothionein: a cadmium- and zinc- containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 235:3460-3465.
61. Kambe, T. **2011**. An overview of a wide range of functions of ZnT and Zip zinc transporters in the secretory pathway. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75:1036-1043.
62. Kambe, T.; Narita, H.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Hirose, J.; Amano, T.; Sugiura, N.; Sasaki, R.; Mori, K.; Iwanaga, T.; Nagao, M. **2002**. Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* 277:19049-19055.
63. Kambe, T.; Tsuji, T.; Hashimoto, A.; Itsumura, N. **2015**. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiol. Rev.* 95: 749–784
64. Kambe, T.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Sasaki, R.; Nagao, M. **2004**. Overview of mammalian zinc transporters. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:49-68.
65. Kawachi, M.; Kobae, Y.; Mimura, T.; Maeshima, M. **2008**. Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn²⁺/H⁺ antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity. *J. Biol. Chem.* 283:8374-8383.
66. Kehlet, H. **2000**. Manipulation of the metabolic response in clinical practice. *World J Surg.* 24:690-695.

67. Kelly, E. J.; Quaiife, C. J.; Froelick, G. J.; Palmiter, R. D. **1996**. Metallothionein I y II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. *J. Nutr.* 126:1782-1790.
68. Kim, S.; Watanabe, K.; Shirahata, T.; Watarai, M. **2004**. Zinc uptake system (znuA locus) of *Brucella abortus* is essential for intracellular survival and virulence in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 66:1059-1063.
69. Kimura, T.; Kambe, T. **2016**. The functions of Metallothionein and ZIP and ZnT transporters: An overview and perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 17(3):336.
70. Kirschke, C. P.; Huang, L. **2003**. ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 278:4096-4102.
71. Knöferl, M. W.; Angele, M. K.; Diodato, M. D.; Schwacha, M. G.; Ayala, A.; Cioffi, W.G.; Bland, K. I.; Chaudry, I. H. **2002**. Female sex hormones regulate macrophage function after trauma-hemorrhage and prevent increased death rate from subsequent sepsis. *Ann. Surg.* 235:105-112.
72. Kobayashi, K.; Kuroda, J.; Shibata, N.; Hasegawa, T.; Seko, Y.; Satoh, M.; Tohyama, C.; Takano, H.; Imura, N.; Sakabe, K.; Fujishiro, H.; Himeno, Seiichiro. **2007**. Induction of Metallothionein by Manganese Is Completely Dependent on Interleukin-6 Production. *J Pharmacol Exp Ther.* 320:721-7.
73. Kojima, Y.; Berger, C.; Vallee, B. L.; Kägi, J. H. **1976**. Aminoacid sequence of equino renal metallothionein-1B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:3413-3417.
74. Kuribayashi, T.; Tomizawa, M.; Seita, T.; Tagata, K.; Yamamoto, S. **2011**. Relationship between production of acute-phase proteins and strength of inflammatory stimulation in rats. *Lab. Anim.* 45:215–218.
75. Lang, C.; Murgia, C.; Leong, M.; Tan, L-W.; Perozzi, G.; Knight, D., Ruffin, R.; Zalewski, P. **2007**. Anti-inflammatory effects of zinc and alterations in zinc transporter mRNA in mouse models of allergic inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 292:L577-L584.
76. Lai, C.F.; Ripperger, J.; Wang, Y.; Kim, H.; Hawley, R.B.; Baumann, H. **1999**. The STAT3-independent signaling pathway by glycoprotein 130 in hepatic cells. *J. Biol. Chem.* 274, 7793–7802.
77. Langmade, S. J.; Ravindra, R.; Daniels, P. J.; Andrews, G. K. **2000**. The Transcription Factor MTF-1 Mediates Metal Regulation of the Mouse ZnT1 Gene. *J. Biol. Chem.* 275:34803–34809.
78. Lansdown, A. B.; Sampson, B.; Rowe, A. **1999**. Sequential changes in trace metal, metallothionein and calmodulin concentrations in healing skin wounds. *J. Anat.* 195:375-386.

79. Lansdown, A. B.; Mirastschijski, U.; Stubbs, N.; Scanlon, E.; Agren, M.S. **2007**. Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen.* 15:2-16.
80. Lee, P.; Peng, H.; Gelbart, T.; Wang, L.; Beutler, E. **2004**. Regulation of hipcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:1906-1910.
81. Libby, P. **2007**. Inflammatory mechanisms: The molecular basis of inflammation and disease. *Nutr. Rev.* 65:S140-S146.
82. Lichten, L. A.; Cousins, R. J. **2009**. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu. Rev. Nutr.* 29:153-76
83. Lichten, L. A.; Liuzzi, J. P.; Cousins, R. J. **2009**. Interleukin-1 β contributes via nitric oxide to the upregulation and functional activity of the zinc transporter Zip 14 (Slc39a14) in murine hepatocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296:G860-G867.
84. Liu, M.J.; Bao, S.; Galvez-Peralta M.; Pyle, C.J.; Rudawsky, A.C.; Pavlovicz, R.E.; Killilea, D.W.; Li, C.; Nebert, D.W.; Wewers, M.D.; Knoell, D.L. **2013**. ZIP8 regulates host defense through zinc mediated inhibition of NF-kappaB. *Cell Rep.* 3(2):386-400.
85. Liuzzi, J.P.; Blanchard, R. K.; Cousins, R. J. **2001**. Differential Regulation of Zinc Transporter 1, 2, and 4 mRNA Expression by Dietary Zinc in Rats. *J. Nutr.* 131:46-52.
86. Liuzzi, J. P.; Lichten, L. A.; Rivera, S.; Blanchard, R. K.; Aydemir, T. B.; Knutson, M. D.; Ganz, T.; Cousins, R. J. **2005**. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip 14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:6843-68.
87. Lu, M.; Fu, D. **2007**. Structure of the zinc transporter YiiP. *Science.* 317:1746-1748.
88. Lu, M.; Chai, J.; Fu, D. **2009**. Structural basis for auto-regulation of the zinc transporter YiiP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16:1063-1067.
89. Mao, X. Kim, B. E.; Wang, F.; Eide, J. D.; Petris, M. J. **2007**. A histidina-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc citotoxicity. *J. Biol. Chem.* 282:6992-7000.

90. Maret, W. **2011**. Redox biochemistry of mammalian metallothioneins. *J. Biol. Inorg. Chem.* 16:1079-1086.
91. Maret, W.; Li, Y.; **2009**. Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem. Rev.* 109:4682-4707.
92. Margoshes, M.; Vallee, B. L. **1957**. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79:4813-4814.
93. McMahon, R. J.; Cousins, R. J. **1998**. Regulation of zinc transporter ZnT1 by dietary zinc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:4841-4846.
94. Medzhitov, R. **2010**. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell.* 140:771-776.
95. Min, K-S.; Takano, M.; Amoko, K.; Ueda, H.; Tanaka, K. Involvement of the essential metal transporter Zip14 in hepatic Cd accumulation during inflammation. *Toxicol Lett.* 218:18-23.
96. Mocchegiani, E.; Malavolta, M. **2008**. Zinc-gene interaction related to inflammatory/immune response in ageing. *Genes Nutr.* 3:61-75.
97. Moltedo, O.; Verde, C.; Capasso, A.; Parisi, E.; Remondelli, P.; Bonatti, S.; Alvarez-Hernandez, X.; Glass, J.; Alvino, C. G.; Leone, A. **2000**. Zinc transport and metallothionein secretion in the intestinal human cell line Caco-2. *J. Biol. Chem.* 275:31819-31825.
98. Moshage H. **1997**. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J. Pathol.* 181:257-66.
99. Myers, M.; Fleck, A.; Sampson, B.; Colley, C. M.; Bent, J.; Hall, G. **1984**. Early plasma protein and mineral changes after surgery: a two stage process. *J. Clin. Pathol.* 37:862-866.
100. Namdarghanbari, M.; Wobig, W.; Krezoski, S.; Tabatabai, N.M.; Petering, D.H. **2011**. Mammalian metallothionein in toxicology, cancer, and cancer chemotherapy. *J. Biol. Inorg. Chem.* 16:1087-1101.
101. Nemeth, E.; Rivera, S.; Gabayan, V.; Keller, C.; Taudorf, S.; Pedersen, B. K.; Ganz, T. **2004**. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.* 113:1271-1276.
102. Ngu, T. T.; Stillman, M. J. **2009**. Metalation of Metallothioneins. *IUBMB Life*, 61: 438-446.

103. Nishida, K.; Hasegawa, A.; Nakae, S.; Oboki, K.; Saito, H.; Yamasaki, S.; Hirano, T. **2009**. Zinc transporter Znt5/Slc30a5 is required for the mast cell-mediated delayed-type allergic reaction but not the immediate-type reaction. *J Exp Med.* 206(6):1351–1364.
104. Ohana, E.; Hoch, E.; Keasar, C.; Kambe, T.; Yifrach, O.; Hershinkel, M.; Sekler, I. **2009**. Identification of the Zn²⁺ binding site and mode of operation of a mammalian Zn²⁺ transporter. *J. Biol. Chem.* 284:17677-17686.
105. Okada, A.; Takagi, Y.; Nezu, R.; Lee, S. **1990**. Zinc in clinical surgery—A research review. *Jpn J Surg.* 20:635-644.
106. Overbeck, S.; Uciechowski, P.; Ackland, M.L.; Ford, D.; Rink, L. **2008**. Intracellular zinc homeostasis in leukocyte subsets is regulated by different expression of zinc exporters ZnT-1 to ZnT-9. *J. Leukoc. Biol.* 83:368-380.
107. Palmiter, R. D. **1994**. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:1219-1223.
108. Palmiter, R. D.; Findley, S. D.; Whitmore, T. E.; Durnam, D. M. **1992**. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:6333-6337.
109. Palmiter, R. D.; Findley, S. D. **1995**. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J.* 14:639-649.
110. Palmiter, R. D.; Cole, T. B.; Findley, S. D. **1996 a**. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *EMBO J.* 15:1784-1791.
111. Palmiter, R. D.; Cole, T. B.; Quaife, C. J.; Findley, S. D. **1996 b**. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:14934-14939.
112. Palmiter, R. D.; Huang, L. **2004**. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch.* 447:744-751.
113. Paulsen, I. T.; Saier M. H. **1997**. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* 156:99–103.
114. Pories, W. J.; Henzel, J. H.; Rob, C. G.; Strain, W. H. **1967**. Acceleration of healing with zinc sulfate. *Ann. Surg.* 65:432-436.

115. Powanda, M. C.; Abeles, F. B.; Bostian, B. F.; Flower, J. P.; Hauer, E. C. **1979**. Differential effect of clofibrate on inflammation-induced alterations in plasma proteins in the rat. *Biochem. J.* 178:633-641.
116. Prasad, A. **2008**. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp. Gerontol.* 43:370-377.
117. Prasad, A. **2009**. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 12:646-652.
118. Ramadori, G.; Armbrust, T. **2001**. Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 13:777-84.
119. Reyes Díaz, A. **2011**. Tesis de Maestría. Localización de zinc y metalotioneínas en el núcleo y citoplasma de hepatocitos durante las primeras horas de un proceso inflamatorio. Página 47.
120. Rink, L.; Gabriel, P. **2000**. Zinc and immune system. *Proc Nutr Soc.* 59:541-552.
121. Rofe, A. M.; Philcox, J. C.; Coyle, P. **1996**. Trace metal, acute phase and metabolic response to endotoxin in metallothionein-null mice. *Biochem. J.* 314:793-797.
122. Rogers, E. E.; Eide, D. J.; Guerinot, M. L. **2000**. Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:12356-12360.
123. Schaper, F.; Rose-John, S. **2015**. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26:475-87.
124. Sayadi, A.; Nguyen, A-T; Bard, F. A.; Bard-Chapeau, E. A. **2012**. Zip14 expression induced by lipopolysaccharides in macrophages attenuated inflammatory response. *Inflamm. Res.* 62:133-43
125. Schapiro, J. M.; Libby, S. J.; Fang, F. C. **2003**. Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:8496-501.
126. Scheingraber, S.; Dobbert, D.; Schmiedel, P.; Seliger, E.; Dralle, H. **2005**. Gender-specific differences in sex hormones and cytokines in patients undergoing major abdominal surgery. *Surg. Today.* 35:846-854.
127. Schmitz, J.; Dadmen, H.; Grimm, C.; Gendo, C.; Muller- Newen, G.; Heinrich, P.C.; Schaper, F. **2000**. The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length

- glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction. *J. immunol.* 164, 848-854
128. Schroeder, J. J.; Cousins, R. J. **1990**. Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:3137-3141.
129. Scott, L. E. J. Junio **2007**. Tesis de maestría. Efecto de las hormonas adrenalina, noradrenalina, corticoesterona y glucagón en la inducción de metalotioneina hepática durante un proceso quirúrgico abdominal en rata.
130. Sheikh, N.; Dudas, J.; Ramadori, G. **2007**. Changes of gene expresión of iron regulatory proteins during turpentine oil-induced acute-phase response in the rat. *Lab. Invest.* 87:713-725.
131. Stahl, N.; Boulton, T.G.; Farruggella, T.; Ip, N.Y.; Davis, S.; Witthuhn, B.A.; Quelle, F.W.; Silvennoinen, O.; Barbieri, G.; Pellegrini, S.; Ihle, J.N.; Yancopoulos, G.D. **1994**. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 alpha receptors components. *Science.* 263, 92-95.
132. Siewert, E.; Dietrich, C. G.; Lammert, F., Heinrich, P. C.; Mater, S.; Gartung, C.; Geier, A. **2004**. Interleukin-6 regulates hepatic transporters during acute-phase response. *Biochem Biophys Res Commun.* 322:232-8.
133. Suzuki, T.; Ishihara, K.; Magaki, H.; Ishihara, K.; Nagao, M.; Yamagushi-Iwai, Y.; Kambe, T. **2005**. Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells. *J. Biol. Chem.* 280:30956-30962.
134. Tanaka, T.; Narazaki, M.; Ogata, A.; Kashimoto, T. **2014**. A new era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy. *Semin Immunol.* 26:88-96.
135. Taylor, K. M. **2000**. LIV-1 breast cancer protein belongs to new family of histidine-rich membrane proteins with potential to control intracellular Zn²⁺ homeostasis. *IUBMB Life.* 49:249-253.
136. Taylor, K. M.; Nicholson, R. I. **2003**. The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochim. Biophys. Acta.* 1611:16-30.
137. Tebbutt, N.C., Giraud, A.S., Inglese, M., Jenkins, B., Waring, P., Clay, F.J., Malki S., Alderman, B.M., Grail, D., Hollande, F., Heath, J.K., Ernst, M., **2002**. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat. Med.* 8, 1089–1097.

138. Ngu, T. T.; Stillman, M. J. **2009**. Metalation of metallothionein. *IUBMB Life*. 61:438-446.
139. Van Dyke, T. E.; Kornman, K. S. **2008**. Inflammation and factors that may regulate inflammatory response. *J Periodontol*. 79:1503-1507.
140. Vasak, M.; Meloni, G. **2011**. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J. Biol. Inorg. Chem*. 16:1067–1078.
141. Vasto, S.; Mocchegiani, E.; Candore, G.; Listí, F.; Colonna-Romano, G.; Lio, D.; Malavolta, M.; Giacconi, R.; Cipriano, C.; Caruso, C. **2006**. Inflammation, genes and zinc in ageing and age-related diseases. *Biogerontology*. 7:315-327.
142. Venteclef, N.; Jakobsson, T.; Steffensen, R. K.; Treuter, E. **2011**. Metabolic nuclear receptor signaling and the inflammatory acute phase response. *Trends Endocrinol. Metab*. 22:333-43.
143. Wang, F.; Dufner-Beattie, J.; Kim, B. E.; Petris, M.J.; Andrews, G.; Eide, D. J. **2004**. Zinc-stimulated endocytosis controls activity of the mouse ZIP1 and ZIP3 zinc uptake transporters. *J. Biol. Chem*. 279:24631-24639.
144. Weaver, B. P.; Bufner-Beattie, J.; Kambe, T.; Andrews, G. K. **2007**. Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 y Slc39a5 zinc transporters (Zip4 y Zip5). *Biol. Chem*. 388:1301-1312.
145. Wimmer, U.; Wang, Y.; Georgiev, O.; Schaffner, W. **2005**. Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/ metallothioneins and glutathione. *Nucleic Acids Res*. 33:5715-5727.
146. Ye, B.; Maret, W.; Vallee, B. L. **2001**. Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 98:2317-2322.
147. Yu, Y. Y.; Kirschke, C. P.; Huang, L. **2007**. Immunohistochemical Analysis of ZnT1, 4, 5, 6, and 7 in the Mouse Gastrointestinal Tract. *J. Histochem. Cytochem*.55: 223–234.
148. Zhao, H.; Eide, D. **1996** (a). The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 93:2454-2458.
149. Zhao, H.; Eide, D. **1996** (b). The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. 271:23203-23210.

14. ANEXOS

Análisis *In silico* del promotor de Zip14

Con la finalidad de identificar posibles sitios de unión a factores de transcripción que pueden ser importantes en la regulación del gen de *Zip14* durante el proceso inflamatorio, se realizó un análisis *in silico* de su región promotora. Para este análisis se obtuvo una secuencia de la base de datos PEDB (Mammalian *P*romoter/*E*nhancer *D*ata*B*ase) que perteneciente a la región promotora del gen de Zip14 de rata (GeneID: [306009](#)), posteriormente fue analizada con el programa de bioinformática MatInspector y se pudo identificar posibles sitios de unión a STAT, CREB, GREF, AP1. Los sitios de unión de estos tres últimos factores de transcripción fueron también encontrados al realizar el análisis con la base de datos Patch (Figura 15). Estos datos coinciden con los reportes sobre la regulación de la expresión de Zip14, en donde se ha puesto de manifiesto que la expresión del transportador depende de IL-6 y que una vía de señalización probable para la respuesta a esta citocina sería la vía STAT (Liuzzi y cols., 2005). Otro regulador positivo de la expresión de Zip14 es IL-1 β vía NO como segundo mensajero, ya que se ha evidenciado mediante inmunoprecipitación de la cromatina que la proteína activadora (AP-1) y la ARN polimerasa II se asocian al promotor de Zip14 después de la exposición a NO, indicando un papel importante de AP-1 en la transcripción de Zip14 de ratón [Lichten y cols., 2009]. Recientemente se ha reportado que la expresión de Zip14 se incrementa en macrófagos estimulados con LPS y tratados con dexametasona, por lo tanto los glucocorticoides pueden ser inductores de la expresión de este transportador [Sayadi y cols., 2012] lo cual coincide con el análisis del promotor de Zip14 de rata en donde se encontró un sitio de unión al receptor de glucocorticoides. En el caso del factor de transcripción de CREB este es activado por glucagón, en este caso se ha reportado un incremento en la expresión de Zip14 en una línea celular que produce glucagón, por lo tanto esta hormona también puede ser un inductor de la expresión de Zip14 [Gyulkhandanyan y cols. 2008; Aydemir y cols. 2012].

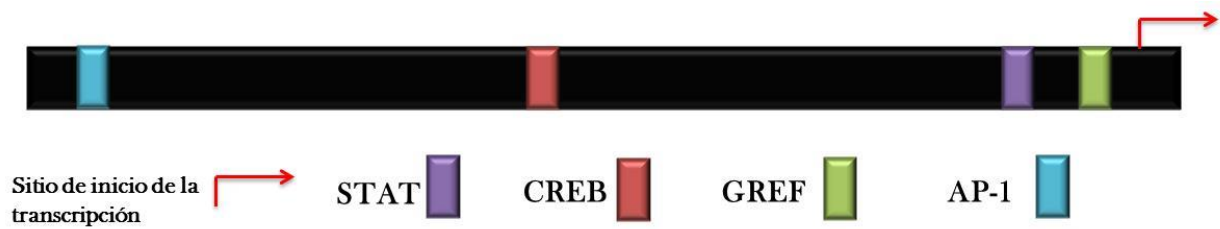


Figura 9. Representación lineal de la región promotora del transportador de zinc Zip14

4.3.1 Validación del experimento de PCR en tiempo real

Con la finalidad de determinar si las reacciones de amplificación de Zip14 y β -actina tienen la misma eficiencia en la PCR, se evaluó como varía el ΔC_T [$C_{T(\text{ZnT1})} - C_{T(\beta\text{-Actina})}$] a diferentes concentraciones de la plantilla (ARN total). La evaluación de las eficiencias relativas de la amplificación de Zip14 y β -Actina (control endógeno) se realizó mediante la ejecución de las curvas de calibración para cada amplicón utilizando la misma muestra (Figura 5). Los valores de C_T generados a partir de los puntos medios de la curva estándar fueron utilizados para calcular el ΔC_T (Tabla 1)

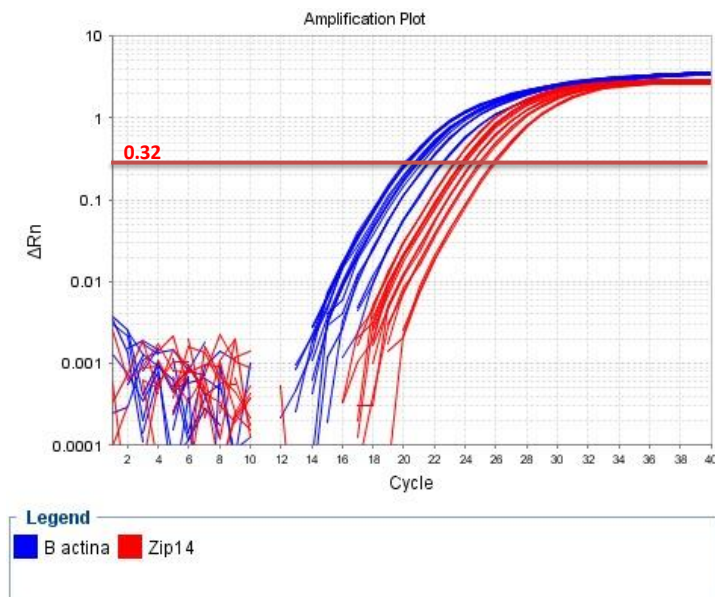


Figura 5. Gráfico de amplificación de β -actina y ZnT1 utilizando diferentes concentraciones de ARN

Tabla 1. Cálculos de ΔC_T para la validación del

Concentración de ARN total (ng)	Promedio de C_T Zip14	Promedio de C_T β -Actina	ΔC_T Zip14 - β -Actina
50	26.75 \pm 0.074	22.86 \pm 0.040	3.89 \pm 0.090
100	25.87 \pm 0.078	21.88 \pm 0.021	3.99 \pm 0.084
200	25.32 \pm 0.007	21.19 \pm 0.062	4.13 \pm 0.055
400	24.81 \pm 0.105	21.15 \pm 0.264	3.80 \pm 0.079
800	24.13 \pm 0.021	20.57 \pm 0.050	3.56 \pm 0.046
1600	24.62 \pm 0.006	20.51 \pm 0.069	4.11 \pm 0.066

Estos ΔC_T fueron graficados contra el logaritmo de las concentraciones utilizadas (Figura 6), para crear una regresión lineal semi-logarítmica y obtener el valor de la pendiente que debe ser <0.1 para que se dé como validado el experimento. El valor de pendiente obtenida fue de 0.0454 lo cual indica que el experimento es validado, demostrando así que las reacciones de amplificación de Zip14 y β -actina tienen la misma eficiencia de reacción en la PCR.

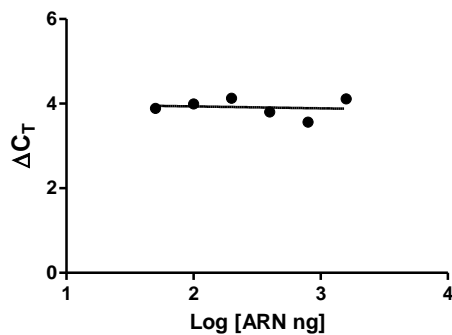


Figura 6. Gráfico de validación de ΔC_T contra log de concentración de ARN total

10.6.1 Validación del experimento de PCR en tiempo real

Con la finalidad de determinar si las reacciones de amplificación de ZnT1 y β -actina tienen la misma eficiencia en la PCR, se evaluó como varía el ΔC_T [$C_{T(\text{ZnT1})} - C_{T(\beta\text{-Actina})}$] a diferentes concentraciones de la plantilla (ARN total). La evaluación de las eficiencias relativas de la amplificación de ZnT1 y β -Actina (control endógeno) se realizó mediante la ejecución de las curvas de calibración para cada amplicón utilizando la misma muestra (Figura 10). Los valores de C_T generados a partir de los puntos medios de la curva estándar fueron utilizados para calcular el ΔC_T (Tabla 1).

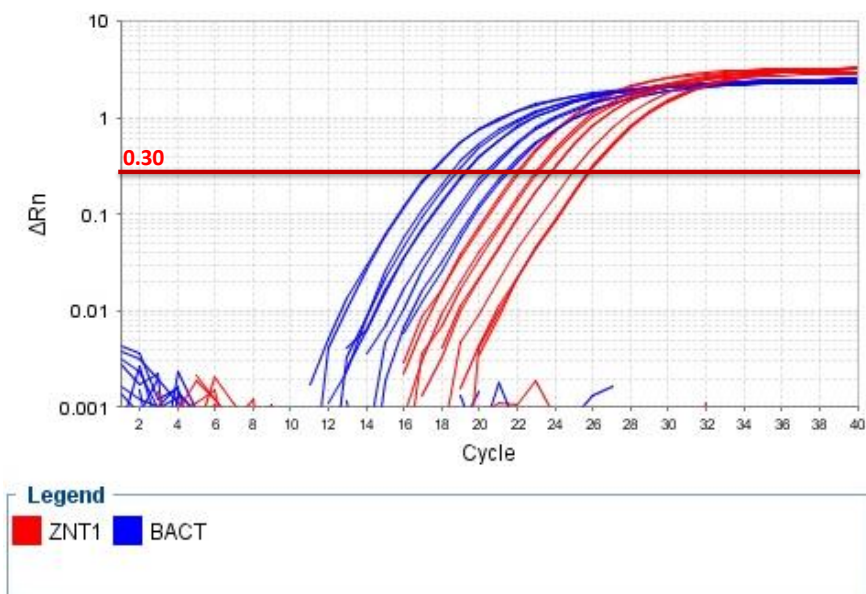


Figura 10. Gráfico de amplificación de β -actina y ZnT1 utilizando diferentes concentraciones de ARN total.

Tabla 2. Cálculos de ΔC_T para la validación del experimento.

Concentración de ARN total (ng)	Promedio de C_T ZnT1	Promedio de C_T β -Actina	ΔC_T ZnT1 - β -Actina
100	25.95 ± 0.014	21.58 ± 0.072	4.36 ± 0.058
200	25.04 ± 0.001	20.58 ± 0.087	4.44 ± 0.085
400	23.92 ± 0.005	19.41 ± 0.015	4.51 ± 0.057
800	23.16 ± 0.081	18.79 ± 0.0138	4.36 ± 0.057
1600	22.18 ± 0.058	17.58 ± 0.016	4.59 ± 0.074

Estos ΔC_T fueron graficados contra el logaritmo de las concentraciones utilizadas (Figura 11), para crear una regresión lineal semi-logarítmica y obtener el valor de la pendiente que debe ser <0.1 para que se dé como validado el experimento. El valor de pendiente obtenida fue de 0.02571 lo cual indica que el experimento es validado, demostrando así que las reacciones de amplificación de ZnT1 y β -actina tienen la misma eficiencia en la PCR.

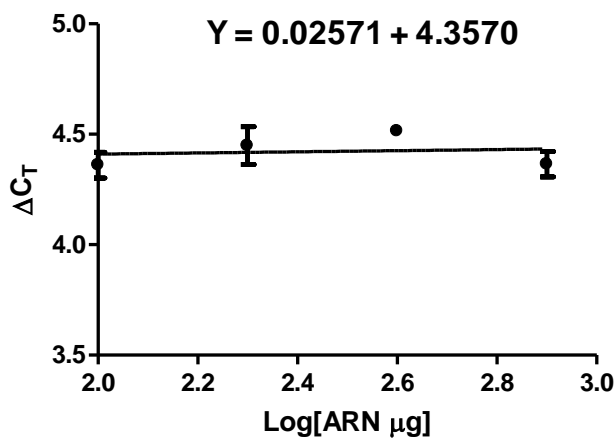


Figura 11. Gráfico de validación de ΔC_T contra log de concentración de ARN