



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS CLÍNICOS



LABORATORIO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO CLÍNICAS

Tesis

Relación entre el zinc y la inflamación crónica generada por el
síndrome metabólico en ratas alimentadas con una dieta
hipercalórica

Para obtener el título de:

LICENCIADA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta:

p.QBF Daniela López Castellanos

Directora de tesis:

Dra. Violeta Aburto Luna

PUEBLA, PUE.

Enero 2020

Contenido

1	Índice de figuras y tablas.....	4
2	Resumen.....	9
3	Marco teórico.....	10
3.1	Síndrome metabólico.....	10
3.2	Zinc.....	14
3.3	Hígado y zinc.....	22
4	Definición del problema.....	24
5	Justificación.....	25
6	Hipótesis.....	26
6.1	Hipótesis Alternativa.....	26
6.2	Hipótesis Nula.....	26
7	Objetivos.....	26
7.1	Objetivo General.....	26
7.2	Objetivos específicos.....	26
8	Diseño de la investigación.....	27
8.1	Tipo de estudio.....	27
8.2	Tipo de muestreo.....	27
8.3	Universo del trabajo.....	27
8.4	Muestra.....	27
8.5	Criterios de selección.....	27
8.6	Variables.....	27
9	Esquema de trabajo.....	28
10	Metodología.....	29

10.1	Establecimiento del modelo y obtención de muestras.....	29
10.2	Parámetros metabólicos.....	30
10.3	Determinación de citocinas	30
10.4	Cuantificación de zinc en hígado, suero y orina.....	31
10.5	Tinciones de zinquina y ditizona	31
10.6	Inmunohistoquímica	32
10.7	Análisis de datos	33
10.8	Implicaciones éticas	33
11	Resultados.....	34
11.1	Establecimiento del modelo de Síndrome metabólico.....	34
11.2	Determinación de citocinas a nivel sérico y hepático	36
11.3	Cuantificación de zinc hepático, sérico y urinario.....	38
11.4	Distribución intracelular de zinc.....	40
11.5	Expresión proteica de los transportadores Zip14 y ZnT1	42
12	Discusión de resultados.....	44
13	Conclusión.....	47
12	Mecanismo propuesto	48
	48
	48
13	Perspectivas	49
14	Bibliografía.....	50
15	Anexos.....	57

1 Índice de figuras y tablas

Tabla 1 Factores para definir síndrome metabólico por diversas instituciones.....	10
Figura 1 Distribución de zinc en diversos órganos.....	14
Figura 2 Localización intracelular de los diferentes transportadores de zinc.....	15
Figura 3 Predicción de las estructuras de los transportadores de ZnT.....	16
Tabla 2 Localización de los distintos transportadores de zinc de la familia ZnT.....	16
Figura 4 Predicción de las estructuras de los transportadores de Zip.....	19
Tabla 3 Ubicación de los distintos transportadores de zinc de la familia Zip.....	19
Figura 5 Representación gráfica de una jaula metabólica para la obtención de orina.....	28
Tabla 4 Parámetros zoométricos.....	33
Figura 6 Establecimiento del modelo de Síndrome metabólico.....	34
Figura 7 Concentración de citocinas en suero de ratas con síndrome metabólico.....	35
Figura 8 Evaluación de la concentración de citocinas en tejido hepático de ratas con síndrome metabólico.....	36
Figura 9 Efecto del síndrome metabólico sobre la concentración de zinc en tejido hepático....	37
Figura 10 Concentración de zinc en suero de ratas con síndrome metabólico.....	37
Figura 11 Evaluación de la concentración de zinc en orina de 24 h de ratas con síndrome metabólico.	39
Figura 12 Efecto del Síndrome metabólico sobre el Zn ²⁺ total en tejido hepático.....	40
Figura 13 Análisis densitométrico por campo del Zn ²⁺ total en tejido hepático, teñido con ditizona.....	40
Figura 14 Efecto del Síndrome metabólico sobre el Zn ²⁺ libre en tejido hepático.....	41
Figura 15 Análisis densitométrico por campo de Zn ²⁺ libre en tejido hepático, teñido con Zinquina.....	41
Figura 16 Localización hepática de Zip14.....	42

Figura 17 Análisis densitométrico por campo de la expresión de Zip14 en ratas con síndrome metabólico.....	42
Figura 18 Localización hepática de ZnT1 en ratas con síndrome metabólico.....	43
Figura 19 Análisis densitométrico de la expresión de ZnT1.....	43
Figura 20 Esquema de los cambios homeostáticos y de concentración de zinc en hígado, orina y suero durante el síndrome metabólico.....	48
Tabla 4 Concentración calórica en cada dieta.....	57
Tabla 5 Concentraciones de Zn en las dietas seleccionadas.....	57



Puebla, Pue. a 26 de Marzo de 2019

**C. LÓPEZ CASTELLANOS DANIELA
P R E S E N T E**

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Area de Análisis Clínicos,

DRA. VIOLETA ABURTO LUNA, Director de Tesis,

se le comunica la autorización de su anteproyecto de tesis denominado:

Relación entre el zinc y la inflamación crónica generada por el síndrome metabólico en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales a los que haya lugar

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

**DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
D I R E C T O R**



Facultad de Ciencias Químicas | San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06



BUAP Puebla, Pue. a 27 de Marzo de 2019

DR. SAMUEL TREVIÑO MORA
DR. EDUARDO M. BRAMBILA COLOMBRES
MC. JOSE ANGEL FRANCISCO FLORES HERNANDEZ

[Handwritten signatures in blue ink]

Con toda atención comunico a Uds. que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora de Tesis que presenta el (la) Pasante de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO

LÓPEZ CASTELLANOS DANIELA

cuyo título es :

Relación entre el zinc y la inflamación crónica generada por el síndrome metabólico en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica

Realizada en el Area de Análisis Clínicos;

asimismo, les ruego que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ

DIRECTOR



C.c.p. Archivo

Facultad de Ciencias Químicas | San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06



Mtra. María Elena Ruíz Velasco
Directora de Administración Escolar
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

En relación al oficio de fecha 10 de Diciembre de 2019, signado por el Coordinador del Departamento de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias Químicas, me permito comunicar a usted el nombre de los catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de Químico Farmacobiólogo que sustentará:

CASTELLANOS LÓPEZ DANIELA

JURADO

D.C. SAMUEL TREVIÑO MORA

M.C. JOSÉ ÁNGEL FLORES HERNÁNDEZ

D.C. EDUARDO BRAMBILA COLOMBRES

Examen que se realizará el día 14 de Enero de 2020, a las 16:00 horas en el Salón de Usos Múltiples del Edificio FCQ9. Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideración.

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., a 10 de diciembre de 2019

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas



Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390

2 Resumen

El síndrome metabólico es un conjunto de anormalidades metabólicas consideradas como factor de riesgo cardiovascular, es considerado como un estado de inflamación crónica de bajo grado como consecuencia de la interacción entre factores genéticos y ambientales; incluyendo a factores como insulinoresistencia, adiposidad visceral, dislipidemia, disfunción endotelial, susceptibilidad genética, presión sanguínea elevada, estado hipercoagulable y estrés crónico; donde el hígado juega un papel fundamental en la regulación de la inflamación crónica generada además de ser uno de los principales órganos almacenadores de zinc. En este padecimiento se ha observado que los niveles de zinc a nivel sérico se encuentran disminuidos, además de una mayor excreción urinaria; también se ha observado que en mujeres obesas existe una disminución en la expresión de Zip14 en tejido adiposo y que este se correlaciona inversamente con glucosa en ayunas, opuesto a esto ZnT1 incrementa su expresión y tiene una correlación positiva con los niveles de glucosa en ayunas. En este trabajo se evaluaron diferentes citocinas a nivel sérico y hepático, se determinaron las concentraciones séricas, urinarias y hepáticas, se observó la distribución intracelular de las fracciones de zinc y se evaluaron los principales transportadores de zinc en membrana, Zip14 y ZnT1 en ratas con síndrome metabólico inducido por una dieta hipercalórica-hiperglúcida. Con la dieta administrada por 12 semanas, se logró establecer el síndrome metabólico sin embargo a este tiempo no se observó inflamación crónica sistémica de bajo grado, aunque si se encontró presente en el tejido hepático. Las concentraciones séricas incrementaron respecto al control y las urinarias disminuyeron, en hígado no se presentaron cambios, sin embargo, las fracciones débilmente unida y compartimentada se vieron disminuidas, lo cual se ve influenciado por la expresión de los transportadores evaluado, donde Zip14 y ZnT1 disminuyeron. Con los resultados obtenidos se puede denotar que el síndrome metabólico a esta etapa, permite una mayor reabsorción de Zn a nivel renal para ser reintroducido a la circulación, el zinc intracelular hepático se encuentra disminuido, esto es debido a la baja expresión del importador del metal Zip14, lo que trae como consecuencia una disminución de la expresión del exportador ZnT1. además de que solo genera inflamación crónica a nivel local.

3 Marco teórico

3.1 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de anormalidades metabólicas consideradas como factor de riesgo cardiovascular; según la Federación Internacional de Diabetes (IDF) en el 2006 para definir que una persona presenta esta patología debe tener obesidad central asociada a valores étnicos específicos, además de 2 de 4 de los siguientes factores: Triglicéridos aumentados, colesterol HDL disminuido, presión arterial elevada o glucosa plasmática en ayuno elevada. (Tabla 1) Este síndrome es considerado como un importante problema de salud pública, ya que está asociado con un incremento de 5 veces en la prevalencia de diabetes tipo 2 y de 2 a 3 veces en la enfermedad cardiovascular; (Molina de Salazar & Muñoz-Gómez., 2018) además, la prevalencia y fisiopatología del SM ha sido atribuida a un sobreconsumo de alimentos hipercalóricos, un estilo de vida sedentario y una rápida urbanización. (Ahima., 2016; Welty., 2016)

3.1.1 Fisiopatología

El SM es considerado como un estado de inflamación crónica de bajo grado como consecuencia de la interacción entre factores genéticos y ambientales; incluyendo a factores como insulinoresistencia, adiposidad visceral, dislipidemia, disfunción endotelial, susceptibilidad genética, presión sanguínea elevada, estado hipercoagulable y estrés crónico. (Kaur.,2014)

3.1.1.1 Obesidad

Debido a la estrecha relación entre la obesidad abdominal e insulinoresistencia, se considera a la obesidad como uno de los componentes principales del SM y el factor de riesgo más importante que llevaría a desencadenar las demás anormalidades metabólicas. (Molina de Salazar & Muñoz-Gómez., 2018) La obesidad es definida como un exceso de peso corporal para una altura determinada, lo cual se debe a un desbalance entre la ingesta energética y el gasto energético y de la interacción entre el estilo de vida, el ambiente y la susceptibilidad genética. (Gadde et al., 2018)

Cuando la ingesta calórica excede la demanda metabólica, el exceso de lípidos, principalmente triglicéridos, es almacenado en adipocitos, hígado, músculo esquelético y otros tejidos o compartimentos como el subcutáneo. El tejido adiposo subcutáneo contiene en su mayoría adipocitos tipo blanco, el cual en condiciones fisiológicas es capaz de almacenar el exceso de

Tabla 6 **Factores para definir síndrome metabólico por diversas instituciones.** Tomado y modificado de Lizarzaburu, 2013. National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (ATPIII), Organización mundial de la salud (OMS), American Association of Clinical Endocrinologist (AACE), International Diabetes Federation (IDF), Asociación Americana de Diabetes (ALAD)

	ATPIII	OMS	AACE	IDF	ALAD
Triglicéridos elevados ≥150 mg/dL (1.7 mmol/L)	X	X	X	X	X
Colesterol HDL reducido <40 mg/dL (1.03 mmol/L) en hombres <50 mg/dL (1.29 mmol/L) en mujeres	X	X	X	X	X
Presión sanguínea elevada Sistólica ≥130 o diastólica ≥85 mmHg	X	X	X	X	X
Insulino resistencia (IR)		X			
Glucosa plasmática en ayuno elevada ≥ 100 mg/dL (5.6 mmol/L).	X		X	X	X
Obesidad central América central y Sudamérica: Hombres: ≥90 cm Mujeres: ≥ 80 cm	x			x	X
Glucosa después de TOG a las 2 h			X		
Índice de masa corporal ➤ 30 kg/m ²		X	X		
Microalbuminuria		X			
Factores de riesgo y diagnóstico	3 más IR	Más de 2	IR + criterio clínico	Obesidad abdominal	Obesidad abdominal + 2 de los 4 restantes

energía en forma de triglicéridos para después realizar lipólisis y liberar ácidos grasos libres en la circulación para su uso como energía (Welty et al.,2015; Heymsfield & Wadden., 2017); sin embargo en pacientes obesos existe hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos debido a la sobrecarga de almacenamiento de triglicéridos, lo que ocasiona estrés oxidativo, estrés en el

retículo endoplásmico y reclutamiento de células inflamatorias como macrófagos M1, linfocitos, neutrófilos, que en conjunto con los adipocitos producen citocinas y quimiocinas; además la expansión masiva y la falta de suministro sanguíneo provocan la muerte de adipocitos y consecuentemente el reclutamiento de macrófagos M1, citocinas como IL-6, TNF- α ; este último activa cinasas intracelulares, I κ B (IKK) y c-Jun N-terminal (JNK), que promueven la fosforilación de serina del sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) en lugar de la fosforilación normal en tirosina, lo cual provoca el decremento de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) que a su vez inhibe a la proteínacina B (Akt2), la cual, en condiciones fisiológicas, promueve la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4); siendo este el principal mecanismo que relaciona a la obesidad e insulinoresistencia (Hernández-Díaz et al., 2015; Catrysse & Van Loo., 2017; Kaur., 2019; Welty et al., 2015)

3.1.1.2 Resistencia a insulina

La resistencia a insulina (RI) es definida como una condición fisiopatológica en donde una concentración normal de insulina no produce una adecuada respuesta en tejidos periféricos como tejido adiposo, músculo e hígado y bajo esta condición, las células β pancreáticas secretan más insulina para disminuir la hiperglucemia. (Kaur.,2014)

En aspectos moleculares, RI es la consecuencia en la alteración de la señalización de esta hormona, las alteraciones más comunes en RI incluyen un decremento en el número de receptores de insulina y de su actividad catalítica, un incremento en el estado de fosforilación Serina/Treonina en el receptor de insulina y del sustrato del receptor de insulina (IRS), un incremento en la actividad de la proteína tirosina fosfatasa, principalmente PTP-1B, que participa en la desfosforilación de IRS y del receptor; también existe un decremento en la actividad de PI3K y de Akt además de una función y expresión defectuosa del transportador de glucosa 4 (GLUT-4). Estas alteraciones reducen la captación de glucosa en tejido muscular y adiposo, promoviendo alteraciones a nivel metabólico. Se ha evidenciado que la RI también es afectada por la respuesta inflamatoria crónica de bajo grado asociada a la obesidad. (Gutiérrez-Rodelo et al.,2017)

3.1.2 Inflamación crónica

La inflamación es un proceso natural, que es necesario para proteger al cuerpo de infecciones y del daño en el tejido, lo que lleva a la resolución de la respuesta inflamatoria y así la

restauración de la homeostasis. Sin embargo, a veces la inflamación no se resuelve y esta inflamación se vuelve crónica lo que provoca pérdida de la función de los tejidos. La inflamación crónica es asociada a la liberación prolongada de mediadores inflamatorios y la activación de vías de transducción nocivas, que contribuyen al envejecimiento y desarrollo de enfermedades, además de ser distinguida por niveles incrementados de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1. (Gammoh & Rink., 2017; Liu et al., 2017)

El SM es caracterizado por un grado bajo de inflamación crónica, que comienza como una inflamación local del tejido que se desarrolla a una inflamación sistémica generando resistencia a la insulina y disfunción metabólica, aunque el mecanismo no ha sido comprendido por completo, pero se conoce que existe un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1, así como el aumento en la infiltración de células inmunes como macrófagos y linfocitos T en tejido insulino dependiente sin alteraciones estructurales o pérdida en sus funciones primarias; Uno de los primeros mecanismos implicados en la inflamación sistémica de bajo grado es la inflamación en el tejido adiposo blanco debido al desbalance entre el consumo y gasto energético, lo cual lleva al tejido adiposo a un proceso de hiperplasia e hipertrofia donde algunos adipocitos localizados en zonas lejanas a los vasos sanguíneos sufren hipoxia y consecuentemente necrosis, tras lo cual son rodeados por células fagocíticas iniciando un proceso inflamatorio de remodelación; paralelamente se lleva un proceso de lipoperoxidación que lleva a un escenario de estrés oxidativo por lo cual se reclutan numerosas células inmunológicas; estos procesos llevan a alteraciones funcionales asociadas a plegamiento incorrecto de proteínas y autofagia desencadenando procesos apoptóticos, teniendo efecto autocrino, paracrino y endocrinamente convergiendo al inicio de la inflamación sistémica de bajo grado; las células inmunológicas como macrófagos expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRR) entre ellos los receptores tipo Toll (TLR), su activación conduce a una cascada de señalización que activa al NF κ B. (Nolan & O’Gorman., 2013; León-Pedroza et al.,2015)

NF κ B es uno de los reguladores más versátiles en la expresión de genes, sin embargo, el Zn juega un papel importante en la actividad de este factor debido a que inhibe la activación de NF- κ B en nivel nuclear del ADN incrementando la expresión del receptor proliferador de peroxisoma activado α (PPAR α), además, el Zn actúa como un inhibidor del nucleótido fosfodiesterasa cíclico (PDE), cuando este se encuentra inhibido, guanosin monofosfato cíclico

(cGMP) se eleva, llevando a la activación de protein cinasa A (PKA) y subsecuentemente a la inhibición de NF-κB. Zn está involucrado en la producción y señalización de diversas citocinas inflamatorias y durante la inflamación crónica las concentraciones plasmáticas de zinc disminuyen debido a que el metal entra a los compartimentos celulares, donde es utilizado para la síntesis de proteínas, neutralización de radicales libres y esta redistribución parece ser mediada por citocinas. La deficiencia de zinc incrementa la producción de citocinas como IL-1β, IL-6 y TNF-α, además IL-6 induce la expresión de metalotioneínas. (Gammoh & Rink., 2017)

3.2 Zinc

El zinc (Zn) es uno de los elementos traza más importante que es requerido para muchos eventos celulares, juega un papel de forma estructural, como cofactor de numerosas enzimas y de factores de transcripción, también actúa como mediador de señalización intracelular, además participa en una gran variedad de procesos metabólicos incluyendo síntesis y degradación de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Zinc existe como catión divalente (Zn^{2+}) y bajo condiciones fisiológicas no tiene actividad redox, esto explica por qué realiza múltiples procesos fisiológicos. (Xiao et al., 2013; Kambe et al., 2015)

El cuerpo humano adulto contiene aproximadamente 2-3 g de Zn y se encuentra distribuido en un 60% en el músculo esquelético, 30% en huesos, 5% en hígado y piel; y el restante en los demás tejidos; en suero sólo se encuentra 0.1% (*Fig. 1*) y de este porcentaje el 80% está unido estrechamente a albúmina y el restante a α2-macroglobulina. En las células hepáticas; el 50% se encuentra en el citoplasma, el núcleo contiene 30-40% y un 10% en la membrana plasmática. El Zn puede estar coordinado con nitrógeno, oxígeno, y átomos de sulfuro. La activación de vías de señalización vía zinc es asociada con funciones patofisiológicas y por lo tanto podría tener un potencial terapéutico, el cual podría ser implementado en la dieta diaria de los pacientes. (Kambe et al., 2015).

Este metal al ser ingerido es liberado de los nutrientes como un ion libre durante la digestión y es absorbido en el intestino delgado por mecanismos mediados por transportadores, siendo el principal Zip4, el cual es localizado en la membrana apical de los enterocitos (Kondaiah et al., 2019); el sistema portal lleva el metal absorbido al hígado, para después ser liberado a la circulación general y así ser redistribuido a los otros tejidos. Para mantener la homeostasis celular y subcelular, se realizan ajustes en la absorción y excreción gastrointestinal, cambios en

la excreción urinaria y una retención de Zn por los tejidos, regulando la entrada, distribución, almacenamiento y eflujo del metal, en donde los transportadores juegan un papel importante. (Roohani et al., 2013, Kambe et al., 2015; King et al., 2016)

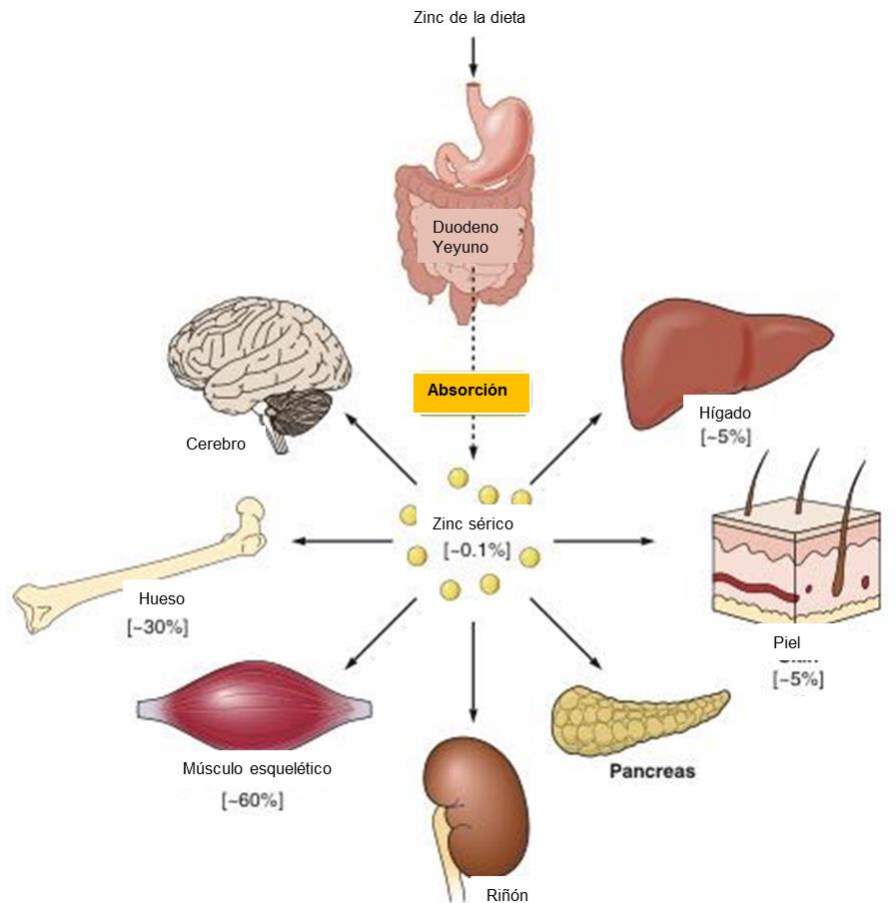


Figura 5 **Distribución de zinc en diversos órganos.** Tomado y modificado de Kambe et al., 2015

En condiciones fisiológicas no hay presencia de zinc libre sino unido lábilmemente a proteínas por lo que su compartimentación y distribución celular es muy importante para mantener la homeostasis a concentraciones celulares y rangos adecuados; todo lo anterior es logrado por una familia de proteínas transportadoras de zinc, que mantienen las concentraciones citosólicas de zinc comprendiendo dos familias siendo la familia de SLC30 o ZnT y la familia de SLC39 o Zip; además de metalotioneínas (Maret., 2011; Norouzi et al., 2017; Bafaro et al., 2017).

3.2.1 Transportadores de zinc

Son clasificados en dos familias: ZnT, que pertenecen a la Familia de proteínas facilitadoras de difusión de cationes y Zip que son proteínas similares a Zrt e Irt. Estos transportadores son

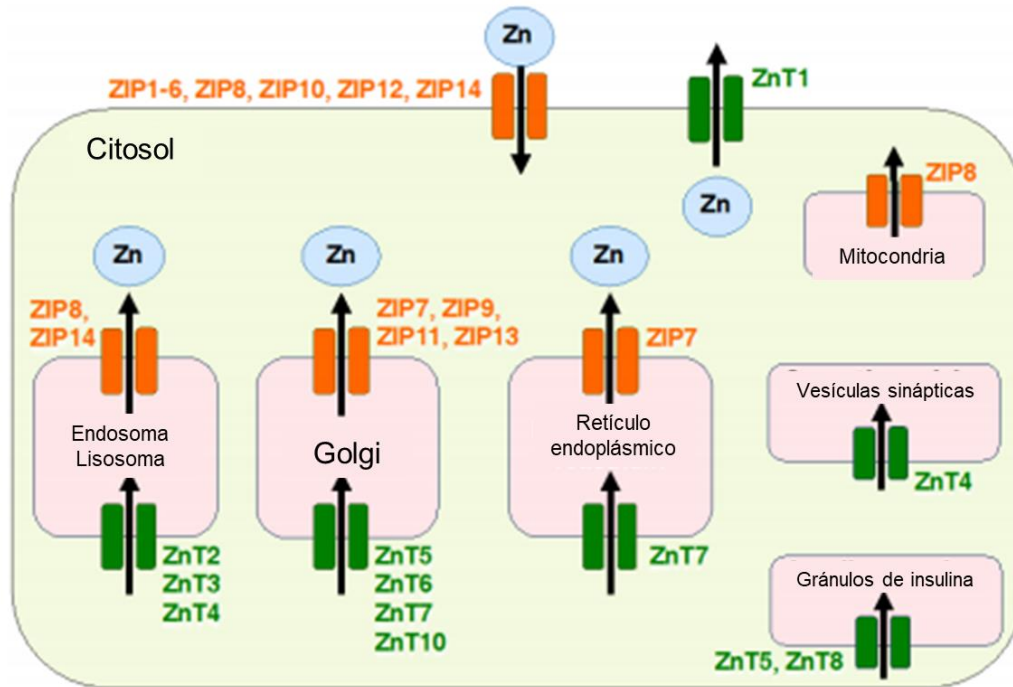


Figura 6 Localización intracelular de los diferentes transportadores de zinc. Tomado y modificado de Takagishi et al., 2017

indispensables para un control adecuado e integrado en el proceso de salida y entrada, secuestro y liberación a través de la membrana biológica (Fig. 2) (Xiao et al., 2013; Kambe et al., 2015).

3.2.1.1 Transportadores ZnT

Se les ha dado el nombre sistemático Slc30a (solute-linked carrier 30) y estos movilizan zinc desde el citosol al espacio extracelular y hacia el lumen de compartimentos intracelulares; la mayoría de estos transportadores operan hacia la parte luminal; y han sido identificados 10 ZnT (ZnT1-10) (Tabla. 2). Los transportadores ZnT de mamíferos son específicos para Zn, a excepción de ZnT10 que moviliza manganeso. La información estructural de estos transportadores fue obtenida del homólogo bacteriano YjiP, donde se sabe que tiene seis dominios transmembranales (DTMs) con el grupo amino terminal y el grupo carboxilo terminal citosólicos y funciona como homodímero; los DTMs I, II, IV y V forman cuatro hélices donde

cuatro residuos hidrofílicos conservados de los DMTs II y V forman un sitio de unión intramembranosa de zinc, también el bucle citoplásmico rico en Histidina entre los DTMs IV y V, es preciso para el transporte de Zn (Fig. 3). La mayoría de los transportadores forman homodímeros a excepción de ZnT5 que tiene una porción amino terminal con nueve DTMs y la porción carboxilo terminal es importante para la dimerización para formar un heterodímero con ZnT6.

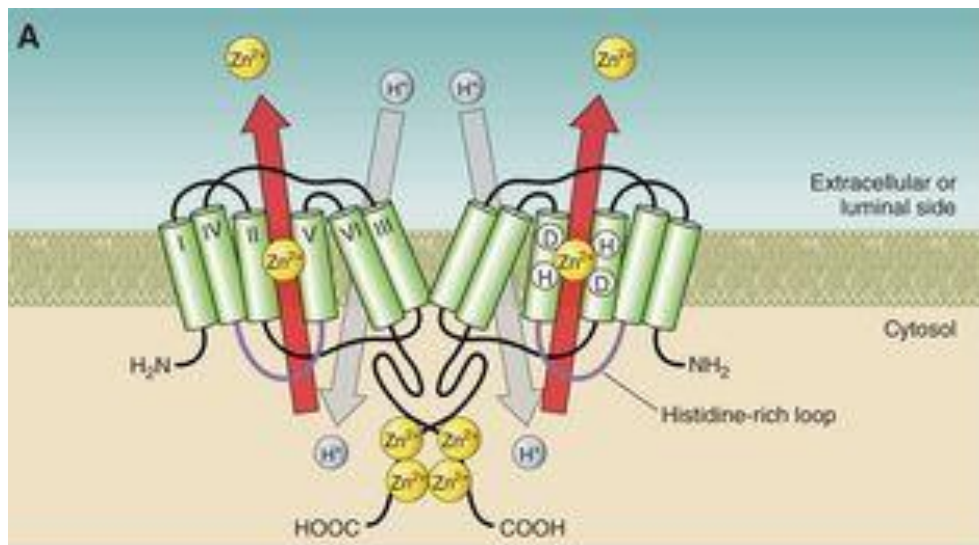


Figura 7 **Predicción de las estructuras de los transportadores de ZnT.** Los transportadores ZnT posiblemente poseen 6 DMTs a excepción de ZnT5. Tomado de Kambe et al., 2015

Por su parte ZnT1 es el único transportador que es expresado ubicuamente en la membrana plasmática y consecuentemente juega un papel importante en la regulación celular de zinc. (Kambe et al.,2015, Norouzi et al.,2017; Bafaro et al., 2017)

El eflujo de Zn ocurre a través de un antiportador Zn²⁺/H⁺ ; esto fue observado en la proteína YiiP purificada donde el flujo de salida de Zn²⁺ hacia el exterior o hacia el interior de compartimentos, es acompañado por la entrada de iones H⁺ , donde la relación de intercambio es 1:1. (Bin et al., 2018)

Tabla 7 **Localización de los distintos transportadores de zinc de la familia ZnT.** Tomado y modificado de Bafaro et al., 2017

Transportador	Ubicación principal de expresión	Localización subcelular
---------------	----------------------------------	-------------------------

ZnT1	Ubicuo	Membrana plasmática
ZnT2	glándulas mamarias, páncreas, próstata, testículos, retina, intestino, riñón	Endosoma, lisosoma, vesícula secretoria, membrana plasmática
ZnT3	Cerebro, páncreas, testículos	Vesículas sinápticas
ZnT4	Glándula mamaria, placenta, próstata, riñón y cerebro	Endosoma, vesículas secretorias, membrana plasmática
ZnT5	Corazón, placenta, próstata, ovario, testículo, intestino, timo, hueso	Aparato de Golgi, vesículas, membrana plasmática
ZnT6	Cerebro, pulmón, intestino	Aparato de Golgi, vesículas
ZnT7	Intestino, estomago, páncreas, próstata, placenta, testículo, retina y músculo	Aparato de Golgi, vesículas
ZnT8	Páncreas, glándula adrenal, tiroides, testículo	Gránulos secretorios
ZnT9	Cerebro, músculo, riñón	Retículo endoplásmico
ZnT10	Cerebro, retina, hígado	Aparato de Golgi, membrana plasmática

3.2.1.1.1 ZnT1

El transportador ZnT1 es el único miembro de la familia SLC30 que funciona como un exportador membranal y permite el transporte de iones de zinc desde el citoplasma al espacio extracelular, además de ser expresado ubicuamente. (Huang & Tepasamordech., 2013) Este transportador es esencial para el desarrollo embrionario debido a que permite el transporte del zinc maternal al ambiente embrionario.

Está regulado transcripcionalmente en respuesta a altos niveles de zinc, a través de la unión del factor de transcripción asociado a metales-1 (MTF-1) a los elementos de respuesta de metal en su región promotora. (Nishito & Kambe., 2019)

3.2.1.2 Transportadores Zip

También conocidos como Slc39a (solute-linked carrier 39), hasta el momento se han identificado 14 transportadores en mamíferos y estos permiten obtener Zn del espacio extracelular y del lumen de compartimentos intracelulares para incrementar las concentraciones citoplasmáticas, la mayoría de estos transportadores están localizados en la membrana plasmática. (Tabla. 3) Estas proteínas han sido agrupadas en cuatro familias de acuerdo a la similitud en sus secuencias, siendo la subfamilia LIV-1, *gufA*, subfamilia I y II. Las subfamilias I, II y *gufA* son están relacionadas filogenéticamente y la subfamilia LIV-1 es principalmente encontrada en mamíferos y es relacionada con el gen regulado por estrógenos LIV-1 (Jeong & Eide., 2013; Bin et al., 2018)

Estos transportadores son sensibles a las concentraciones de Zn, ya que a altas concentraciones se produce una internalización y degradación rápida, pero un decremento del metal permite la localización superficial del transportador. Es sugerido que tienen 8 DTM_s con terminaciones amino y carboxilo extracelular-luminal, contienen un bucle rico en histidinas localizado entre los DTM_s III y IV formando homodímeros para la actividad de transporte (Fig 4.).

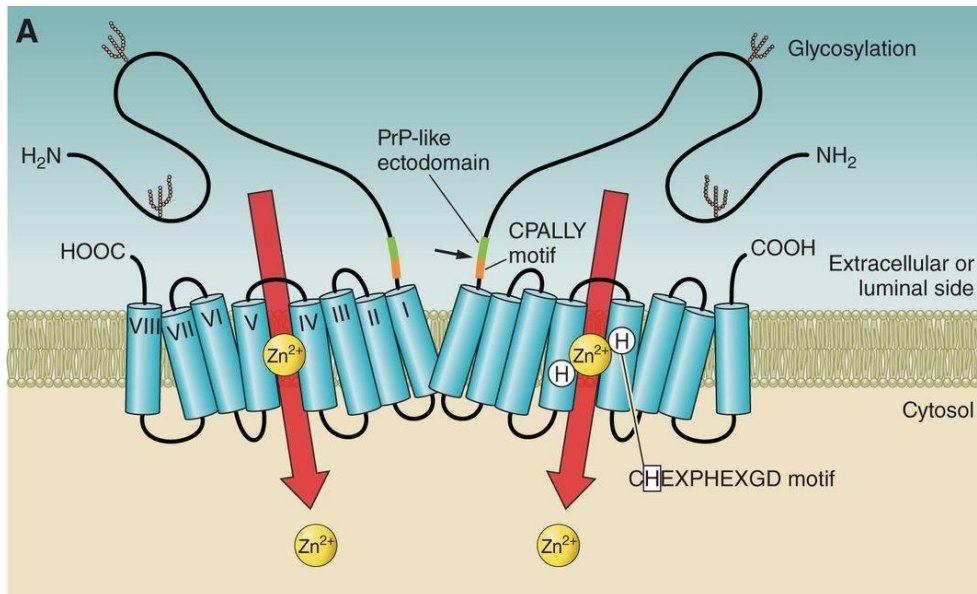


Figura 8 **Predicción de las estructuras de los transportadores de Zip.** Los transportadores Zip posiblemente poseen 8 DMTs. Tomado de Kambe et al., 2015

La especificidad de ciertos transportadores para zinc, no es estricta, ya que Zip8 pueden transportar zinc y manganeso, ZIP13 lo hace con hierro y zinc, y Zip14 transporta hierro, manganeso, cadmio y zinc; sin embargo, el residuo conservado de histidina HEXXH en el DMT V juega un rol importante debido a que posiblemente sea un sitio de unión a zinc intramembranoso (Fig.). (Fukada & Kambe, 2011; Kambe et al., 2015; Takagishi et al., 2017)

El intercambio de zinc por estos transportadores, sugiere un mecanismo simporte entre Zn^{2+}/HCO_3^- pudiendo ser en una relación de dos aniones HCO_3^- a un catión de Zn.

3.2.1.2.1 Zip14

Transportador localizado en la membrana celular de la mayoría de las células y su expresión va a ser regulada a través de la citocina IL-6, estimulado por una respuesta inflamatoria aguda e hipozincemia. (Baltaci et al., 2017)

Tabla 8 **Ubicación de los distintos transportadores de zinc de la familia Zip.** Tomado y modificado de Bafaro et al., 2017; Jeong & Eide., 2013

Transportador	Ubicación principal de expresión	Localización subcelular
---------------	----------------------------------	-------------------------

Zip1	Próstata, intestino delgado, riñón, hígado, células α pancreáticas	Membrana plasmática, vesículas intracelulares, retículo endoplásmico
Zip2	Próstata, útero, ovario, hígado, piel	Membrana plasmática
Zip3	Células mamarias, testículos, células pancreáticas	Membrana plasmática, lisosomas
Zip4	Tracto gastrointestinal, riñón, cerebro, células β pancreáticas	Membrana plasmática, lisosomas
Zip5	Páncreas, riñón, hígado, estómago, intestino, bazo	Membrana plasmática
Zip6	Testículo, células β pancreáticas	Membrana plasmática
Zip7	Intestino, estómago, páncreas, próstata, placenta, testículo, retina y músculo, cerebro, hígado	Retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas intracelulares
Zip8	Eritrocitos, testículos, timo, hígado, pulmón, placenta, páncreas	Membrana plasmática, lisosomas, mitocondria, endosomas
Zip9	Cerebro, músculo, riñón, próstata	Retículo endoplásmico, Aparato de Golgi
Zip10	Cerebro, hígado, riñón, eritrocitos, testículo, células α pancreáticas	Membrana plasmática
Zip11	Glándulas mamarias, testículo, estómago, intestino	Aparato de Golgi
Zip12	Cerebro, pulmón, testículos, retina, endotelio, músculo liso	Desconocido

Zip13	Osteoblastos,	Vesículas intracelulares, aparato de Golgi, retículo endoplásmico
Zip14	Corazón, hígado, placenta, cerebro, pulmón, células α pancreáticas	Membrana plasmática, mitocondria, endosoma, lisosoma

3.2.2 Relación de diversos transportadores de zinc y el síndrome metabólico

Al establecerse la función de los transportadores en el control de la homeostasis del zinc, es importante mencionar que ciertos transportadores se encuentran relacionados con la patología del SM, lo cual se ha evidenciado con estudios previos: Aydemir et al. (2016) demostraron que Zip14 al transportar zinc vía hepática influye en la regulación de la actividad del receptor de insulina, en la captación de glucosa, síntesis de glucógeno y gluconeogénesis. En personas obesas se ha observado un incremento en ZnT1 y Zip1 y una menor expresión en Zip14 en sangre total repercutiendo en la concentración plasmática de zinc y aparentemente el aclaramiento de insulina en el hígado es regulado por ZnT8, una desregulación podría causar una secreción persistente de insulina por parte de las células β pancreáticas, lo cual incrementaría el riesgo de desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. (Olechnowicz et al., 2017; Tamaki et al., 2017; Fukunaka & Fujitani, 2018)

3.3 Hígado y zinc

El hígado es uno de los principales órganos involucrados en el metabolismo de glucosa y lípidos, además de la homeostasis de zinc, el proceso regulatorio depende en su mayoría en un control hormonal mediado por insulina, glucagón y glucocorticoides, donde un descontrol metabólico o un incremento en las citocinas proinflamatorias llevan a una desregularización en el metabolismo de Zn y subsecuentemente una deficiencia de Zn en plasma. Se han observado interacciones cercanas de IL-6 con el transportador Zip14, debido a que lo regula positivamente contribuyendo a la disminución de zinc en plasma durante procesos inflamatorios. (Grüngreiff et al., 2016; Koyama & Brenner., 2017)

Este tejido participa como un intercambiador rápido de zinc y una reducción de sus concentraciones ha sido correlacionado con desregulación en la función y regeneración hepática, debido a que este metal está involucrado en procesos antioxidantes, antiinflamatorios, antiapoptóticos y es necesario para el funcionamiento y síntesis de diferentes enzimas. También, en pacientes sanos se ha observado que el zinc plasmático posprandial y los niveles

de glucosa séricos están correlacionados, sugiriendo que el zinc es tomado por el hígado durante el metabolismo de glucosa posprandial (Aydemir et al., 2016; Stamoulis et al., 2007)

4 Definición del problema

Zinc es un micronutriente esencial involucrado en la señalización intracelular, la desregulación de la concentración de este metal, así como su deficiencia está asociada con el síndrome metabólico que conlleva una inflamación crónica; lo cual repercute en tejidos centrales y periféricos, destacándose el hígado.

El hígado es el principal responsable en regular a este metal, además de ser una fuente de este, es considerado como un intercambiador rápido involucrado en el metabolismo de este y otros metales; además el zinc es necesario para el crecimiento y desarrollo, para la síntesis y función adecuada de proteínas y enzimas en este tejido. (Stamoulis et al., 2007; Grüngreiff et al., 2016)

Este metal forma parte de la regulación del estado inflamatorio crónico a través de la reducción de citocinas inflamatorias; pero durante el síndrome metabólico se ha observado una desregulación en el metabolismo de zinc, asociado a una deficiencia plasmática y se ha demostrado que existen niveles altos de zinc en orina en estos pacientes. (Grüngreiff et al., 2016; Olechnowicz et al., 2018).

Por otra parte, este metal es regulado por diversos transportadores; por lo que su expresión es alterada cuando las concentraciones de zinc son alteradas; además se ha observado que Zip14 está involucrado en la actividad del receptor de insulina y en la regulación de captación de glucosa. (Grzwacz et al., 2015; Aydemir et al., 2016)

Sin embargo, no se han realizado más estudios relacionando a la inflamación crónica, síndrome metabólico, zinc e hígado.

Con base a lo anterior se planteó la siguiente pregunta:

¿Existe alguna relación entre la homeostasis de zinc y la inflamación generada por el síndrome metabólico?

5 Justificación

Unicef menciona en el 2016 que 1 de cada 20 niños menores de 5 años 1 de cada 3 entre los 6 y 19 años padece sobrepeso y obesidad favoreciendo la aparición de enfermedades como diabetes, esto coloca a México en los primeros lugares en obesidad infantil a nivel mundial; además 7 de cada 10 adultos padece sobrepeso u obesidad. Además, México ocupa el 5° lugar en adultos con diabetes

En México el 17.7% de niños menores de cinco años presentan deficiencia de zinc y en comunidades rurales e indígenas llega al 38.5% (UNICEF, 2016). Este metal forma parte de la regulación del estado inflamatorio crónico a través de la reducción de citocinas inflamatorias y el estado de zinc puede ser predictor de desórdenes metabólicos, ya que está asociado con el estrés oxidativo, inflamación y el estado lipídico-glucosa, por otra parte, se ha observado niveles altos de zinc en orina en pacientes con síndrome metabólico (Olechnowicz et al.,2018).

El síndrome metabólico no solo es un problema de salud pública sino también una carga financiera, según el instituto mexicano para la competitividad (2015.) los costos totales generados tan solo por Diabetes mellitus tipo 2 atribuible a sobrepeso y obesidad son de \$82,293,417,979, contemplando a personas de entre 20 y 97 años.

Por tanto, el estudio de la evolución de la patología es importante para su comprensión y desarrollo de estrategias terapéuticas; por ello es vital implementar nuevos modelos donde se estudie el estatus de zinc en hígado asociado al síndrome metabólico generado en ratas con una dieta hipercalórica y su relación con la inflamación crónica.

6 Hipótesis

6.1 Hipótesis Alternativa

Existe relación entre la homeostasis de zinc y la inflamación generada por el síndrome metabólico provocado por la ingesta de una dieta hipercalórica.

6.2 Hipótesis Nula

No existe relación entre la homeostasis de zinc y la inflamación generada por el síndrome metabólico provocado por la ingesta de una dieta hipercalórica.

7 Objetivos

7.1 Objetivo General

Evaluar la inflamación y homeostasis de zinc en ratas con síndrome metabólico generado por una dieta hipercalórica.

7.2 Objetivos específicos

1. Determinar diferentes citocinas a nivel sérico y hepático, asociándolo al síndrome metabólico y homeostasis del zinc.
2. Cuantificar los niveles de zinc hepático, sérico y urinario comparando entre los grupos seleccionados.
3. Examinar la distribución de zinc distinguiendo el contenido intracelular.
4. Identificar la expresión proteica de los transportadores ZnT1 y Zip14 en hígado.

8 Diseño de la investigación

8.1 Tipo de estudio

Exploratorio, experimental, analítico, cuantitativo, prospectivo y de cohorte.

8.2 Tipo de muestreo

Aleatorio simple

8.3 Universo del trabajo

12 ratas de la cepa Wistar, macho con 200 g de peso.

8.4 Muestra

12 ratas de la cepa Wistar.

8.5 Criterios de selección

8.5.1 Criterio de inclusión

Ratas de la cepa Wistar, macho con 200 g de peso; sanas.

8.5.2 Criterios de exclusión

Ratas macho diferentes a la cepa seleccionada o que se encuentren enfermos, también se excluirá a ratones hembra.

8.5.3 Criterios de eliminación

Ratas que presenten alguna enfermedad diferente a la deseada, después de la administración de la dieta.

8.6 Variables

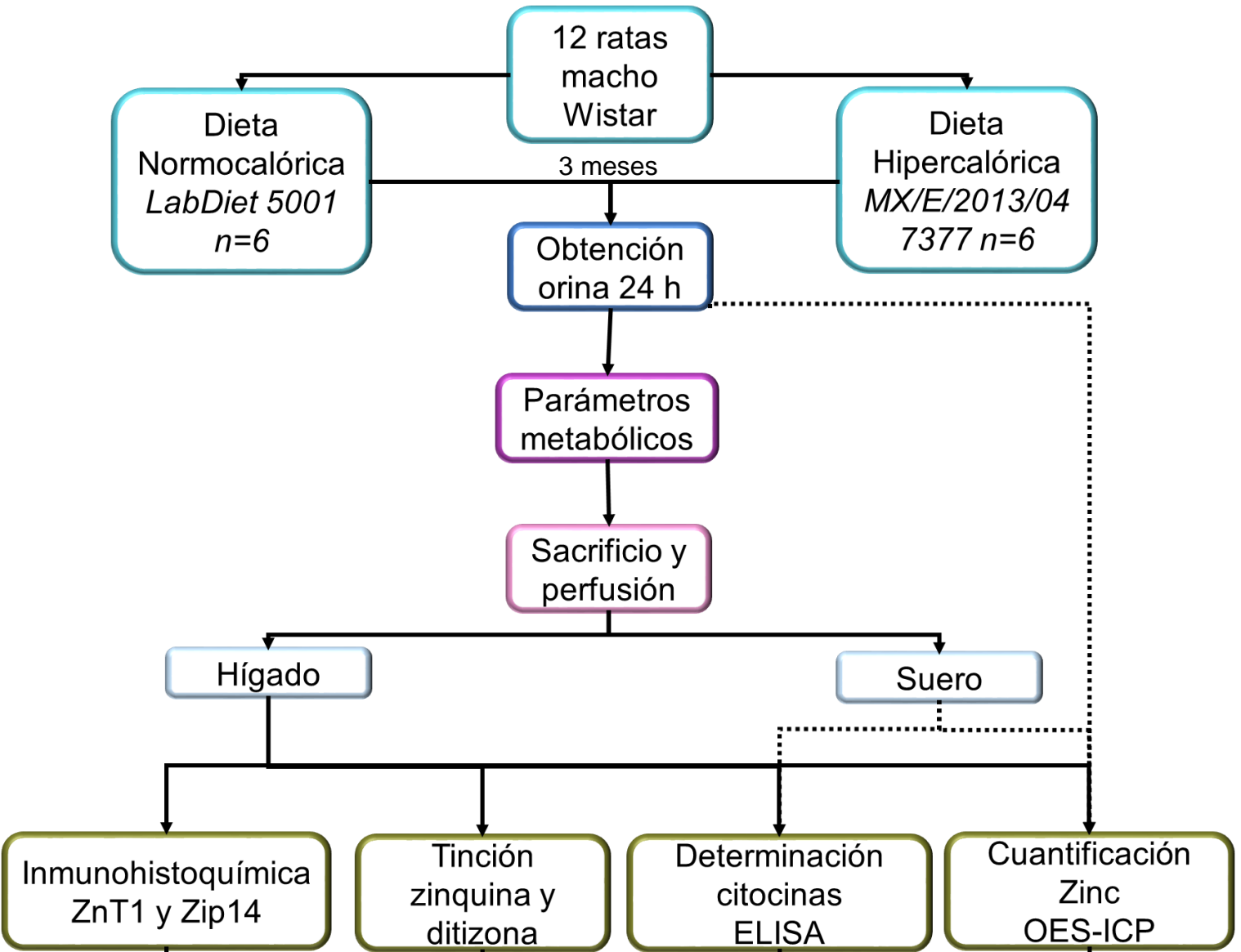
8.6.1 Independientes

Edad y sexo

8.6.2 Dependientes

Concentración de zinc en hígado, orina y suero, distribución de zinc intracelular, abundancia de transportadores de zinc, cantidad de citocinas.

9 Esquema de trabajo



10 Metodología

10.1 Establecimiento del modelo y obtención de muestras

Como modelo animal, se eligieron ratas de la cepa Wistar; estas fueron proporcionadas por el bioterio Claude Bernal; 12 ratas recién destetadas que al alcanzar ~100 g de peso, se dividieron en dos grupos: el grupo Control o con “Dieta normocalórica” ($n=6$) las cuales fueron alimentadas con dieta estándar y agua *ad libitum*; y el grupo problema o con “Dieta hipercalórica-hiperglúcida” ($n=6$) donde la dieta proporcionada se encuentra patentada y ésta permite inducir el síndrome metabólico al objeto de experimentación y agua *ad libitum*.

Estas ratas fueron resguardadas durante 3 meses, en una caja de policarbonato, la cual contenía una cama de aserrín limpio, se mantuvieron a una temperatura y luz controlada con acceso libre a comida y agua; transcurridos los tres meses de dieta, se obtuvieron inicialmente orina de 24 h ocupando una jaula metabólica (Fig. 3), donde las ratas se mantuvieron solo con agua y la orina fue recolectada en contenedores de plástico. Los tejidos se obtuvieron mediante una disección; con el siguiente procedimiento: las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/Kg), se dejó descubierto el corazón para perfundir con solución salina isotónica (8.5 g de NaCl/L) fría tras punción, se cortó la aorta para retirar por completo la sangre contenida en el hígado, este se sumergió inmediatamente en un frasco con solución salina isotónica para remover los remanentes de sangre o pelo de animal; la sangre obtenida se dejó coagular y se centrifugo a 3500 r.p.m por 5 minutos para obtener el suero.



Figura 5 Representación gráfica de una jaula metabólica para la obtención de orina.

Los hígados extraídos fueron almacenados en:

Formalina al 4%, esta solución mantiene preservados y fijados los tejidos para realizar las inclusiones en parafina.

Cortes macroscópicos de hígado guardados en tubos eppendorff y congelados a -70°C , estos se ocuparon para cuantificación de zinc y citocinas.

De los hígados fijados en formalina al 4%, se colocaron en casetes de plástico para empezar con la deshidratación en soluciones de etanol de diferentes concentraciones para eliminar completamente el agua de la muestra, posteriormente se realizó el aclaramiento, este permite que el alcohol presente en los tejidos sea reemplazado por una sustancia miscible con la parafina siendo el xileno, se continuó con la infiltración con el cual se logra impregnar completamente el tejido con parafina, el proceso de deshidratación se realizó en Histokinette., para incluir los tejidos deshidratados en parafina, se fundió a 60°C y se vertió sobre el tejido, estos se dejaron enfriar adecuadamente para finalmente separar el bloque del molde metálico. Se realizaron cortes a $4\ \mu\text{m}$ de grosor.

10.2 Parámetros metabólicos

A los tres meses de la administración de la dieta hipercalórica se realizó la determinación de parámetros metabólicos, de los cuales se incluyeron: se realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa, donde se dio una carga oral de glucosa (75 g en 100 mL/70 Kg) y los niveles se determinaron a partir de muestras de sangre caudal a los 0, 30, 90 minutos después de la carga, esto mismo se realizó para la determinación de insulina; también se determinó colesterol total, triglicéridos, ácidos grasos libres, lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), y lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) en ayunas. Estas pruebas fueron determinadas por la M.C Diana Moroni González en su trabajo de tesis titulado “Evaluación de la función mitocondrial en islotes pancreáticos en ratas con resistencia a insulina inducida por exposición a dietas hipercalóricas y cadmio” de Julio 2019.

10.3 Determinación de citocinas

Se realizó la cuantificación de citocinas en hígado y suero por método de ELISA: de los tejidos congelados se pesaron 210 mg y se homogenizaron con 700 μL de PBS en ambiente frío, se centrifugaron a 15,000 rpm por 10 minutos a 4°C , el sobrenadante se ocupó para la determinación. De los sueros y los sobrenadantes se ocuparon 20 μL de suero y 15 μL de tejido

y a cada uno se le añadió 100 µL de buffer de fosfatos en los pocillos correspondientes, se incubó toda la noche a 4°C y se lavó el contenido, los pocillos fueron bloqueados con albúmina al 2% añadiendo 50 µL y se incubaron por 2 horas a 4°C, se enjuagaron y el Anticuerpo primario para TNF-α (Santa Cruz), IL-10 (Abcam), IL-1β (Santa cruz), IL-6 (Abcam), NFκB (Santa cruz) y TGF-β (Cell signaling Technology) se agregó ocupando una dilución 1:500 en albúmina al 1% agregando 50 µL e incubando por 2 horas a 4°C, se enjuagaron los pocillos y se agregó el Anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano en una dilución 1:1000 en albumina al 1% agregando 50 µL por 2 horas a temperatura ambiente, estos fueron lavados, se colocó 50 µL de TMB por 10 minutos, y finalmente se colocaron 50 µL de ácido sulfúrico para detener la reacción. Cada pocillo se leyó a 450 nm (Multiskan ex Primary EIA).

10.4 Cuantificación de zinc en hígado, suero y orina

Para el tejido hepático se utilizaron 500 mg 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 4 días en un baño seco AccuBlock (Labnet) hasta su completa digestión, posteriormente las muestras fueron diluidas con agua desionizada, en una proporción 1:100. Para la determinación de zinc en suero y orina, se realizó una dilución 1:5 suero-agua desionizada, respectivamente. El zinc presente en las soluciones fue determinado con un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (Varian 730-ES ICP), el cual se calibró con soluciones estándar de ZnCl₂ con concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 ppm; la concentración final del metal se obtuvo mediante la interpolación de la absorbancia de las muestras en la curva de calibración. (Aburto et al., 2016)

10.5 Tinciones de zinquina y ditizona

Los portaobjetos fueron desparafinados a 60°C por 30 minutos y en seguida se colocaron en xilol para desparafinar y comenzar la rehidratación.

En las tinciones de zinquina se realizó una dilución de una solución recién preparada de Etil éster de zinquina en DMSO (5 mM) en PBS a una concentración final de 25 µM y se aplicó a los tejidos contenidos en los portaobjetos durante 30 minutos, después las muestras fueron lavadas tres veces con agua desionizada para remover el exceso de zinquina, se quitó el excedente de agua y finalmente se le adicionó medio de montaje (Vectashield). La fluorescencia

de zinquina se visualizará por microscopia óptica (Olympus BX41) con una longitud de onda de excitación de 351-358 nm y una de emisión a 460 nm. (Franklin et al.,2012)

Para la tinción de ditizona se preparó una solución al 0.01% de ditizona (Sigma) en acetona absoluta y usada como solución stock, esta solución fue diluida con agua libre de zinc a una proporción de 1.5:1. Los portaobjetos fueron expuestos por 15 minutos, seguido a esto se realizaron lavados con agua desionizada, se retiró el exceso de agua y se montaron con miel Karo; finalmente fueron observados con microscopio óptico (LEICA ICC 50 HD). El análisis de las fotomicrografías capturadas se realizó mediante Image J. (Mager et al., 1953)

10.6 Inmunohistoquímica

El tejido hepático extraído se fijó en formalina al 4%, las muestras fueron deshidratadas en soluciones de etanol de diferentes grados y se incluyeron en parafina; después se cortaron secciones de tejido a 4 μm y se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropiltrióxidosilano, posteriormente los portaobjetos fueron desparafinados a 60°C por 30 minutos y enfriados a temperatura ambiente, posteriormente se rehidrataron.

La recuperación antigénica fue realizada con Diva Decloaker (Biocare Medical) de acuerdo con las instrucciones del fabricante se colocaron las laminillas a 60°C por 30 minutos a baño maría, se dejó enfriar durante 15 minutos y después los portaobjetos se sumergieron en una solución al 0.3% de H_2O_2 por 10 minutos para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, posteriormente se lavaron tres veces con PBS (pH 7.4) y se incubaron con una solución al 2% de albumina bovina (Sigma) a temperatura ambiente por 1 h en una cámara húmeda. Los anticuerpos contra Zip14 (Abcam) y ZnT1 (Santa Cruz) fueron diluidos 1:100 y 1:25 respectivamente en una solución al 1% de albumina bovina, los tejidos se incubaron a 4°C por 8 días con el anticuerpo primario en una cámara húmeda; la detección del anticuerpo primario se realizó tras la incubación con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, 1:100, Abcam, Cell signaling technology) en albúmina al 1% por 4 h en cámara húmeda a temperatura ambiente, para ambos transportadores. La deposición de un producto marrón significa la presencia de las proteínas, esta se desarrolla utilizando un tampón DAB Betazoide (Biocare Medical), posterior a este paso se contratiñó con hematoxilina por 3 minutos, se deshidrataron los tejidos y se montaron con resina. El análisis de las fotomicrografías capturadas se realizó mediante un Image J.

10.7 Análisis de datos

Los resultados obtenidos en los grupos se compararon en cada variable de respuesta mediante una prueba “t” de Student, los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Se considerarán diferencias estadísticamente significativas a un nivel de $p < 0.05$.

10.8 Implicaciones éticas

Medidas de seguridad

El manejo de los animales de laboratorio se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

11 Resultados

11.1 Establecimiento del modelo de Síndrome metabólico

Después de los tres meses de haber alimentado a los animales con la dieta hiperglúcida, se evaluaron parámetros zoométricos y clínicos; dentro de los parámetros zoométricos (*Tabla. 4*) para determinar que las ratas tuvieran SM. Se observaron diferencias significativas, existiendo una disminución en peso, largo e IMC en el grupo hipercalórico.

Parámetros	Dieta	
	Normocalórica (NC) <i>LabDiet 5001</i>	Hipercalórica (HC) <i>MX/2013/047377</i>
Peso (g)	395.33 ± 10.26	313.16 ± 5.66***
Circunferencia abdominal (cm)	19.66 ± 0.36	17 ± 0.36
Largo (cm)	23.58 ± 0.15	23.41 ± 0.20***
IMC (g/cm ²)	0.71 ± 0.01	0.60 ± 0.01*

Tabla 4 Parámetros zoométricos. Los datos son expresados como la Media ± EEM de 6 experimentos independientes. Los asteriscos indican la diferencia estadística entre el grupo Normocalórico con respecto al grupo Hipercalórico, (*) $p \leq 0.05$, (***) $p \leq 0.001$; prueba t de Student

Posteriormente se evaluó el comportamiento metabólico donde se evaluaron glucosa en ayunas, insulina en ayunas, índices de resistencia a insulina, ácidos grasos libres, triglicéridos, colesterol total, lipoproteína de alta densidad, lipoproteínas de baja y muy baja densidad. En cuanto al perfil glucémico en las ratas con dieta HC no se observaron cambios en glucosa en ayuno, sin embargo después de la carga oral de glucosa si hubo incrementos significativos de un 26% (30 min), 7% (60 min) y de 52% (90 min); para los niveles de insulina se apreció un incremento del 55% al tiempo 0 respecto al control, posterior a la carga de glucosa el incremento fue de 16%, 32% y 88% al minuto 30, 60 y 90 respectivamente. Estas alteraciones metabólicas se vieron reflejadas en los índices de resistencia a insulina (*Fig. 6C*) donde existió una disminución del 35% y 5% para el índice Matsuda De Fronzo y QUICKI respectivamente, además un incremento en el índice HOMA-IR de un 39%; por otro lado, el perfil lipídico también mostró alteraciones significativas en cada uno de sus componentes, donde triglicéridos incrementó en un 29% (*Fig. 6D*). Con estos datos mostrados se puede confirmar que los sujetos

de experimentación presentan SM, de acuerdo con la NOM-015-SSA2-2010 y comparada con otros modelos de SM mencionado por Wong en 2016.

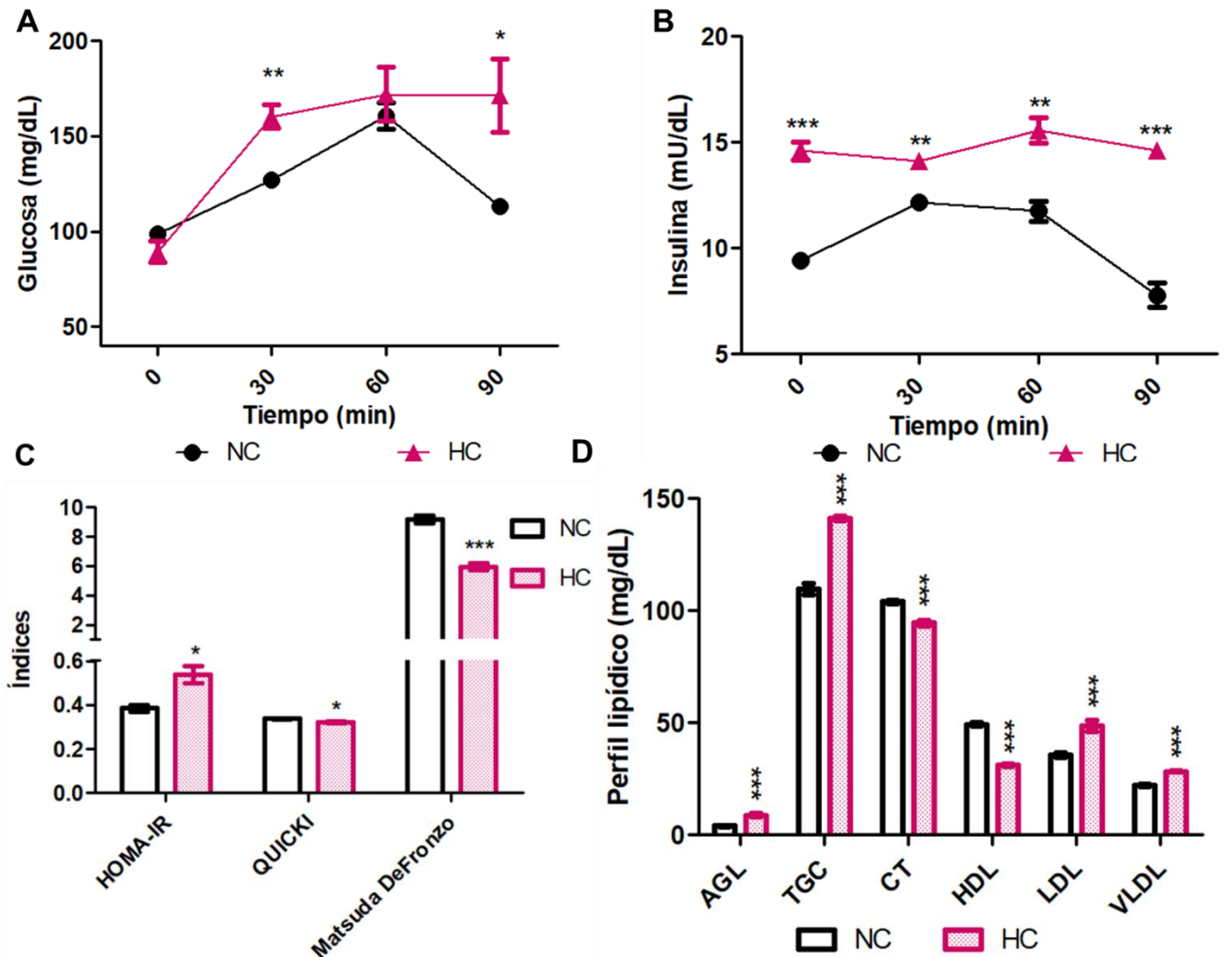


Figura Establecimiento del modelo de Síndrome metabólico. **A)** Tolerancia Oral a la Glucosa (n=3), **B)** Respuesta Insulínica a glucosa (n=3), **C)** Índices de resistencia a insulina (n=3), **D)** Perfil lipídico (n=6). Los datos son expresados como la Media \pm EEM de 3 y 6 experimentos independientes. Los asteriscos indican la diferencia estadística entre el grupo Normocalórico con respecto al grupo Hiperocalórico, (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$; prueba t de Student. AGL (Ácidos grasos libres), TGC (Triglicéridos), CT (Colesterol), HDL (Lipoproteína de alta densidad), LDL (Lipoproteína de baja densidad), VLDL (Lipoproteína de muy baja densidad).

11.2 Determinación de citocinas a nivel sérico y hepático

Citocinas séricas

A nivel sérico se observó una disminución en TNF- α del 23% respecto al control y que IL-6 incremento del 8% , en el resto de las citocinas no se observaron cambios significativos respecto al control. (Fig. 7)

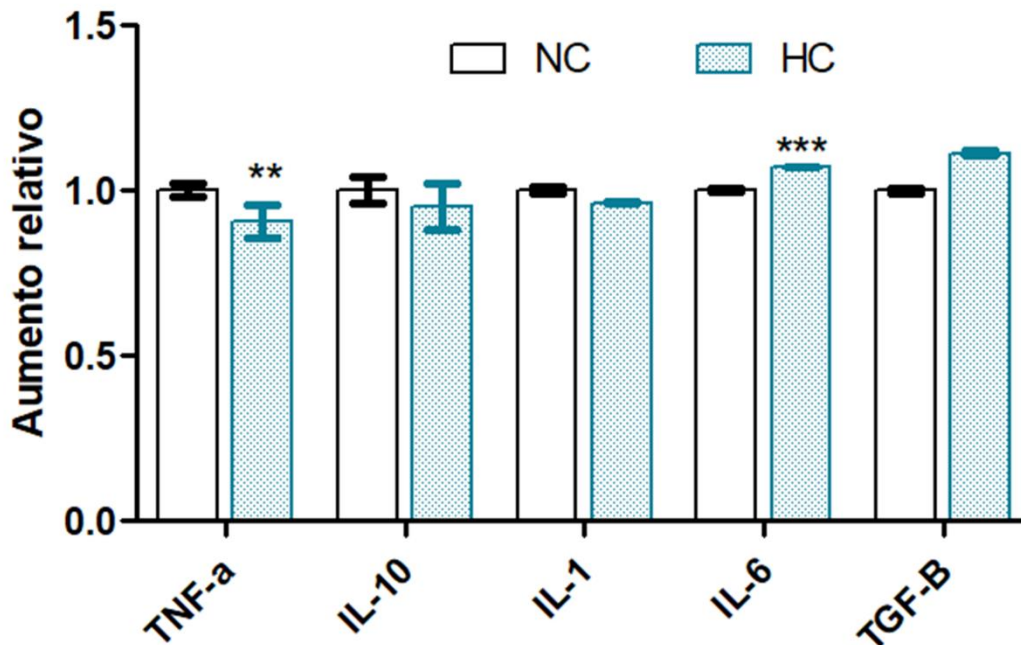


Figura 7 **Concentración de citocinas en suero de ratas con síndrome metabólico.** Las barras representan la Media \pm EEM de 3 experimentos independientes. El asterisco indica la diferencia estadística entre el grupo Normocalórico con respecto al grupo Hipercalórico, (*) $p \leq 0.05$; prueba t de Student. TNF-a (Factor de necrosis tumoral alfa), IL-10 (Interleucina 10), IL-1 (Interleucina 1), IL-6 (Interleucina 6), TGF-B (Factor de crecimiento transformante beta), NF-kB (Factor nuclear kappa).

Citocinas hepáticas

Las citocinas inflamatorias evaluadas en tejido hepático que se elevaron considerablemente respecto al grupo testigo fueron TNF- α , que incrementó en un 24% y TGF- β elevándose un 20% e IL-6 en un 21%; las demás citocinas no tuvieron cambios significativos. (Fig. 8)

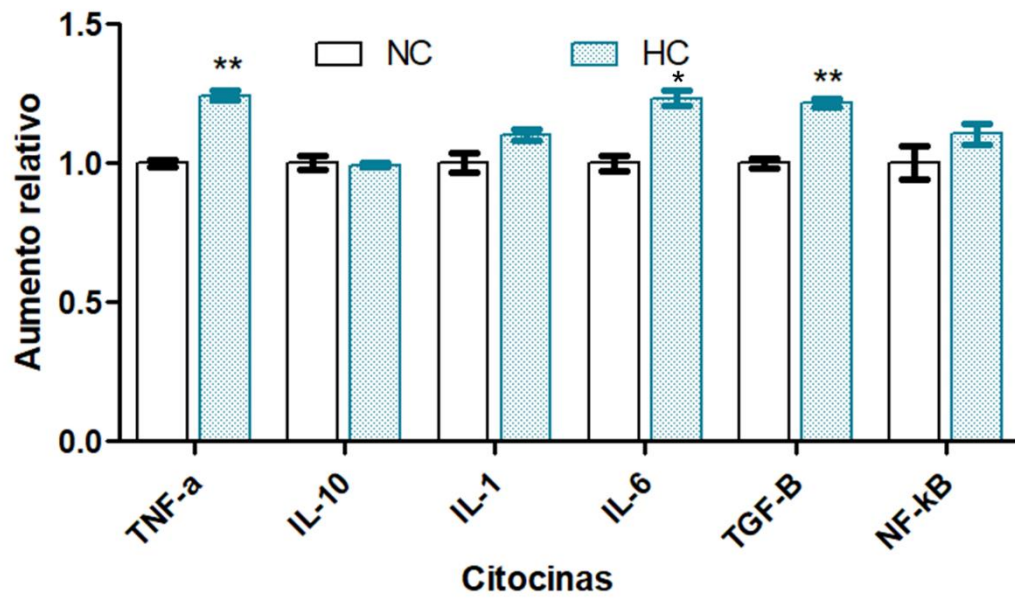


Figura 8 Evaluación de la concentración de citocinas en tejido hepático de ratas con síndrome metabólico. Las barras representan la Media \pm Error Estándar de la Media de 5 experimentos independientes. Los asteriscos indican la diferencia estadística entre el grupo Normocalórico con respecto al grupo Hipercalórico, (*) $p \leq 0.05$; (**) $p \leq 0.01$; prueba t de Student.

11.3 Cuantificación de zinc hepático, sérico y urinario

Zinc total en hígado

Se logró observar que el contenido total de este metal en el tejido hepático no presentó cambios significativamente estadísticos comparado con el grupo control. (Fig. 9)

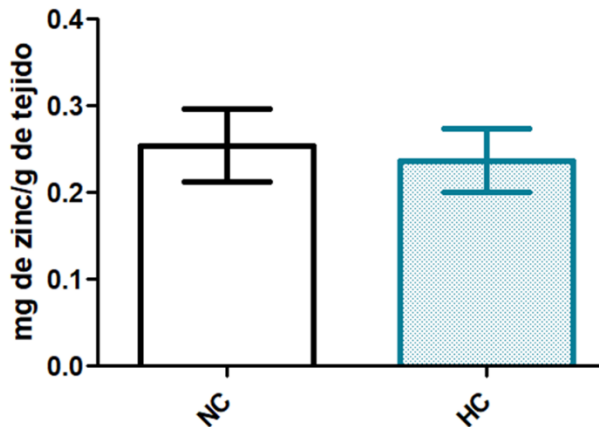


Figura 9 Efecto del síndrome metabólico sobre la concentración de zinc en tejido hepático. La concentración se determinó por espectrometría de emisión óptica acoplado a plasma. Las barras representan la media \pm EEM de 6 experimentos independientes; Prueba t de student, (*) $p \leq 0.05$.

Zinc total en suero

La concentración de este metal incrementó en un 37% respecto al grupo control; esto pone de manifiesto una redistribución de este metal a nivel sistémico. (Fig. 10)

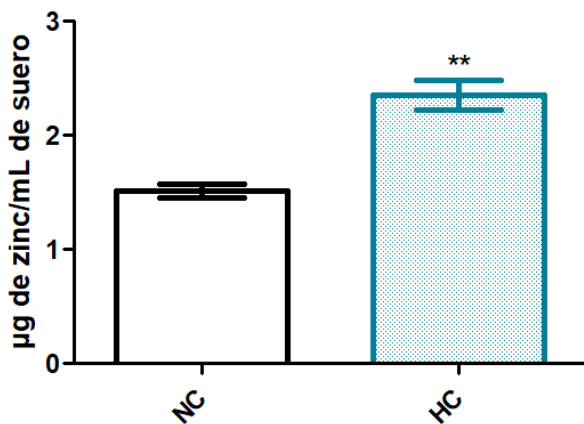


Figura 10 Concentración de zinc en suero de ratas con síndrome metabólico. La concentración se determinó por ICP-OES. Las barras representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes; Prueba t de student. (**) $p \leq 0.01$; Prueba t de student, (*) $p \leq 0.05$.

Zinc total en orina

En cuanto a la concentración total de este metal en orina, existió una disminución significativa en el grupo problema de un 41.4% respecto al grupo control. (Fig. 11)

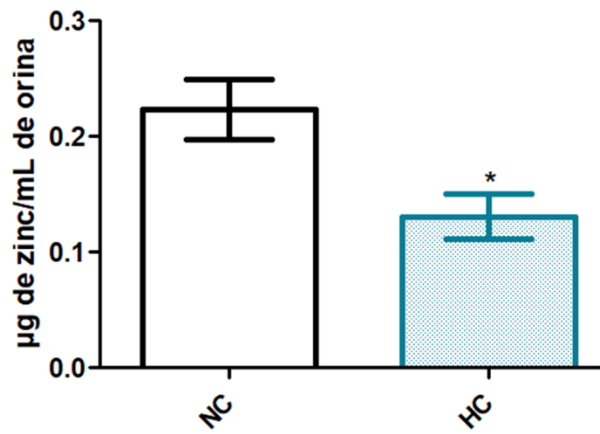


Figura 11 Evaluación de la concentración de zinc en orina de 24 h de ratas con síndrome metabólico. La concentración se determinó por espectrometría de emisión óptica acoplado a plasma; Las barras representan la media \pm EEM de 6 experimentos independientes. Los asteriscos indican la diferencia estadística entre el grupo Normocalórico contra el grupo Hipercalórico, () $p \leq 0.05$; Prueba t de student.*

11.4 Distribución intracelular de zinc

11.4.1 Localización de zinc total

Para determinar el efecto del síndrome metabólico sobre la distribución intracelular de zinc, se realizaron cortes histológicos de 4 μm de grosor y estos fueron teñidos con ditizona; las fotomicrografías (Fig. 12), así como el análisis densitométrico (Fig. 13) muestran una disminución en la distribución total de Zn^{2+} , siendo aproximadamente de 1.06% respecto al control.

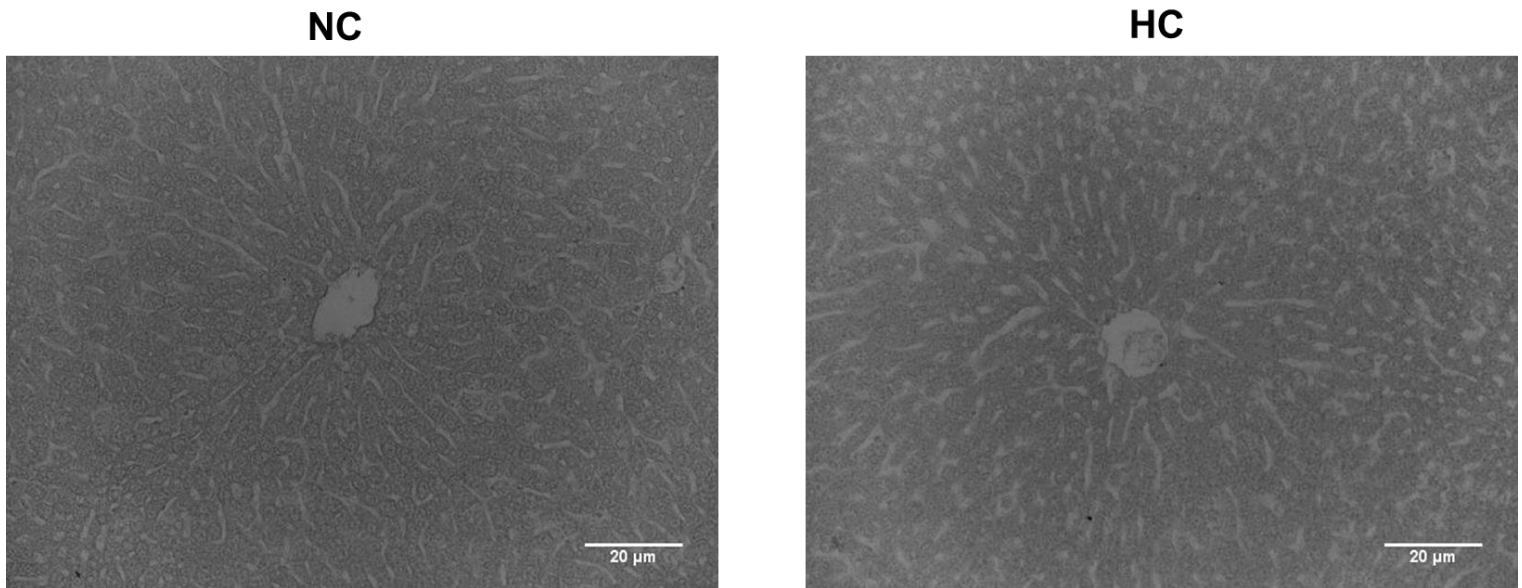


Figura 12 Efecto del Síndrome metabólico sobre el Zn^{2+} total en tejido hepático. Fotomicrografías de tejido hepático (4 μm) teñido con ditizona. Magnificación 20X.

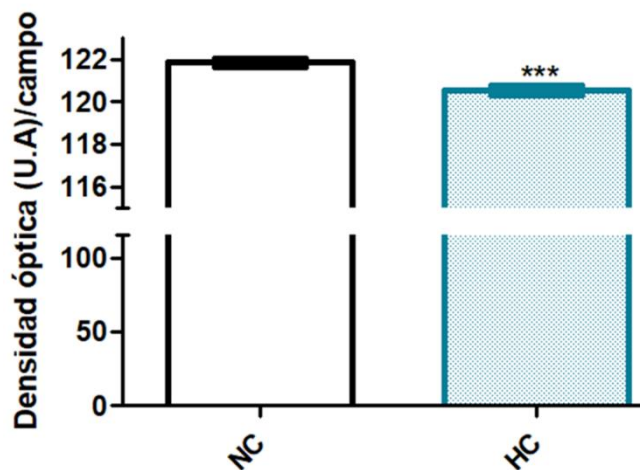


Figura 13 Análisis densitométrico por campo del Zn^{2+} total en tejido hepático, teñido con ditizona. Las barras representan la Media \pm EEM de 90 campos diferentes. Los asteriscos indican la diferencia estadística entre el grupo Normocalórico con respecto al grupo Hipercalórico, (***) $p \leq 0.001$; prueba t de Student.

11.4.2 Localización de zinc libre

Para evaluar la localización del zinc débilmente unido a proteínas se realizaron cortes histológicos y estos fueron teñidos con el fluorocromo zinquina, sensor fluorescente que permite observar la distribución y el tráfico intracelular de Zn^{2+} . Las fotomicrográficas y el análisis densitométrico (Fig. 14 y 15) demuestran una disminución del 24.4% en la distribución intracelular de zinc en el tejido.

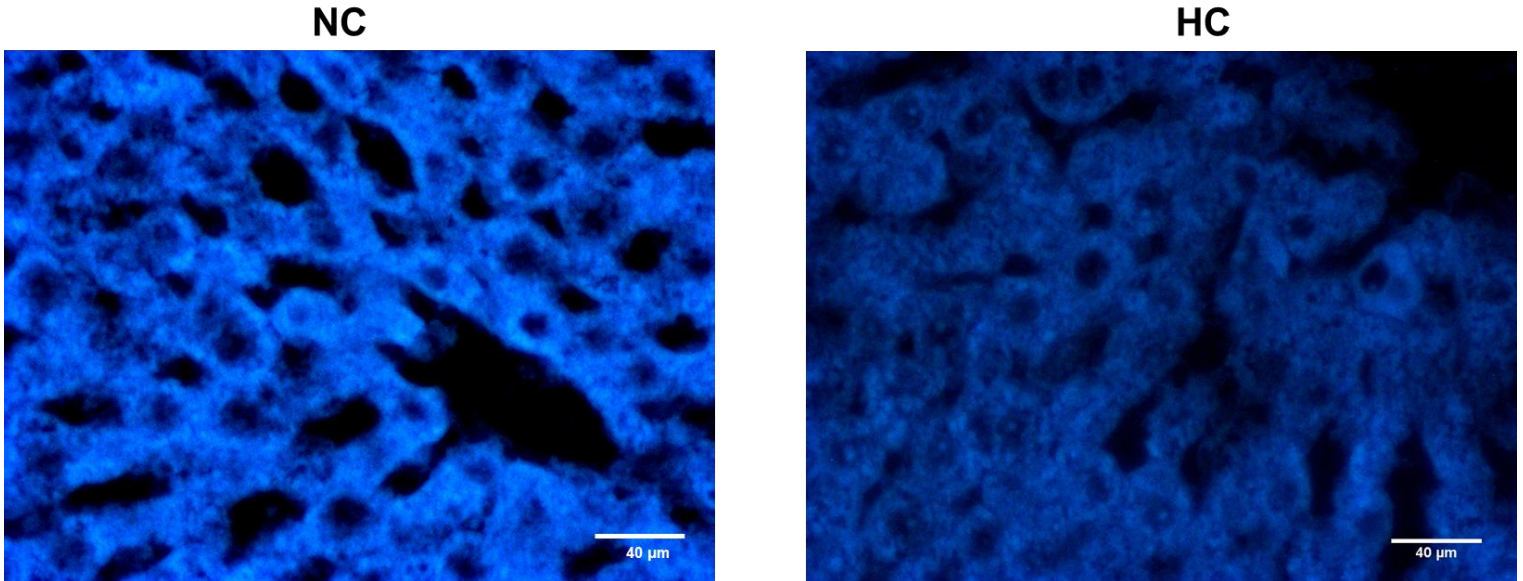


Figura 14 Efecto del Síndrome metabólico sobre el Zn^{2+} libre en tejido hepático. Fotomicrográficas de tejido hepático (4µm) teñido con zinquina. Magnificación 40X.

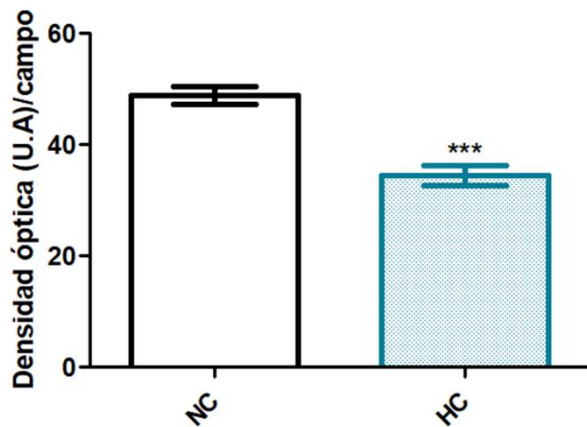


Figura 15 Análisis densitométrico por campo de Zn^{2+} libre en tejido hepático, teñido con Zinquina. Las barras representan la Media \pm EEM de 51 campos diferentes. Los asteriscos indican la diferencia estadística entre el grupo Normocalórico con respecto al grupo Hiperocalórico, (***) $p \leq 0.001$; prueba t de Student.

11.5 Expresión proteica de los transportadores Zip14 y ZnT1

11.5.1 Transportador Zip14

La expresión proteica del importador Zip14 se evaluó a través de estudios de inmunohistoquímica con cortes de tejido hepático, en las imágenes se logra observar un precipitado marrón, el cual evidencia la interacción antígeno-anticuerpo (*Fig. 16.*); se evaluó la densidad óptica y se encontró una disminución del 12% (*Fig. 17*)

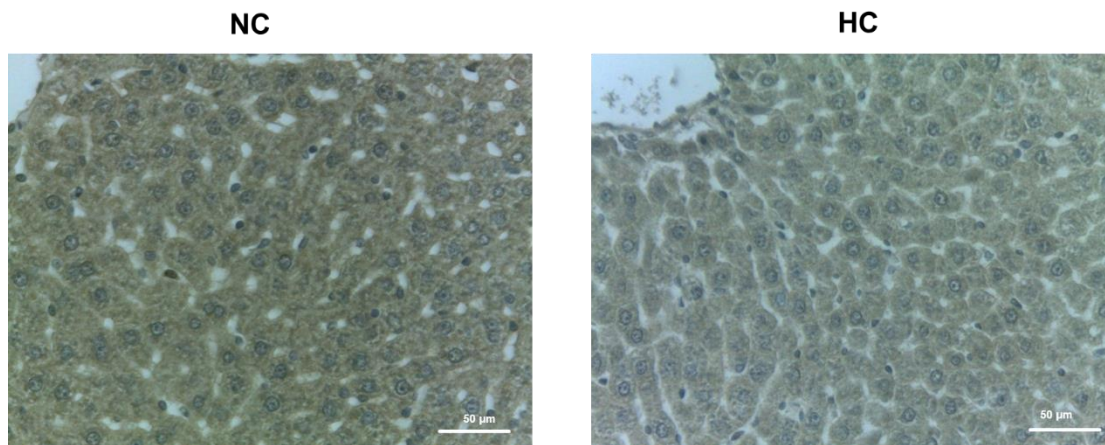


Figura 16 **Localización hepática de Zip14.** Fotomicrografías de tejido hepático (4µm). Magnificación 40X.

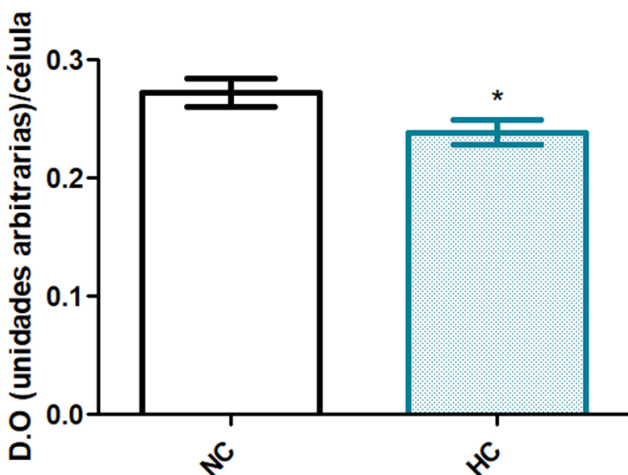


Figura 17 **Análisis densitométrico por campo de la expresión de Zip14 en ratas con síndrome metabólico.** Las barras representan la Media \pm EEM de 130 campos diferentes. Los asteriscos indican la diferencia estadística entre el grupo Normocalórico con respecto al grupo Hipercaleórico, (*) $p \leq 0.05$; prueba t de Student.

11.5.2 Transportador ZnT1

La expresión proteica del importador ZnT1 fue evaluada con la técnica de inmunohistoquímica ocupando cortes histológicos de tejido hepático con un grosor de 4 µm de grosor, en el análisis densitométrico, así como en las imágenes mostradas se observó una disminución significativa en la expresión de este transportador, siendo de un 15%. (*Fig. 18 y 19*)

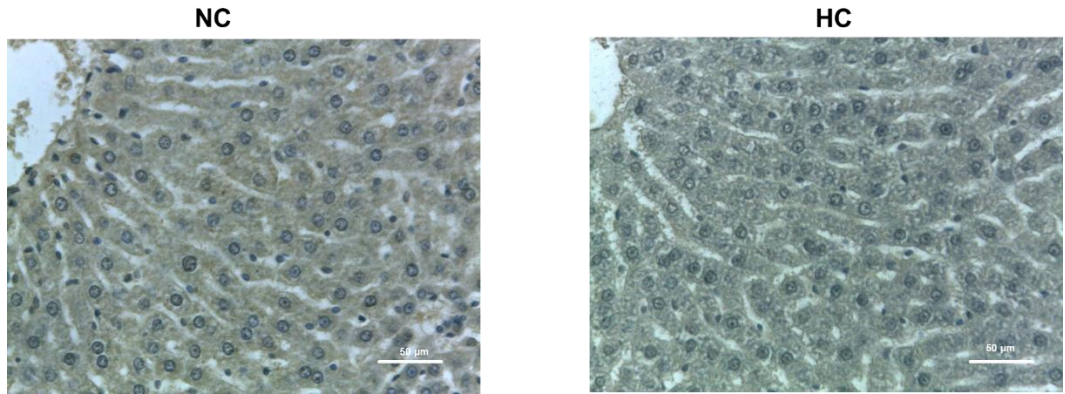


Figura 18 **Localización hepática de ZnT1 en ratas con síndrome metabólico.** Fotomicrografías de tejido hepático (4 μ m) mostrando la inmunoreactividad por ZnT1 (precipitado café). Magnificación 40X.

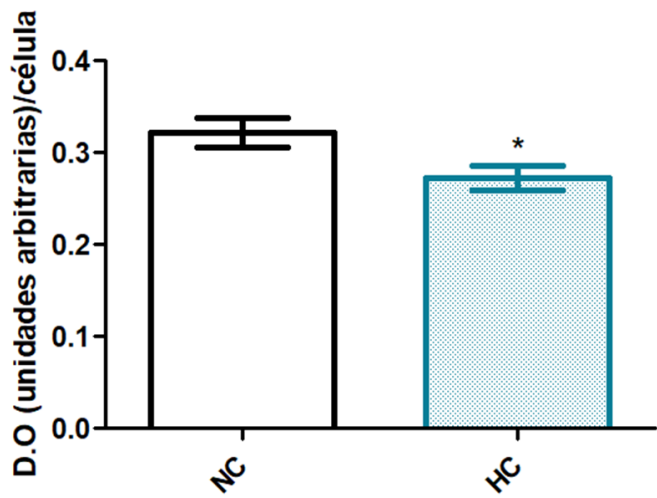


Figura 19 **Análisis densitométrico de la expresión de ZnT1.** Las barras representan la Media \pm EEM de 156 campos diferentes. Los asteriscos indican la diferencia estadística entre el grupo Normocalórico con respecto al grupo Hipercalórico, (***) $p \leq 0.001$; prueba t de Student.

12 Discusión de resultados

El síndrome metabólico se define como una constelación de anormalidades bioquímicas, fisiológicas y antropométricas, que incrementan el riesgo de desarrollar diabetes mellitus y enfermedad cardiovascular (NOM-015-SSA2-2010); que se han logrado mimetizar en modelos animales para su estudio, como previamente se realizó con ratas Wistar (Treviño et al., 2015) y que se lograron reproducido en este estudio, demostrándose que la ingesta de una dieta hipercalórica-hiperglúcida por 3 meses genera SM y que concuerda con la revisión de Wong en el 2016; observamos que nuestro modelo presentaba resistencia a insulina; la cual fue verificada por tres índices diferentes índices, hipertrigliceridemia, niveles bajos de HDL y niveles elevados de LDL y VLDL. Por otra parte, el SM se ha caracterizado por presentar inflamación crónica de bajo grado. (Welty et al, 2016)

En nuestro modelo de estudio, observamos que no había presencia de inflamación crónica sistémica, debido a que las principales citocinas proinflamatorias (IL-6, IL- β) no incrementaron a excepción de IL-6; debido a que el modelo no presenta obesidad, y se ha observado en pacientes humanos que el tejido adiposo es el órgano que inicia la respuesta inflamatoria local y sistémica, debido al proceso hiperplásico e hipertrófico que conlleva estrés oxidativo, y necrosis generando infiltración de células linfocíticas las cuales liberan en conjunto con los adipocitos citocinas inflamatorias, quimioatrayentes y otras moléculas. (León-Pedroza et al., 2015) Al no observar un proceso inflamatorio crónico sistémico, se evaluó la inflamación presente en tejido hepático, que tuvo cambios en IL-6, TNF- α y TGF- β ; este último juega un papel importante en la regulación de muchos aspectos celulares como proliferación celular, diferenciación, producción de matriz extracelular, adhesión y apoptosis celular, se ha observado que al existir anormalidades en la vía de señalización de este factor puede llevar a enfermedades como hipertensión, hiperlipidemia, aterosclerosis, las cuales están asociadas con SM; además este factor participa en el proceso de fibrogénesis inducido por la desregulación de síntesis-degradación de matriz extracelular y por ende su excesiva acumulación, lo cual promueve enfermedades como hígado graso no alcohólico. (Lin et al., 2017; Lambis et al.,2018) Por otra parte, durante procesos inflamatorios crónicos, se ha observado que el tejido hepático sufre infiltración de macrófagos inflamatorios productores de TNF- α , factor que contribuye al desarrollo y progresión del SM al incrementar la

insulinorresistencia a través de la activación de MAPK, mTOR y PKC, conduciendo a un estado de hiperglucemia, consecuentemente a uno de hiperinsulinemia compensatorio. (Srikanthan et al., 2016; León-Pedroza et al., 2015) Estas citocinas elevadas son reguladas indirectamente por Zn al inhibir la activación de NF- κ B (Gammin & Rink., 2017)

Al determinarse las concentraciones de zinc en la orina recolectada de las ratas con SM, se observó una disminución; contrario a lo que se observó en las concentraciones séricas, las cuales incrementaron, lo cual puede asociarse a que el SM inducido se encuentra en una etapa temprana permitiendo una compensación inicial con una mayor reabsorción a nivel renal y la consecuente redistribución sistémica de este metal en diferentes órganos; contrario a lo que sea ha reportado por varios autores como Seo y colaboradores en el 2014 que asociaron que durante el síndrome metabólico existe una disminución de las concentraciones de este metal en suero; además de una mayor excreción urinaria de Zn. A nivel hepático no se apreciaron cambios por lo que se prosiguió a evaluar la distribución intracelular del metal en este órgano. (Gammoh & Rink., 2017; Freitas et al., 2017)

El hígado juega un papel importante en la homeostasis del zinc, este participa como un intercambiador rápido de zinc y una reducción de sus concentraciones ha sido correlacionado con desregulación en la función y regeneración hepática, debido a que este metal está involucrado en procesos antioxidantes, antiinflamatorios, antiapoptóticos y es necesario para el funcionamiento y síntesis de diferentes enzimas. También, en pacientes sanos se ha observado que el zinc plasmático posprandial y los niveles de glucosa séricos están correlacionados, sugiriendo que el zinc es tomado por el hígado durante el metabolismo de glucosa posprandial. (Aydemir et al., 2016; Stamoulis et al., 2007)

En condiciones normales, intracelularmente el zinc se encuentra distribuido en un 50% en el citoplasma, 30-40% en el núcleo y 10% en la membrana y este se encuentra unido a innumerables proteínas y secuestrado en organelos y vesículas, por lo tanto, el zinc débilmente unido llega a encontrarse en concentraciones entre picomolar y nanomolar, (Kambe et al., 2015); con las tinciones de zinquina y ditizona logramos apreciar cambios en la movilización de zinc producidos por el SM; el zinc débilmente unido a proteínas y el total disminuyó en el tejido hepático, repercutiendo en la expresión de los transportadores y en la regulación inflamatoria,

por lo que el Zn disminuido intracelularmente no permite que NFκB sea inhibido permitiendo su traslocación al núcleo y así la transcripción de las citocinas inflamatorias y otras moléculas.

La homeostasis del zinc está estrechamente regulada por un gran número de proteínas, donde los transportadores son parte importante de este proceso; debido a la disminución apreciada en el zinc intracelular del tejido hepático, los transportadores se vieron afectados y tanto como ZnT1 y Zip14 disminuyeron; además esta disminución puede asociarse a que este transportador es regulado positivamente por IL-6 e IL-1β, donde IL-1β se encuentra sin cambios significativos., (Aydemir et al., 2012, Baltaci & Yuce; 2017; Bafaro et al., 2017) Por su parte NFκB ha sido evaluado en la regulación de Zip14 y se demostró que este factor tiene un efecto inhibitorio en la expresión del gen del transportador Zip14 en macrófagos inducidos con LPS. (Sayadi et al., 2013), por lo anterior, NFκB podría estar involucrado en la disminución de la expresión Zip14 Para el caso de ZnT1, su disminución podría estar directamente asociada a las bajas concentraciones de Zn intracelular debido a que es un exportador regulado por el factor de transcripción asociado a metales 1 (MTF-1) el cual es estimulado por iones libres de zinc, ya activo este se transporta al núcleo promoviendo la transcripción de ciertos genes, principalmente ZnT1 y metalotioneínas; lo cual no se realiza debido a la disminución Zn intracelular (Grzywacz et al., 2015) Maxel et al (2017) observaron que en mujeres obesas existe una disminución en la expresión de Zip14 en tejido adiposo y que este se correlaciona inversamente con glucosa en ayunas, opuesto a esto ZnT1 incrementa su expresión y tiene una correlación positiva con los niveles de glucosa en ayunas; sin embargo en nuestro modelo ambos transportadores disminuyeron y esto puede atribuirse al poco tiempo de inducción del SM, que aunque ya presenta cambios en la distribución y regulación de Zn; este metal debería ser evaluado a distintos tiempos de inducción para conocer la evolución de la patología.

13 Conclusión

El síndrome metabólico generado tras haber administrado por 12 semanas una dieta hipercalórica-hiperglúcida, provoca una hiperzinquemia que probablemente es generada por una reabsorción de zinc a nivel renal. Por otro lado, el zinc intracelular hepático se encuentra disminuido, esto es debido a la baja expresión del importador del metal Zip14, lo que trae como consecuencia una disminución de la expresión del exportador ZnT1.

En la etapa analizada del síndrome metabólico no se evidenció inflamación sistémica, pero si una inflamación local a nivel hepático, probablemente generada por la disminución de zinc hepática.

12 Mecanismo propuesto

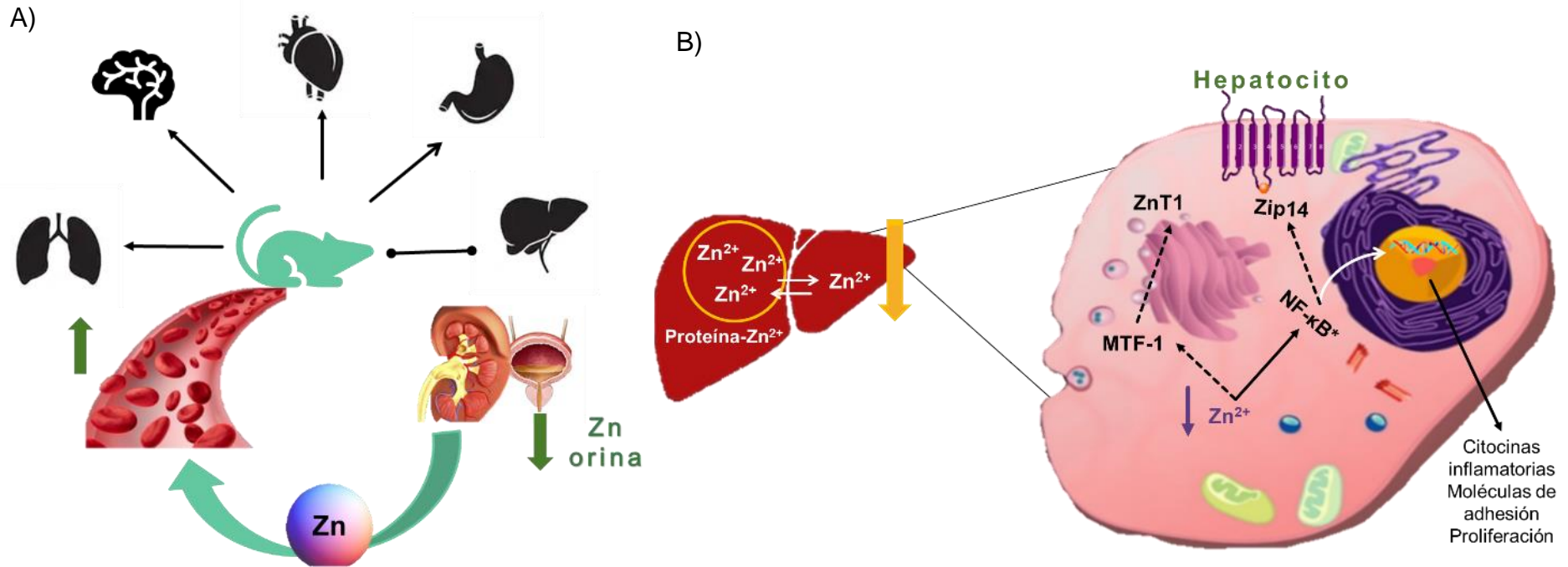


Figura 20 Esquema de los cambios homeostáticos y de concentración de zinc en hígado, orina y suero durante el síndrome metabólico. A) Durante la etapa temprana de esta patología, existe un incremento en la reabsorción del metal en riñón, lo cual permite su reingreso a circulación y su distribución a otros órganos. B) La disminución de las fracciones intracelulares de Zn repercuten en la expresión de los transportadores, debido a que Zn al estar disminuido no permite la activación de MTF-1, disminuyendo la expresión proteica de ZnT1; este mismo decremento de Zn permite que NFκB se active y este disminuya la expresión de Zip14 y a su vez la de citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión y proliferación, etc.

13 Perspectivas

1. Incrementar el número de animales para evaluar la relación entre las citocinas inflamatorias y la concentración de zinc.
2. Evaluar las concentraciones de ARNm de los transportadores y su expresión proteica intracelular.
3. Identificar otros transportadores que estén involucrados en la homeostasis del zinc en tejido hepático durante esta patología.
4. Analizar el papel que tiene el zinc en la regulación de NFκB
5. Establecer el modelo de síndrome metabólico con dieta hipercalórica-hiperglúcida con distintos tiempos de ingesta y comparar entre ellos la homeostasis de zinc.

14 Bibliografía

1. Aburto, V., Treviño, S., Santos, G., Moroni, D., Calva, O., Aguilar, P., . . . Brambila, E. (2016). Hepatic mobilization of zinc after an experimental surgery, and its relationship with inflammatory cytokines release, and expression of metallothionein and Zip14 transporter. *Inflammation Research*, 66(2), 167–175. <https://doi.org/10.1007/s00011-016-1003-5>
2. Ahima, R.S. (2016). *Metabolic Syndrome: A comprehensive Textbook*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11251-0>
3. 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 the innate immune response (endotoxemia). *PloS one*, 7(10), e48679. doi:10.1371/journal.pone.0048679
4. Aydemir, T., Troche, C., Kim, M., & Cousins, R. (2016). Hepatic ZIP14-mediated Zinc Transport Contributes to Endosomal Insulin Receptor Trafficking and Glucose Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 291(46), 23939–23951. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.748632>
5. Bafaro, E., Liu, Y., Xu, Y., & Dempski, R. E. (2017). The emerging role of zinc transporters in cellular homeostasis and cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.29>
6. Baltaci, A. K., & Yuce, K. (2017). Zinc Transporter Proteins. *Neurochemical Research*, 43(3), 517–530. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2454-y>
7. Baltaci, A. K., Yuce, K., & Mogulkoc, R. (2017). Zinc Metabolism and Metallothioneins. *Biological Trace Element Research*, 183(1), 22–31. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1119-7>
8. Bin, B., Seo, J., & Kim, S. T. (2018). Function, Structure, and Transport Aspects of ZIP and ZnT Zinc Transporters in Immune Cells. *Journal of Immunology Research*, 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/9365747>
9. Catrysse, L., & Van Loo, G. (2017). Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF-κB. *Trends in Cell Biology*, 27(6), 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.01.006>

10. Federación Internacional de Diabetes. (2017). *IDF Diabetes Atlas*, Octava edición. <http://fmdiabetes.org/atlas-idf-2017/>
11. Franklin, B., Levy, B., Zou, J., Hanna, N., Desouki, M., Johnson, L., Costello, L. (2012) ZIP14 zinc transporter downregulation and zinc depletion in the development and progression of hepatocellular cancer. *J Gastrointest Cancer.*;43:249–257.
12. Freitas, E. P., Cunha, A. T., Aquino, S. L., Pedrosa, L. F., Lima, S. C., Lima, J. G., ... Sena-Evangelista, K. C. (2017). Zinc Status Biomarkers and Cardiometabolic Risk Factors in Metabolic Syndrome: A Case Control Study. *Nutrients*, 9(2), 175. doi:10.3390/nu9020175
13. Fukada, T., & Kambe, T. (2011). Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics*, 3(7), 662. <https://doi.org/10.1039/c1mt00011j>
14. Fukunaka, A., & Fujitani, Y. (2018). Role of Zinc Homeostasis in the Pathogenesis of Diabetes and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 476. <https://doi.org/10.3390/ijms19020476> (Fukunaka & Fujitani, 2018)
15. Gadde, K. M., Martin, C. K., Berthoud, H., & Heymsfield, S. B. (2018). Obesity. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(1), 69–84. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.011>
16. Gammoh, N. Z., & Rink, L. (2017). Zinc in Infection and Inflammation. *Nutrients*, 9(6), 624. Doi:10.3390/nu9060624
17. Grüngreiff, K., Reinhold, D., & Wedemeyer, H. (2016). The role of zinc in liver cirrhosis. *Annals of Hepatology*, 15(1), 7–16. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/hepato/ah-2016/ah161c.pdf?fbclid=IwAR0vHzH0KjUmY6gDe5hYrGFf6n1fRLKZ3lr8lv4V07Ot5-MyDRbQTD0RepY>
18. Grzywacz, A., Gdula-Argasińska, J., Muszyńska, 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 Biochimica Polonica*, 62(3), 491–498. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1038

19. Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., & Olivares-Reyes, J. (2015). *Molecular Mechanism of Insulin Resistance: An update*. *Gaceta Médica de México*, 153., 197–209. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28474708>
20. Heymsfield, S. B., & Wadden, T. A. (2017). Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *New England Journal of Medicine*, 376(3), 254–266. <https://doi.org/10.1056/nejmra1514009>
21. Huang, L., & Tepasamordech, S. (2013). The SLC30 family of zinc transporters – A review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), 548–560. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.008>
22. IMCO. (2015). *Kilos de más, pesos de menos: los costos de la obesidad*. Recuperado de http://imco.org.mx/wpcontent/uploads/2015/01/20150127_ObesidadEnMexico_DocumentoCompleto.pdf
23. Jeong, J., & Eide, D. J. (2013). The SLC39 family of zinc transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), 612–619. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.011>
24. Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., & Itsumura, N. (2015). The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiological Reviews*, 95(3), 749–784. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2014>
25. Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., & Itsumura, N. (2015). The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiological Reviews*, 95(3), 749–784. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2014>
26. Kaur, J. (2014). A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome, *Cardiology Research and practice*, 2014, 1-21. <https://doi.org/10.1155/2014/943162>
27. King, J. C., Brown, K. H., Gibson, R. S., Krebs, N. F., Lowe, N. M., Siekmann, J. H., & Raiten, D. J. (2016). Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)-Zinc Review. *The Journal of nutrition*, 146(4), 858S–885S. Advance online publication. doi:10.3945/jn.115.220079

28. Kondaiah, P., Yaduvanshi, P. S., Sharp, P. A., & Pullakhandam, R. (2019). *Iron and Zinc Homeostasis and Interactions: Does Enteric Zinc Excretion Cross-Talk with Intestinal Iron Absorption?*. *Nutrients*, 11(8), 1885. doi:10.3390/nu11081885
29. Koyama, Y., & Brenner, D. A. (2017). Liver inflammation and fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 127(1), 55–64. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5199698/>
30. Lambis, Lina, Solana, José Belisário, & Suárez, Amileth. (2018). Expresión de TGF- β como indicio temprano de lesión del tejido hepático en la enfermedad de hígado graso no alcohólico. *Acta Medica Colombiana*, 43(3), 142-149. Retrieved October 16, 2019, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482018000300142&lng=en&tlng=es.
31. León-Pedroza, J. I., González-Tapia, L. A., Del Olmo-Gil, E., Castellanos-Rodríguez, D., Escobedo, G., & González-Chávez, A. (2015). Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cirugía y Cirujanos*, 83(6), 543–551. <https://doi.org/10.1016/j.circir.2015.05.041>
32. Lin, E., Kuo, P., Liu, Y., Yang, A. C., & Tsai, S. (2017). Transforming growth factor- β signaling pathway-associated genes SMAD2 and TGFBR2 are implicated in metabolic syndrome in a Taiwanese population. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14025-4>
33. Liu, C. H., Abrams, N. D., Carrick, D. M., Chander, P., Dwyer, J., Hamlet, M. R. J., . . . Vedamony, M. M. (2017). Biomarkers of chronic inflammation in disease development and prevention: challenges and opportunities. *Nature Immunology*, 18(11), 1175–1180. <https://doi.org/10.1038/ni.3828>
34. MAGER, M., MCNARY, W. F., & LIONETTI, F. (1953). THE HISTOCHEMICAL DETECTION OF ZINC. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1(6), 493–504. <https://doi.org/10.1177/1.6.493>
35. Maxel, T., Svendsen, P. F., Smidt, K., Lauridsen, J. K., Brock, B., Pedersen, S. B., . . . Larsen, A. (2017). Expression Patterns and Correlations with Metabolic Markers of Zinc Transporters ZIP14 and ZNT1 in Obesity and Polycystic Ovary Syndrome. *Frontiers in endocrinology*, 8, 38. doi:10.3389/fendo.2017.00038

36. Miao, X., Sun, W., Fu, Y., Miao, L., & Cai, L. (2013). Zinc homeostasis in the metabolic syndrome and diabetes. *Frontiers of Medicine*, 7(1), 31–52. <https://doi.org/10.1007/s11684-013-0251-9>
37. Molina de Salazar, D. I., & Muñoz-Gómez, D. (2018). Síndrome metabólico en la mujer. *Revista Colombiana de Cardiología*, 25, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2017.12.006>
38. Nishito, Y., & Kambe, T. (2019). Zinc transporter 1 (ZNT1) expression on the cell surface is elaborately controlled by cellular zinc levels. *Journal of Biological Chemistry*, 294(43), 15686–15697. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra119.010227>
39. Nolan J.J., O’Gorman D.J. (2013) Pathophysiology of the Metabolic Syndrome. In: Beck-Nielsen H. (eds) *The Metabolic Syndrome*. Springer, Vienna
40. Norouzi, S., Adulcikas, J., Sohal, S. S., & Myers, S. (2017b). Zinc transporters and insulin resistance: therapeutic implications for type 2 diabetes and metabolic disease. *Journal of Biomedical Science*, 24(1). Recuperado de <https://www.proxydgb.buap.mx:2091/article/10.1186/s12929-017-0394-0#aboutcontent>
41. Olechnowicz, J., Tinkov, A., Skalny, A., & Suliburska, J. (2017). Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. *The Journal of Physiological Sciences*, 68(1), 19–31. <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0571-7>
42. Ranasinghe, P., Pigera, S., Galappatthy, P., Katulanda, P., & Constantine, G. R. (2015). Zinc and diabetes mellitus: understanding molecular mechanisms and clinical implications. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 23(1), 44. doi:10.1186/s40199-015-0127-4
43. Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R., & Schulin, R. (2013). Zinc and its importance for human health: An integrative review. *Journal of Research in Medical Sciences*, 18, 1144–157.
44. Sayadi, A., Nguyen, A., Bard, F. A., & Bard-Chapeau, E. A. (2012). Zip14 expression induced by lipopolysaccharides in macrophages attenuates inflammatory response. *Inflammation Research*, 62(2), 133–143. <https://doi.org/10.1007/s00011-012-0559-y>
45. Secretaria de salud (2017). El portal único del gobierno. | gob.mx. Recuperado 21 octubre, 2019, de <https://failover.www.gob.mx/mantenimiento.html>

46. Seo, J. A., Song, S. W., Han, K., Lee, K. J., & Kim, H. N. (2014). The associations between serum zinc levels and metabolic syndrome in the Korean population: findings from the 2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *PloS one*, 9(8), e105990. doi:10.1371/journal.pone.0105990
47. Srikanthan, K., Feyh, A., Visweshwar, H., Shapiro, J. I., & Sodhi, K. (2016). Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. *International Journal of Medical Sciences*, 13(1), 25–38. <https://doi.org/10.7150/ijms.13800>
48. Stamoulis, I., Kouraklis, G., & Theocharis, S. (2007). Zinc and the Liver: An Active Interaction. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(7), 1595–1612. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9462-0>
49. Takagishi, T., Hara, T., & Fukada, T. (2017). Recent Advances in the Role of SLC39A/ZIP Zinc Transporters In Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2708. <https://doi.org/10.3390/ijms18122708>
50. Tamaki, M., Fujitani, Y., Hara, A., Uchida, T., Tamura, Y., Takeno, K., Kawaguchi, M., Watanabe, T., Ogihara, T., Fukunaka, A., Shimizu, T., Mita, T., Kanazawa, A., Imaizumi, M. O., Abe, T., Kiyonari, H., Hojyo, S., Fukada, T., Kawauchi, T., Nagamatsu, S., Hirano, T., Kawamori, R., ... Watada, H. (2013). The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. *The Journal of clinical investigation*, 123(10), 4513–24.
51. Treviño, S., Aguilar-Alonso, P., Flores Hernandez, J. A., Brambila, E., Guevara, J., Flores, G., .Diaz, A. (2015). A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. *Synapse*, 69(9), 421–433. <https://doi.org/10.1002/syn.21832>
52. UNICEF (2016). Salud y nutrición. Recuperado 21 octubre, 2019, de <https://www.unicef.org/mexico/salud-y-nutrici%C3%B3n>
53. UNICEF México - Centro de prensa - Reducir enfermedades y mejorar nutrición de niños menores de 6, meta de la alianza entre Asociación Internacional de Zinc y UNICEF. (s.f.-b). Recuperado 22 enero, 2019, de https://www.unicef.org/mexico/spanish/noticias_33796.html

54. Wang, S., Liu, G. C., Wintergerst, K. A., & Cai, L. (2016). *Metals in Diabetes. Molecular Nutrition and Diabetes*, 169–182. doi:10.1016/b978-0-12-801585-8.00014-2
55. Welty, F. K., Alfaddagh, A., & Elajami, T. K. (2016). Targeting inflammation in metabolic syndrome. *Translational Research*, 167(1), 257–280. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.06.017>
56. Wong, S. K., Chin, K. Y., Suhaimi, F. H., Fairus, A., & Ima-Nirwana, S. (2016). Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutrition & metabolism*, 13, 65. doi:10.1186/s12986-016-0123-9

15 Anexos

1. Composición calórica de las dietas seleccionadas

Tabla 11 *Concentración calórica en cada dieta*

Composición	Porcentaje calórico (Kcal/g) LabDiet 5001	Porcentaje calórico (Kcal/g) MX/E/2013/047377
Carbohidratos	57.9	77.82
Proteínas	28.507	7.95
Lípidos	13.5	14.22
Fibra (cruda)	5.1	0.0
Ceniza	7.0	0.0
Total	99.99	99.99

2. Concentración de zinc en la dieta determinada por espectrometría de absorción atómica en flama

Dieta	Concentración de Zn
Normocalórica LabDiet 5001	79 mg/kg
Hipecalórica MX/2013/047377	19 mg/kg

Tabla 12 *Concentraciones de Zn en las dietas seleccionadas*