



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

**EFFECTO DEL SÍNDROME METABÓLICO SOBRE LA
HOMEOSTASIS DEL ZINC EN TESTÍCULO DE RATA
WISTAR Y EVALUACIÓN DE TRANSPORTADORES ZNT1 Y
ZIP14**

Para obtener el título de:
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta:
p.QFB Victoria Gijada Celiseo

Lugar de realización:
Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas, Facultad de Ciencias Químicas,
BUAP

Directora de tesis:
D.C. Violeta Aburto Luna
Puebla, Pue 2023





Facultad de Ciencias Químicas BUAP

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.

“Dios es bueno todo el tiempo, y todo el tiempo Dios es bueno”

Dios está en el principio de la reflexión de un creyente y al final de las investigaciones de un científico, George Lemaitre

Mi agradecimiento más profundo a Dios por otorgarme la fortaleza necesaria para superar los obstáculos más difíciles, aun mas los que creí no superar.

En todo trabajo de investigación hay momentos de frustración y de incertidumbre, y es ahí en dónde la perseverancia y la fe, fueron indispensables para la culminación de esta investigación.

Dedicada a la contribución de la ciencia y apertura de un tema más para continuar la indagación hasta la cumbre de la adquisición del entendimiento para la ayuda del desarrollo y bienestar humano.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis DC. Violeta Aburto Luna:

Le agradezco que desde los primeros semestres haya despertado en mi la perspectiva y el razonamiento al procesar la información, agradezco su confianza al brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto, a su paciencia ante los diferentes obstáculos presentados y su apoyo incondicional.

A mi comisión revisora Dr. Eduardo Miguel Brambila Colombres, Mtro. José Ángel Francisco Flores Hernández, Mtra. María Adriana González Flores:

Agradezco su tiempo para realizar la retroalimentación de mi trabajo, a sus comentarios que me ayudaron a ampliar el panorama y visualizarlo de diferente forma, y sobre todo agradezco sus enseñanzas y empatía brindada.

A el Q. Hugo César Cortezano Esteban:

Agradezco que me haya permitido trabajar en su línea de investigación, a la ayuda que me otorgo en cada asesoría, y a su disposición y amabilidad en todo momento.

A todos los maestros que fueron parte de mi desarrollo como Químico Farmacobiólogo, me llevo sus enseñanzas para la vida.

Al maestro Hugo Hernández:

Agradezco las asesorías teóricas y prácticas que me dio, a su amabilidad y paciencia para explicar y su disposición para ser participe en las revisiones de mi trabajo.

A mis amados padres Mayra y Fidel:

Agradezco infinitamente a Dios que me haya dado a mi maravillosa madre, que paso pasito a estado conmigo, me ha fortalecido en los momentos más críticos en mi vida y me ha motivado con su amor y confianza, agradezco tanto a mi grandioso padre, quien me ha ensañado que es la fortaleza y la superación, siempre ha estado ahí para motivarme a luchar por mis sueños y ha sido un gran ejemplo de superación.

A mis segundos padres mamá Vicky y papa Richy:

Agradezco los valores que me inculcaron de pequeña, su paciencia, su amor incondicional, agradezco que siempre estén ahí confiando en mí y apoyándome de lejitos, y sobre todo agradezco que hayan sido pilares esenciales en mi formación.

A mi hermana Amayrani y mi tía Mariela:

Agradezco a mi desenfadada hermana menor que siempre me ha dado su amor y fortaleza para seguir adelante, que desde pequeña me motiva a ser mejor persona, agradezco a mi tía, siempre interesada en mi desarrollo académico, que me hay ayudado a mejorar y a luchar por mi objetivo.

A mi gran amigo, compañero y colega QFB. Emmanuel Rodríguez Muñoz:

Agradezco que a lo largo de la carrera haya estado ahí para apoyarme, que me haya motivado a ser mejor Química día a día, esos largos ratos de estudio, los momentos divertidos, esas pláticas interminables sobre los temas más polémicos de la carrera y a su incondicional ayuda para lograr la culminación de este proyecto

A mi mejor amiga QFB. Maetzi Zempoaltecatl Pérez:

Agradezco todos los momentos compartidos, a su ayuda para ser mejor Química, agradezco su amistad y sobre todo los momentos que me hicieron pasar la universidad más amena, sobre todo agradezco que no se me olvide añadir la fenolftaleína al realizar una titulación.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
1. Marco teórico	13
1.1. Introducción	13
1.2. Zinc	13
1.3. Dinámica del Zinc.....	16
1.3.1. Transportadores de zinc	16
1.3.2. Papel de los transportadores de Zinc en el transporte de Cadmio.....	21
1.4. Zinc y testículo.....	22
1.5. Síndrome metabólico	23
1.6. Síndrome metabólico y Zinc	25
1.7. Testículos, síndrome metabólico y Zinc.....	26
1.7.1. Testículo	26
1.7.2. Espermatogénesis	27
2. Definición del problema	31
3. Pregunta de investigación.....	31
4. Justificación	32
5. Hipótesis	33
6. Objetivos	34
7. Diagrama de trabajo	35
8. Diseño experimental.....	36
9. Metodología	37
9.1. Establecimiento del modelo y obtención de muestras.....	37
9.2. Parámetros metabólicos	37
9.3. Cuantificación de Zinc en testículo.....	38
9.4. Tinción con Hematoxilina Eosina	38
9.5. Tinciones de zinquina y ditizona	39
9.6. Cuantificación de células germinales	40
9.7. Inmunohistoquímica.....	40

9.8.	Análisis de datos	41
9.9.	Implicaciones éticas	41
10.	Resultados	42
10.1.	Establecimiento del modelo de síndrome metabólico	42
10.1.1.	Parámetros zoométricos	42
10.1.2.	Parámetros metabólicos	42
10.1.3.	Cuantificación de zinc testicular	45
10.1.4.	Distribución intracelular de zinc	46
10.1.4.2.	Localización de zinc libre	47
10.1.5.	Evaluación de la expresión de Zip14 mediante inmunohistoquímica	48
10.1.6.	Evaluación de la expresión de ZnT1 mediante inmunohistoquímica	48
10.1.7.	Análisis histológico del túbulo seminífero	51
11.	Discusión	53
12.	Conclusión	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>Cantidades de iones metálicos esenciales presentes en mamíferos.</i>
Figura 2	<i>Distribución del zinc en el cuerpo</i>
Figura 3	<i>Topología de los transportadores ZnT</i>
Figura 4	<i>Topología de los transportadores Zip</i>
Figura 5	<i>Localización subcelular y dirección del transporte de zinc de los transportadores ZnT y ZIP</i>
Figura 6	<i>Descripción general de las células espermatozógenas fácilmente identificables en el epitelio seminífero.</i>
Figura 7	<i>Sección del epitelio germinal en el túbulo seminífero.</i>
Figura 8	<i>Establecimiento del modelo de Síndrome metabólico</i>
Figura 9	<i>Efecto del síndrome metabólico sobre la concentración de zinc en tejido testicular.</i>
Figura 10	<i>Efecto del Síndrome metabólico sobre el Zn^{2+} total en tejido testicular.</i>
Figura 11	<i>Efecto del síndrome metabólico sobre el Zn^{2+} libre en tejido testicular.</i>
Figura 12	<i>Detección inmunohistoquímica de la expresión de Zip14 durante el síndrome metabólico</i>
Figura 13	<i>Detección inmunohistoquímica de la expresión de ZnT1 durante el síndrome metabólico</i>
Figura 14	<i>Distribución celular del túbulo seminífero</i>
Figura 15	<i>Análisis celular del túbulo seminífero de testículos de rata con síndrome metabólico.</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

Tris-base	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
HCl	Ácido clorhídrico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
HNO₃	Ácido nítrico
HClO₄	Ácido perclórico
Cd	Cadmio
CAT	Catalasa
CS	Células de Sertoli
CdCl₂	Cloruro de cadmio
NaCl	Cloruro de sodio
ZnCl₂	Cloruro de zinc
D.O	Densidad óptica
DMT	Dominios transmembranales
ROS	Especies reactivas de oxígeno
EM	Espermátida
EP	Espermatocito primario
ES	Espermatocito secundario
EG	Espermatogonia
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
NFκB	Factor nuclear de transcripción kappa B
GADPH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
°C	Grado centígrado

IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
L	Litro
HDL	Lipoproteína de alta densidad
LDL	Lipoproteína de baja densidad
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
MT	Metalotioneina
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
ppm	Partes por millón
pH	Potencial hidrógeno
Zip	Proteínas parecidas a ZrT, Irt
SOD	Superoxido dismutada
ZnT	Transportador de zinc
Zn	Zinc

RESUMEN

El zinc es un elemento esencial para la maduración y diferenciación de células espermáticas, y protege ante un ambiente oxidante, la regulación de los niveles de zinc que se da a partir de la presencia de transportadores. Actualmente no hay estudios de la función testicular cuando se presenta síndrome metabólico, por lo tanto, en este trabajo se evaluó la concentración de zinc testicular, la redistribución intracelular, así como la expresión de los transportadores ZnT1 y Zip14 en testículos de rata; se estableció un modelo de síndrome metabólico en ratas alimentadas con dietas hiperglúcida, hiperlipídica y con cadmio. El zinc en testículo se determinó a partir de espectrometría de absorción atómica, la distribución intracelular del metal se evaluó a partir de tinciones con ditizona y zinquinina, la proteína de los transportadores ZnT1 y Zip14 se determinaron por inmunohistoquímica. La alimentación con diferentes dietas generó una patología similar al síndrome metabólico en humanos en una etapa temprana, la expresión de ZnT1 solo se vio aumentada en el grupo con dieta hiperlipídica, por el contrario, la expresión de Zip14 disminuyó en el compartimento adluminal donde se localizan los espermatocitos de todos los grupos de estudio. El daño provocado por cada dieta tiene diferente mecanismo, pero todas originan concentraciones desfavorables de zinc intracelular y con ello un cambio en la dinámica y distribución del metal, además de inducir hipertrofia celular. El tejido testicular bien, podría estar realizando una compensación homeostática para el resguardo y distribución del zinc hacia células espermáticas en maduración, con el objetivo de preservar la viabilidad y el acondicionamiento del espermatozoide, aunque al haber otros tejidos que requieran un mayor gasto en las mismas condiciones que se encuentra el testículo, se puede estar induciendo una redistribución de zinc como mecanismo ante la alteración metabólica.

ABSTRACT

Zinc is an essential element for the maturation and differentiation of sperm cells, and protects against an oxidizing environment, the regulation of zinc levels that occurs from the presence of transporters. Currently there are no studies of testicular function when metabolic syndrome occurs, therefore, in this work, testicular zinc concentration, intracellular redistribution, as well as the expression of the ZnT1 and Zip14 transporters in rat testes were evaluated; A model of metabolic syndrome was established in rats fed hyperglycemic, hyperlipidic and cadmium diets. Zinc in testis was determined from atomic absorption spectrometry, the intracellular distribution of the metal was evaluated from staining with dithizone and zinquin, the protein of the transporters ZnT1 and Zip14 were determined by immunohistochemistry. Feeding with different diets generated a pathology similar to metabolic syndrome in humans at an early stage, the expression of ZnT1 was only increased in the group with hyperlipid diet, on the contrary, the expression of Zip14 decreased in the adluminal compartment where they are located spermatocytes from all study groups. The damage caused by each diet has a different mechanism, but they all cause unfavorable concentrations of intracellular zinc and thus a change in the dynamics and distribution of the metal, in addition to inducing cellular hypertrophy. The testicular tissue could be carrying out a homeostatic compensation for the protection and distribution of zinc to maturing sperm cells, with the aim of preserving the viability and conditioning of the sperm, although there are other tissues that require greater expenditure on them. conditions that the testicle finds itself, a redistribution of zinc may be induced as a mechanism for metabolic alteration.

1. Marco teórico

1.1. Introducción

La metalómica es el estudio del metaloma, así como de las interacciones y conexiones funcionales de iones y otras especies metálicas con genes, proteínas, metabolitos y otras biomoléculas en los sistemas biológicos. Un estudio metalómico implica un enfoque en metales o metaloides en un sistema biológico, un vínculo entre el conjunto de concentraciones de elementos o especiación de elementos con un genoma, este vínculo puede ser estadístico, estructural o funcional [Maret y cols., 2018].

Las cantidades de iones metálicos esenciales cubren aproximadamente seis órdenes de magnitud, desde kg (Ca) a g (Na, K, Mg, Fe, Zn) hasta mg (Cu, Mn, Mo), debido a que las cantidades de hierro (Fe) y zinc (Zn) están en el rango de gramos típico de los minerales, no se consideran realmente trazas. Los tejidos específicos requieren de iones metálicos, por ejemplo, calcio (Ca) en los huesos, hierro (Fe) en la sangre, donde el 90% de todo el hierro se encuentra en la hemoglobina de los eritrocitos, pero a diferencia del hierro, solo el 1% del zinc se encuentra en la sangre, lo que lo convierte principalmente en un ion celular, donde la mayor concentración de zinc se encuentra en el núcleo [Maret y cols., 2018].

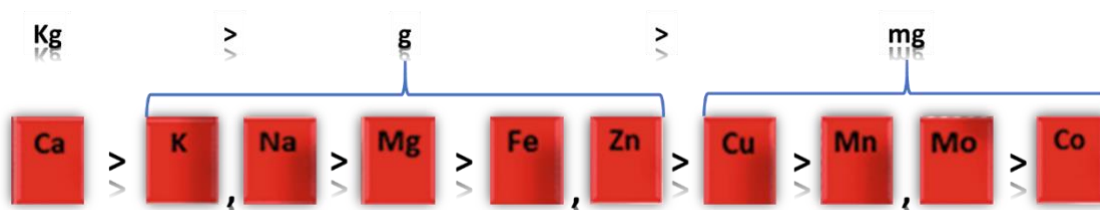


Figura 1. Cantidades de iones metálicos esenciales presentes en mamíferos. Tomado y modificado de Maret y cols., 2018.

1.2. Zinc

El zinc es el segundo metal más abundante (después del hierro) presente en los organismos vivos. Participa como un catión divalente (Zn^{+2}) sin poseer propiedades redox en condiciones fisiológicas, dando lugar a las múltiples funciones fisiológicas en una gran variedad de procesos biológicos [Kambe y cols., 2015].

El zinc se absorbe en el intestino delgado, que, en condiciones fisiológicas normales, los procesos de transporte de captación no están saturados. Al ser obtenido de la dieta, el zinc se libera de los alimentos como iones libres durante la digestión; las proteínas de transporte específicas pueden facilitar el paso del zinc a través de la membrana celular hacia la circulación portal, el zinc es transportado por ZnT1 y Zip4, ambos transportadores se localizan en la membrana apical de los enterocitos y, por lo tanto, son de gran importancia en la absorción de Zn en la dieta [Bafaro y cols., 2017]. Sin embargo, no son los únicos transportadores de zinc presentes en las células. Además de los transportadores de Zn, la metalotioneína (MT) es otra proteína que interviene en el metabolismo del Zn, así como de otros microminerales. La MT es el nombre genérico de una ubicua superfamilia de proteínas de bajo peso molecular, que poseen una estructura única, con una cantidad elevada de grupos sulfuros [Vasák y cols., 2005]. La MT puede ligar 7 átomos de Zn por molécula, formando grupos Zn-tiolato y esta proteína tiene capacidad de unirse a cobre (Cu), cadmio (Cd) y mercurio (Hg). [Maret y cols., 2003]. Los primeros trabajos que investigaron la relación entre Zn dietario y MT intestinal, proponían algún rol de esta en la protección frente a niveles tóxicos, tanto como en la absorción del Zn [Lee y cols., 1992]

El cuerpo humano contiene entre 2 a 4 gramos de zinc (Zn^{+2}) empleados en funciones catalíticas, estructurales y reguladoras [Li- y cols., 2017], de los cuales menos del 1% del zinc total se encuentra en suero, el 80% de zinc sérico está unido a albumina sérica y el otro 20% está fuertemente unido a α 2-macroglobulina. El 99% restante se encuentra en distintos tejidos, dentro de los cuales destaca: el músculo esquelético, el hueso y el hígado/piel al almacenar 60, 30 y 5% del Zn total, respectivamente, y entre 2 al 3% se almacena en otros tejidos [Barnett- y cols., 2013; Hara y cols., 2017]. Ozen y cols en 2002 demostraron que en testículos existen aproximadamente 250 mg/kg de zinc (Zn^{+2}) el cual se encuentra distribuido

en los diferentes tipos celulares que componen a este tejido. De acuerdo con una revisión realizada por Maret y cols en 2009 al menos el 10% del genoma humano codifica para la síntesis de proteínas que requieren zinc, ya sea como cofactor o promoviendo el mantenimiento de su estructura, estos porcentajes corresponden aproximadamente a unas 3,000 proteínas, de las cuales, al menos 397 proteínas de zinc son hidrolasas, 302 son ligasas, 167 son transferasas, 43 oxidorreductasas y 24 son liasas/isomerasas. Hay 957 factores de transcripción; 221 proteínas de señalización; 141 proteínas de transporte / almacenamiento; 53 proteínas con sitios metálicos estructurales; y 19 proteínas implicadas en la reparación, replicación y traducción del ADN. Además, hay 427 proteínas con dedos de zinc y otras 456 proteínas de zinc de función desconocida.

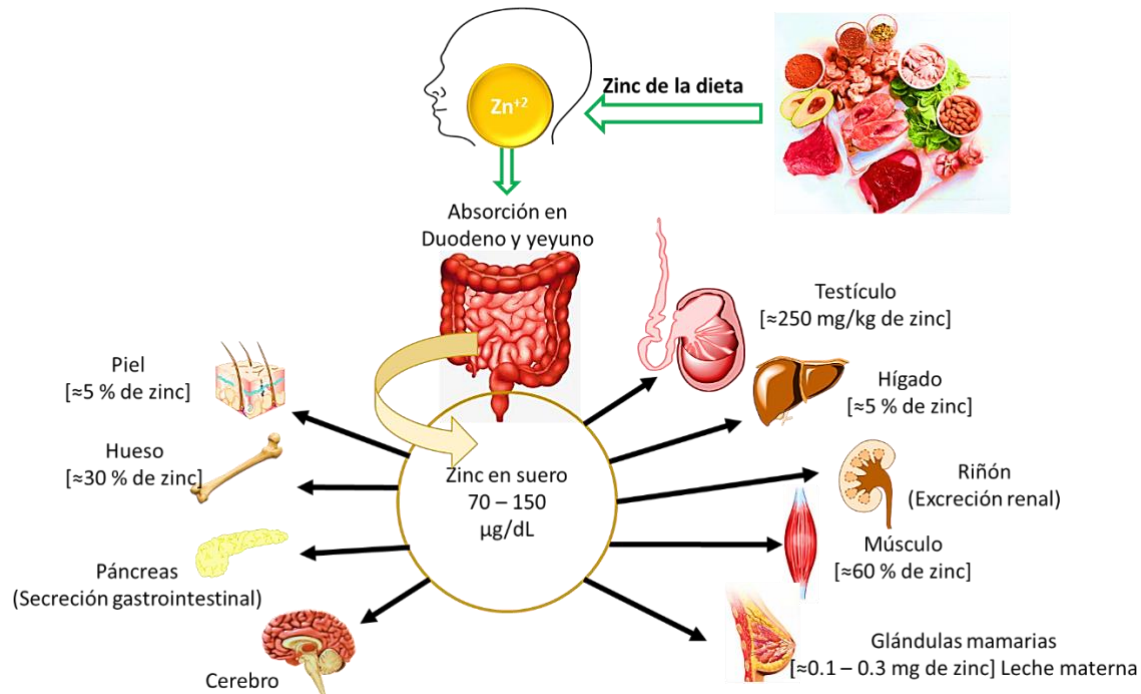


Figura 2. Distribución del zinc en el cuerpo. El zinc de la dieta es absorbido en el duodeno y yeyuno para luego ser distribuido a los tejidos periféricos. Aproximadamente el 60% del zinc se almacena en el músculo esquelético, aproximadamente el 30% en los huesos y aproximadamente el 5% se almacena en el hígado y la piel. El porcentaje restante se distribuye a otros tejidos como el cerebro, riñón, páncreas y testículo. El zinc en exceso se excreta a través de la secreción gastrointestinal, desprendimiento de células mucosas y tegumentos. La distribución del zinc en el cuerpo se controla minuciosamente mediante una regulación coordinada por los transportadores ZnT y Zip. Tomado y modificado de Kambe y cols., 2015.

1.3. Dinámica del Zinc

1.3.1. Transportadores de zinc

Los transportadores de zinc son los responsables de mantener las concentraciones de zinc citosólico, así como los niveles de zinc en los diferentes compartimentos celulares, dichos transportadores pertenecen a dos familias: SLC30 y SLC39.

La familia SLC30 o ZnT, está comprendida por 10 miembros que funcionan para disminuir la concentración citosólica de zinc, transportando al metal desde el citosol al espacio extracelular o dentro de los compartimentos intracelulares. ZnT1 es el único miembro de la familia SLC30 que se expresa de manera ubicua en la membrana plasmática [Bafaro y cols., 2017; Kambe y cols., 2015]. La mayoría de las proteínas ZnT tienen seis dominios transmembrana (DTM), excepto el ZnT5 que tiene 12 DTM. Se predice que la mayoría de las proteínas ZnT tienen terminales citoplasmáticos amino y carboxilo. Las proteínas ZnT tienen un bucle largo y rico en histidina entre los DTM IV y V, que podría presentar un dominio de unión a metales. Es posible que las proteínas ZnT actúen como dímeros o trímeros [Liuzzi y col., 2004].

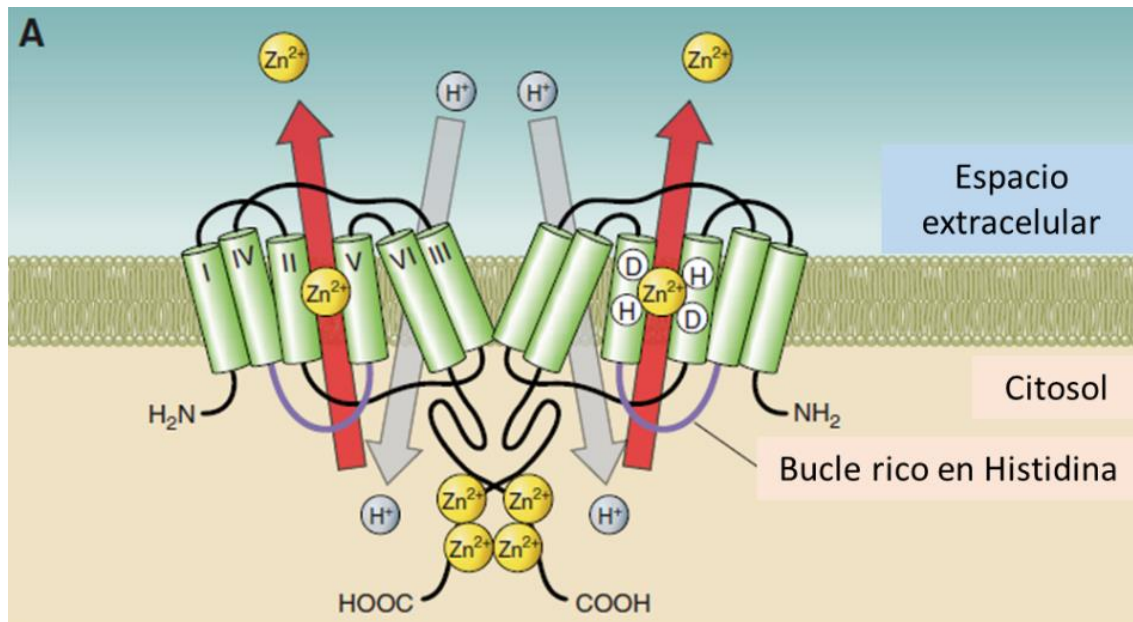


Figura 3. Topología de los transportadores ZnT. Se cree que los transportadores ZnT funcionan como dímeros en forma de Y con seis hélices transmembranales (TM) (excepto ZnT5). Las hélices I, II, IV y V de dominios TM forman un haz compacto de cuatro hélices donde cuatro residuos hidrófilos conservados (Histidina/Ácido aspártico- Histidina/Ácido aspártico) de las hélices II y V de dominios TM forman el sitio de unión intramembranoso de zinc. Los transportadores ZnT son funcionales como intercambiadores Zn²⁺/H⁺ en relación 1:1. Se cree que el asa citosólica rica en histidina está implicada en la detección y la translocación de zinc al sitio de HD-HD. Tomado y modificado de Kambe y cols., 2015.

La familia SLC39 o Zip comprenden 14 miembros que funcionan para aumentar la concentración citosólica de zinc transportando al metal al citosol desde el espacio extracelular o desde los compartimentos intracelulares [Bafaro y cols., 2015]. La mayoría de las proteínas Zip tienen ocho DTM con terminaciones amino y carboxilo extracelulares (o intravesiculares). Tienen una región de bucle largo entre los DTM III y IV y un C terminal muy corto, además de tener un dominio rico en histidina [Liuzzi y col., 2004].

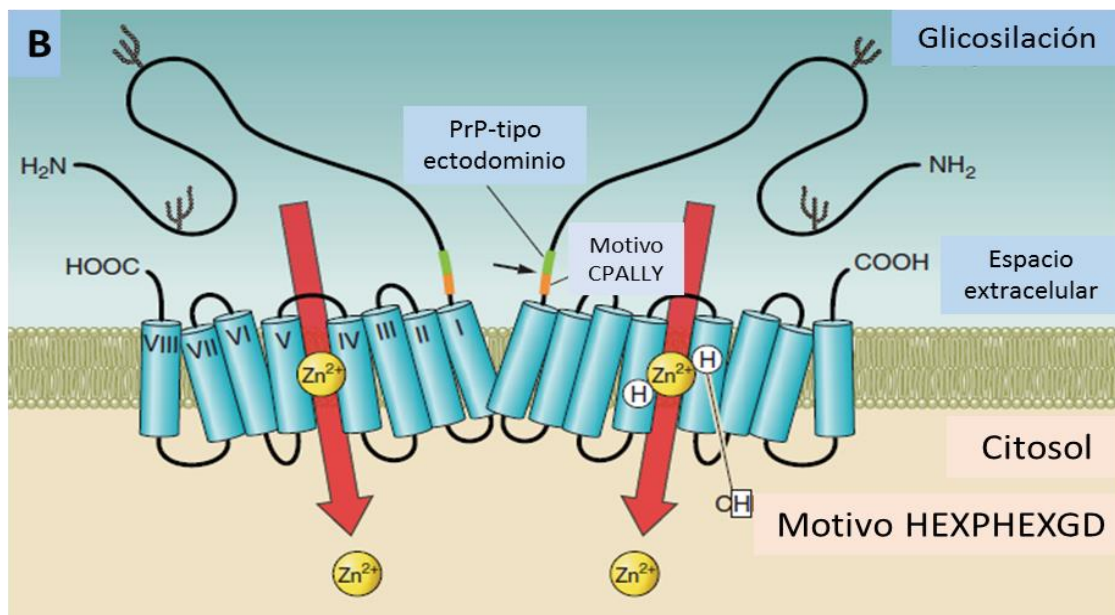


Figura 4. Topología de los transportadores Zip. se cree que los transportadores ZIP forman homodímeros con ocho hélices TM. Se predice que los residuos de histidina resaltadas en las hélices TM IV y V están involucradas en un sitio de unión de zinc intramembranoso. Los miembros de la subfamilia LIV-1 se caracterizan por una porción amino-terminal extracelular larga que contiene el motivo CPALLY y el motivo CHEXPHEXGD en la hélice TM V. El dominio similar a PrP también se encuentra en algunos transportadores ZIP (ZIP5, ZIP6 y ZIP10). La flecha indica el sitio de procesamiento previsto alrededor del motivo CPALLY en algunos transportadores ZIP (ZIP4, ZIP6 y ZIP10). La porción aminoterminal extracelular larga de la mayoría de los miembros de la subfamilia LIV-1 está generalmente altamente glicosilada. Los transportadores Zip son muy grandes y este esquema solo representa una figura grafica. Tomado y modificado de Kambe y cols., 2015.

Tanto Zip como ZnT funcionan de manera opuesta pero coordinada para así mantener la homeostasis celular del zinc. Debido a que se ha estudiado a detalle la distribución tisular de la familia ZIP y ZnT (tabla 1) y la expresión diferencial basada en el género, todavía no se definen bien los mecanismos de acción de estos transportadores de zinc.

Tabla 1. Transportadores de zinc, ubicación celular, expresión específica de tejido.

Transportador de zinc	Localización celular	Expresión en tejidos
SLC39A1 / ZIP1	Membrana de plasma	Expresado ubicuamente
SLC39A2 / ZIP2	Membrana de plasma	Sangre, próstata
SLC39A3 / ZIP3	Membrana plasmática, compartimentos intracelulares	Glándula mamaria, próstata
SLC39A4 / ZIP4	Membranas apicales	Intestino delgado, estómago, colon, riñón, cerebro
SLC39A5 / ZIP5	Membranas basolaterales	Páncreas, riñón, hígado, bazo, colon, estómago
SLC39A6 / ZIP6	Membrana de plasma	Expresado ubicuamente
SLC39A7 / ZIP7	Aparato de Golgi, retículo endoplásmico	Expresado ubicuamente
SLC39A8 / ZIP8	Vesículas	Expresado ubicuamente
SLC39A9 / ZIP9	Red Trans-Golgi	Expresado ubicuamente
SLC39A10/ZIP10	Membrana de plasma	Expresado ubicuamente
SLC39A11/ZIP11	Desconocido	Glándula mamaria
SLC39A12/ZIP12	Desconocido	Retina, cerebro, testículos, pulmón
SLC39A13/ZIP13	Aparato de Golgi	Expresado ubicuamente
SLC39A14 / Zip14	Membrana de plasma	Expresado ubicuamente
SLC30A1 / ZnT1	Membrana de plasma	Expresado ubicuamente
SLC30A2 / ZnT2	Vesículas, lisosomas	Páncreas, riñón, testículo, células epiteliales, intestino delgado
SLC30A3 / ZnT3	Vesículas sinápticas	Cerebro, testículo

SLC30A4/ZnT4	Compartimentos intracelulares	Glándula mamaria, cerebro, intestino delgado, placenta, sangre, células epiteliales
SLC30A5 / ZnT5	Vesículas secretoras, aparato de Golgi	Expresado ubicuamente
SLC30A6 / ZnT6	Vesículas secretoras, aparato de Golgi	Intestino delgado, hígado, cerebro, tejido adiposo
SLC30A7 / ZnT7	Aparato de Golgi	Retina, intestino delgado, hígado, sangre, células epiteliales, bazo
SLC30A8 / ZnT8	Vesículas secretoras	Células β pancreáticas
SLC30A9 / ZnT9	Citoplasma, núcleo	Expresado ubicuamente
SLC30A10 / ZnT10	Desconocido	Hígado, cerebro
MT1	Citoplasma, núcleo, mitocondrias	Expresado ubicuamente
MT2	Citoplasma, núcleo, mitocondrias	Expresado ubicuamente
MT3	Citoplasma, núcleo	Cerebro, testículo
MT4	Citoplasma, núcleo	Epitelio escamoso

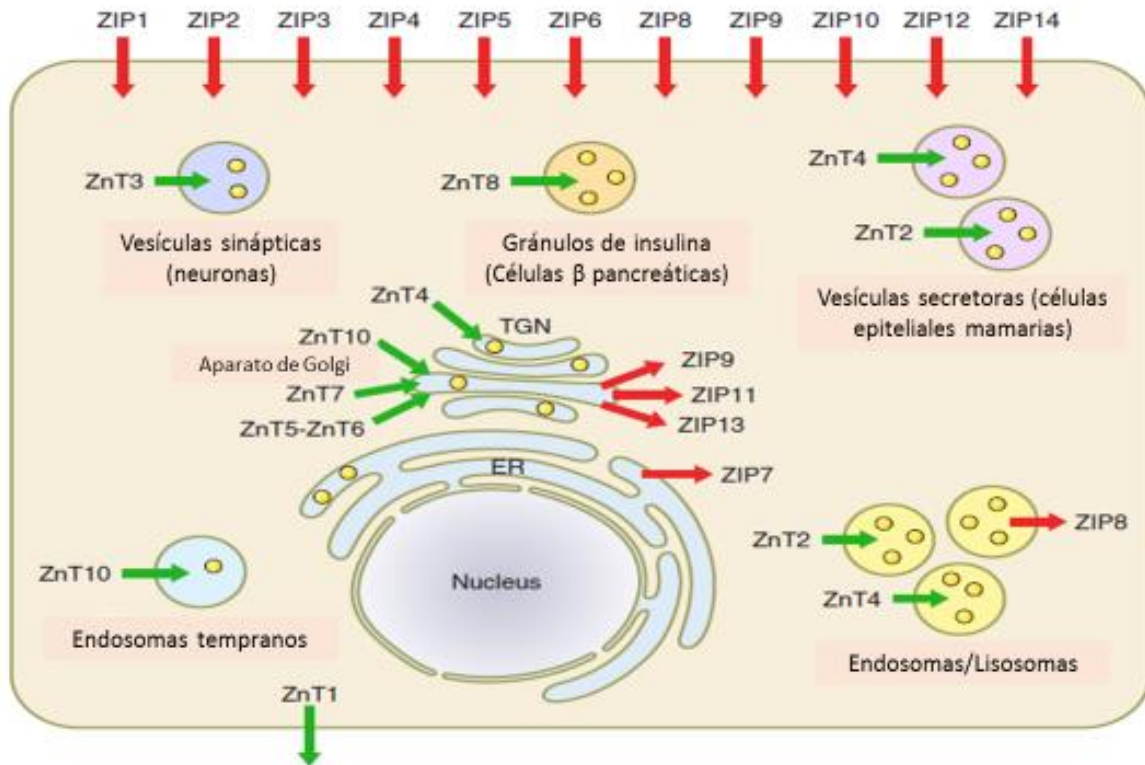


Figura 5. Localización subcelular y dirección del transporte de zinc de los transportadores ZnT y ZIP. La localización primaria de los transportadores ZnT se muestra con flechas verdes, mientras que la localización de los transportadores Zip se muestra con flechas rojas. Debido a que la dinámica de los transportadores está en dependencia de varios estímulos, en esta ilustración se muestran de forma estática. El zinc citosólico se transporta hacia dentro o fuera de los diferentes compartimentos subcelulares, incluidos aquellos compartimentos secretorios específicos de las células, por ejemplo, las vesículas sinápticas o los gránulos de insulina. Tomado de y modificado de Kambe y cols., 2015.

1.3.2. Papel de los transportadores de Zinc en el transporte de Cadmio

El cadmio es un metal perteneciente a la familia IIB, el cual tiene dos estados de valencia 0 o 2⁺, sin embargo, el único de importancia biológica es el cadmio (II), ya que posee un orbital d^{10} completamente lleno, lo cual lo asemeja al Zn²⁺, ya que ambos poseen la falta de química redox. El Cd²⁺ se comporta como un ácido de Lewis más débil que el propio zinc, por lo que presenta estabilidades ligeramente menores en complejos con oxígeno y ligandos nitrogenados [Guzmán y cols.,2018].

Sin embargo, Giedroc y col.,(2007) demostraron que la afinidad es inversa en presencia de ligandos sulfúricos, por lo que el cadmio es más tiofílico que el propio zinc. Debido a una vida media biológica considerablemente larga y una tasa de excreción muy baja, la acumulación de Cd en diferentes órganos del cuerpo (p. ej., hígado, riñón y testículos) a lo largo del tiempo se asocia con el funcionamiento perturbado de estos órganos. En los testículos, se ha informado que el Cd induce estrés oxidativo, apoptosis de células espermáticas, reducción en la producción de andrógenos y funciones espermáticas, considerándose diabetogénico.

Himeno y cols., (2019) demostraron que Zip14 también es utilizado para el transporte de Cd^{+2} en las células. Los análisis cinéticos de la incorporación de metales en las células, en las que ZIP14 se expresa ectópicamente, han demostrado que ZIP14 es uno de los transportadores de Cd^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} [Girijashanker y cols., 2008]. Por otro lado, una evaluación de la concentración de zinc logró reconocer que los niveles de ARNm de ZIP14 eran muy similares en diferentes tejidos, pero clasificados como hígado > duodeno > cerebro > testículo > riñón > pulmón [Girijashanker y cols., 2008]. En un estudio realizado por Satarug S. y cols., (2021) demostraron que una reducción en la expresión de transportadores de zinc que son responsables de la captación de Cd, ZIP8 y ZIP14, junto con un aumento en la expresión de transportadores de exclusión de Cd como ZnT1 produciría resistencia a la toxicidad de cadmio en las células que expresan a los transportadores estudiados.

1.4. Zinc y testículo

El Zn tiene un papel clave en la espermatogénesis desde varias perspectivas; el Zn se encuentra principalmente en las células de Leydig, las espermatogonias tardías de tipo B y las espermáticas, es esencial para la producción y secreción de testosterona de las células de Leydig. Como resultado, la deficiencia de Zn se ha asociado con una función reducida del receptor de la hormona luteinizante, la

síntesis de esteroides disminuida y el daño celular de Leydig que se origina del estrés oxidativo. El Zn se encuentra en una alta concentración en los espermatocitos en desarrollo debido a la necesidad de Zn durante la condensación del ADN y la meiosis, también facilita la condensación de ADN en espermátidas y se ha demostrado que prolonga la sobrevivencia de los espermatozoides una vez liberados post eyaculación [Croxford y cols., 2011].

Hasta 2016 se detectaron en ratas Sprague-Dawley transportadores de zinc que participan en la dinámica del metal en testículo en condiciones normales, de la familia de los exportadores se han localizado ZnT1, ZnT2 y ZnT3 en células de Sertoli, espermatocitos paquitenos como en espermátidas redondas, ZnT7 en espermatocitos, ZnT8 y ZnT10 en espermátidas redondas [Downey y cols., 2016]. Por su parte, los importadores que se han localizado en testículos humanos son ZIP1 que se detectó sólo en espermátidas y espermatozoides, ZIP5, ZIP6, ZIP8 en espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides. En ratones, ZIP14 se ha localizado en espermatogonias; ZIP5, ZIP8 y ZIP10 se han localizado en espermatocitos; ZIP6, ZIP8 y ZIP10 se han localizado en espermátidas redondas; ZIP1 y ZIP6 se han localizado en espermátidas alargadas; y ZIP5 se ha localizado en células de Sertoli [Downey y cols., 2016].

El equilibrio homeostático que ejercen los transportadores de zinc y algunas metaloproteínas se puede ver alterado por patogénesis crónicas, por ejemplo, el síndrome metabólico.

1.5. Síndrome metabólico

El síndrome metabólico es un conjunto de alteraciones metabólicas, que se caracteriza por presentar cuadros de resistencia a la insulina, dislipidemia aterogénica, hipertensión arterial sistémica y obesidad central. La fisiopatología incluye factores genéticos y adquiridos, que conllevan a un mayor riesgo en el desarrollo de enfermedad cardiovascular aterogénica. Así mismo, factores ambientales, alto consumo de calorías, el sedentarismo y el estilo de vida se

consideran dentro de los principales contribuyentes para la generación de síndrome metabólico [Rochlani y cols., 2017]. Existe evidencia de datos sustanciales y consistentes de que la exposición a la ingesta excesiva de carbohidratos tiene efectos perjudiciales sobre múltiples factores de riesgo cardiometabólicos [Taskinen y cols., 2019]. En modelos preclínicos, se observó que las células endoteliales vasculares cultivadas expuestas a concentraciones de glucosa hiperglucémica producían niveles mejorados de especies reactivas de oxígeno (ROS), observando un espectro relativamente amplio de lesiones celulares y metabólicas asociadas a la hiperglucemia a largo plazo en diversos sistemas de órganos periféricos y tejidos nerviosos centrales y se ha relacionado funcionalmente con procesos de señalización aberrantes mediados por enzimas selectivas de la vía biosintética de hexosamina (HBP), lo que promueve la modificación postraducciona de enzimas reguladoras celulares clave y proteínas de membrana, [Stefano, G. B. y cols., 2016] alterando directamente a los principales procesos de control, siendo uno de los mecanismos que genera SM.

Actualmente, además de consumir una dieta rica en carbohidratos también es popular en poblaciones urbanas y suburbanas consumir una dieta alta en grasas, lo que puede contribuir a la disfunción del tejido adiposo y la inflamación metabólica. Cuando los ácidos grasos libres circulantes aumentan, pueden inducir lipotoxicidad en los tejidos periféricos, como disfunción hepática y de las células β . La alta afluencia de ácidos grasos libres al hígado desencadena la producción de triglicéridos de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y contribuye al desarrollo de dislipidemia. Posteriormente, estas deficiencias pueden conducir a síndromes metabólicos [Tan y cols., 2019].

El síndrome metabólico no tiene una definición establecida, sin embargo, existen diferentes organizaciones de salud a nivel mundial que han establecido distintos criterios clínicos para considerar a una persona con SMet no (Tabla 2), entre ellos tenemos a: la Organización Mundial de la Salud, Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos, Panel III de tratamiento de adultos del Programa

Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP) (ATP-III) y la Norma Oficial Mexicana 015 SSA2-2010.

	OMS (1998)	AACE (2003)	NCEP ATP III (2005)	NOM-015-SSA2-2010
Obesidad	Hombres: relación cintura cadera >0.90; Mujeres: relación cintura cadera: >0.85; e IMC > 30 kg/m ² .	IMC > 25 kg/m ² .	Circunferencia de la cintura: ≥ 102 cm en hombres; Circunferencia de la cintura: ≥ 88 cm en mujeres.	Circunferencia de la cintura: ≥ 90 cm en hombres; Circunferencia de la cintura: ≥ 80 cm en mujeres.
Glucosa	Intolerancia a la glucosa, glucosa en ayunas alterada o Diabetes tipo 2.	Intolerancia a la glucosa o glucosa en ayunas alterada.	≥ 100 mg/dL (incluyendo Diabetes tipo 2).	≥ 100 mg/dL.
Triglicéridos	≥ 150 mg/dL.	≥ 150 mg/dL.	≥ 150 mg/dL. o en tratamiento para triglicéridos elevados.	≥ 150 mg/dL.
HDL-C	< 40 mg/dL en hombres; < 50 mg/dL en mujeres.	< 40 mg/dL en hombres; < 50 mg/dL en mujeres.	< 40 mg/dL en hombres; < 50 mg/dL en mujeres; o en tratamiento para disminuir colesterol.	< 40 mg/dL en hombres; < 50 mg/dL en mujeres.
Presión sanguínea	≥ 140/90 mm de Hg.	≥ 130/85 mm de Hg.	≥ 130/85 mm de Hg o en tratamiento de antihipertensivos.	>130/85 mm de Hg.
Otros	Microalbuminuria, ratio albumina/creatinina >30 mg/g.	Sedentarismo, historia heredofamiliar.		

Tabla 2. Criterios y definiciones de síndrome metabólico. OMS: organización mundial de la salud; AACE: American Association of Clinical Endocrinologist; NCEP ATP III: Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults.

1.6. Síndrome metabólico y Zinc

El zinc juega un papel importante en la prevención del síndrome metabólico, incluyendo dislipidemia aterogénica, hiperglucemia, hiperinsulinemia y presión arterial elevada, mediante la inhibición de la expresión de citosinas pro-inflamatorias

protegiendo contra el daño por estrés oxidativo, también participa en el metabolismo de la glucosa y los lípidos al participar como co-factor enzimático y de esta manera regulando la actividad de las distintas enzimas involucradas en el metabolismo de estas biomoléculas [Y. Wang y cols., 2018].

El grupo de investigación de Park, y cols., (1986) puso en evidencia que en ratas Sprague - Dawley con síndrome metabólico existe una desregulación en la tolerancia oral a la glucosa, generada por la resistencia periférica a la acción de la insulina, en relación con este estudio, M. You y cols., (2010) demostraron que la deficiencia de zinc promueve la generación de resistencia a la insulina, el crecimiento del tejido adiposo y la falta de crecimiento de roedores.

Así mismo, se ha evidenciado que hay un incremento de la eliminación de zinc en orina y una disminución de zinc en plasma, en pacientes diabéticos [S. Wang y cols., 2016]. Por otro lado, hallazgos encontrados por J. Lee y Y. Kim en 2013 demostraron que el cadmio es un factor de riesgo para generar síndrome metabólico.

1.7. Testículos, síndrome metabólico y Zinc

1.7.1. Testículo

El testículo posee dos funciones diferentes, pero a la vez íntimamente relacionadas con la reproducción: la producción y almacenamiento de células germinales masculinas, espermatozoides, así como la biosíntesis y secreción de hormonas sexuales masculinas, andrógenos. Los primeros son producidos por los túbulos seminíferos, son transportados por un sistema de canales desde el testículo al exterior para el proceso de fertilización [Tresguerres y cols., 2020]. Los andrógenos son producidos en las células intersticiales de Leydig, están encargados de la virilización del individuo. Como es evidente, la compartimentalización estructural en túbulos seminíferos e intersticio crea una división topográfica de la doble función del testículo: espermatogénesis y

esteroidogénesis. El testículo está cubierto por la túnica albugínea (cápsula), la túnica vaginal (saco mesotelial) y una capa externa de piel delgada y arrugada, el escroto. La espermatogénesis tiene lugar en el epitelio seminífero de los túbulos [Cui y cols., 2001].

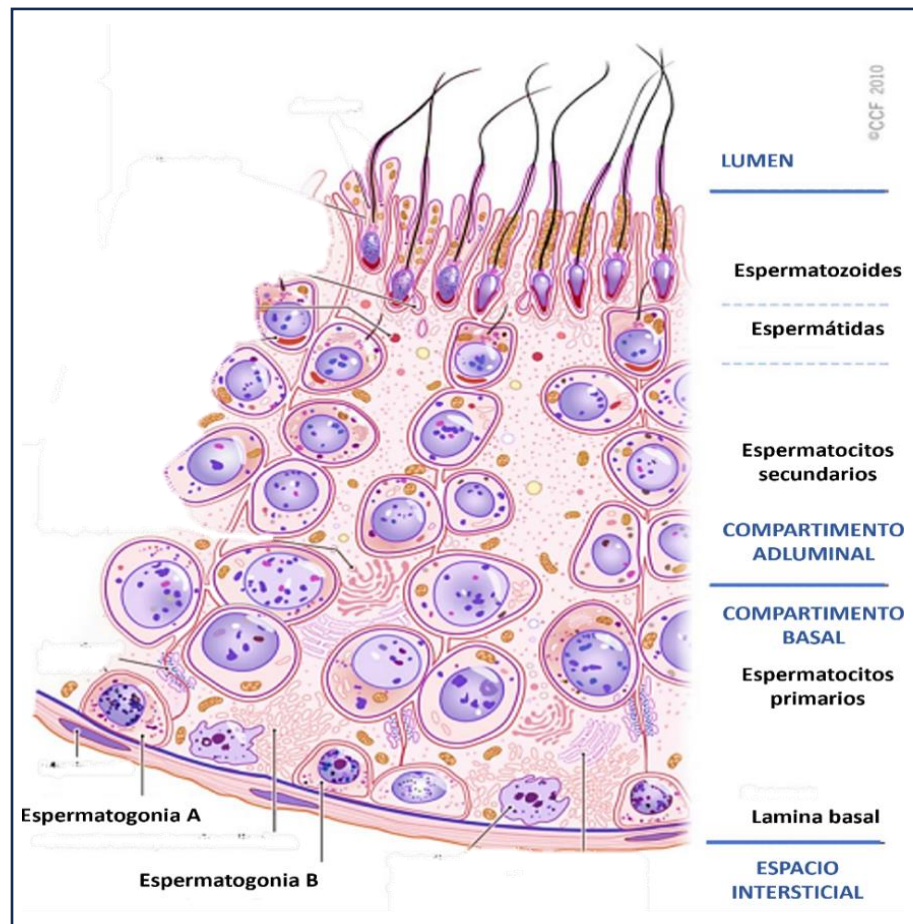
1.7.2. Espermatogénesis

La espermatogénesis implica una secuencia ordenada de cambios a medida que las células avanzan a través de la mitosis (espermatogonias), la meiosis (espermatocitos) y la espermiogénesis (espermátidas). Tiene lugar en los túbulos seminíferos, dispersos en muchas bolsas diferentes que proliferan y se desarrollan (Figura 6). El espacio de los túbulos seminíferos se divide en compartimentos basal (membrana basal) y adluminal (luz) por fuertes complejos de unión intercelular llamados “uniones estrechas” permitiendo la predicción de la ubicación de las células espermatogénicas. Los túbulos seminíferos están revestidos por células de Sertoli altamente especializadas que descansan sobre la membrana basal tubular y se extienden hacia la luz con una compleja ramificación del citoplasma. Fomentan la proliferación y el desarrollo de las células de Sertoli durante el período gestacional [Agarwal y col., 2011].

Las espermatogonias se pueden identificar por su posición (en contacto con la membrana basal) y sus núcleos ovalados en interfase con el eje largo paralelo a la membrana basal. Los espermatocitos primarios se someten a varias subfases de la profase I, pero, aquí, las subestaciones anteriores se denominan prepaquiteno. Los cromosomas que se condensan en los espermatocitos primarios de prepaquiteno tienden a agruparse en un borde de la envoltura nuclear. Por el contrario, los cromosomas pareados de los espermatocitos primarios de paquiteno de bandas anchas llenan el núcleo. Los espermatocitos primarios de paquiteno son abundantes en secciones porque esta es la fase de la meiosis de mayor duración. Después de que un espermatocito primario completa el paquiteno, los pasos restantes de la meiosis I y la meiosis II (por los espermatocitos secundarios hijos)

se completan muy rápidamente, por lo que los ejemplos de células en estas etapas de la meiosis son más difíciles de encontrar en secciones. Las células en la metafase I o en la metafase II son las más llamativas y fáciles de localizar. Los productos de la meiosis II son espermatidas. Estas células haploides comienzan como espermatidas tempranas, reconocibles por sus pequeños núcleos esféricos en interfase. La primera evidencia clara de que la espermiogénesis está en marcha es un cambio en la forma del núcleo de esférico a una forma ancha de diamante; una célula con tal núcleo puede denominarse espermatida intermedia. Cuando el núcleo ha asumido la forma puntiaguda y el aspecto denso de un espermatozoide, pero permanece insertado profundamente en el epitelio, la célula puede denominarse espermatida tardía. Finalmente, los núcleos de los espermatozoides desprendidos pueden reconocerse fácilmente, porque forman una fila en la superficie del epitelio y se superponen a una capa de cuerpos residuales (Figura 7) [Cui y cols., 2001].

Figura 6. Sección del epitelio germinal en el túbulo seminífero. Las células de Sertoli dividen el epitelio germinal en un compartimento basal y adluminal. Tomado y modificado de Agarwal y col., 2011.



Se sabe que la funcionalidad de los testículos puede verse afectada por enfermedades metabólicas como el síndrome metabólico, esta enfermedad es multisistémica ya que compromete la funcionalidad de distintos órganos, como lo son, el riñón, cerebro, hígado, páncreas, musculo, adiposo, sin embargo, recientemente se ha considerado tener un impacto sobre la función y dinámica gonadal [Liu y cols., 2019]. El síndrome metabólico, afecta la función testicular al reducir los niveles totales de testosterona y globulina fijadora de hormonas sexuales, además de tener un efecto perjudicial sobre la espermatogénesis. Por otro lado, el hipogonadismo aumenta aún más la resistencia a la insulina, que es la principal característica fisiopatológica del síndrome metabólico [Goulus y cols., 2008].

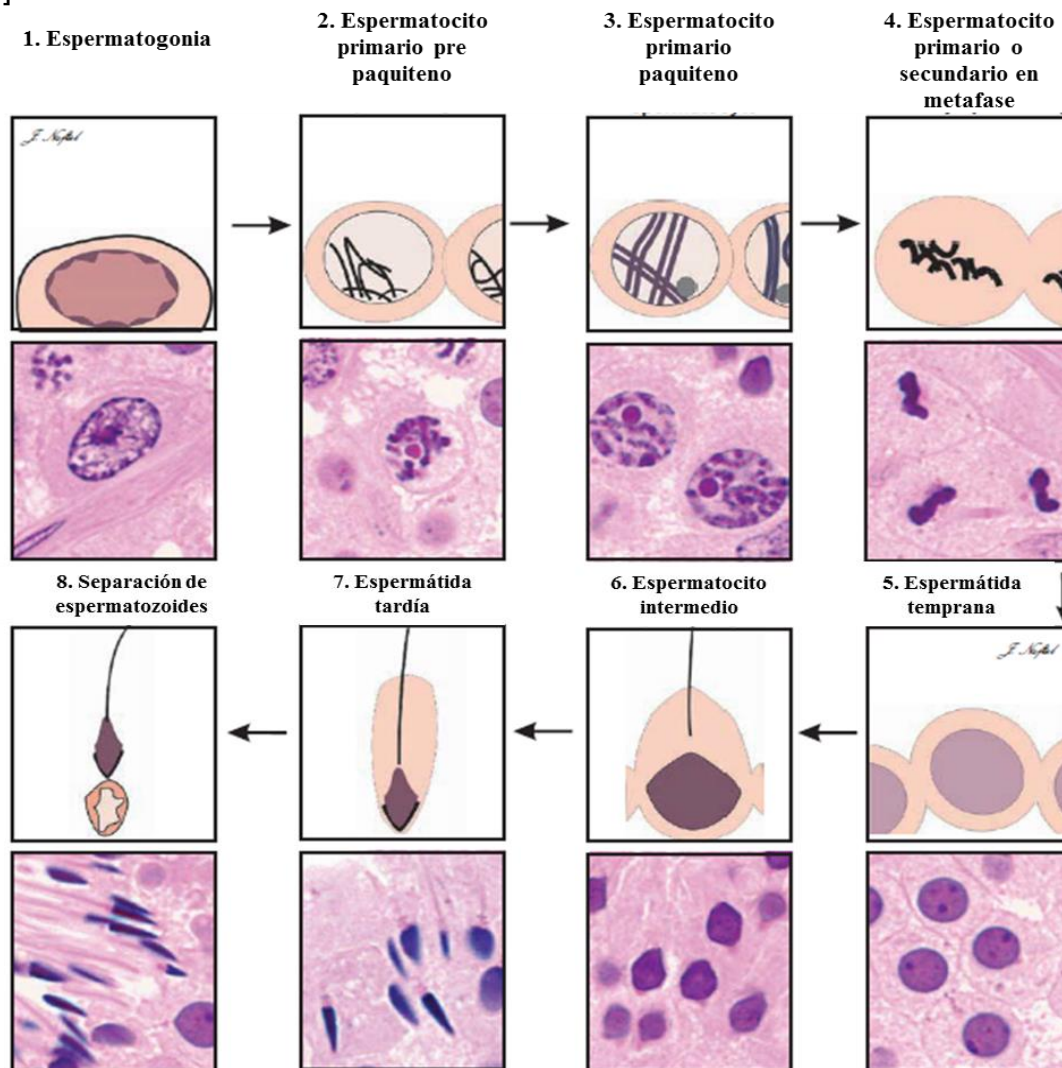


Figura 7. Descripción general de las células espermatogénicas fácilmente identificables en el epitelio seminífero. Tomado y modificado de Cui y cols., 2001.

Debido a la disfunción testicular que genera el síndrome metabólico, también podría llevar a la modificación de la dinámica del Zn, que toma gran importancia en la regulación de los procesos de espermatogénesis y espermiogénesis, sin embargo, no hay estudios que relacionen la homeostasis del zinc en testículos cuando se presenta síndrome metabólico. De acuerdo con lo citado por Carlo Foresta y cols., 2014 el zinc es esencial a lo largo de todas las etapas de desarrollo de los espermatozoides, y es esencial la absorción del metal para el correcto funcionamiento de los testículos, epidídimo y próstata. Una deficiencia de Zn conlleva a procesos apoptóticos, al favorecer la activación del sistema de caspasa 3 y caspasa 8, generando la muerte celular de los precursores espermatogénicos.

En los espermatozoides el Zn juega un papel clave en la condensación del DNA, a partir de enlaces coordinados con grupos tiolicos de las protaminas 1 y 2 [Champroux y cols.,2016].

La dinámica y regulación de los niveles de Zn en la gónada masculina se lleva a cabo por los transportadores ya mencionados anteriormente. Foresta y cols., (2014), puso en evidencia que el transportador más abundante en este tejido es el transportador transmembranal ZnT1.

Ante un estado hiperglucemiante, la absorción de Zn se ve disminuida y la eliminación por orina se ve incrementada, afectando la absorción, almacenamiento y reabsorción de Zn, comprometiendo de esta manera la biodisponibilidad de este metal en los distintos tejidos, evento que impacta en la función de las metaloenzimas antioxidantes en testículo, como es el caso de SOD, GPX5, factores de transcripción como Nrf2 y así mismo en la síntesis de testosterona en las células de Leydig e incrementando la expresión de NF- κ B y por tanto la regulación inflamatoria gonadal que se refleja en un daño testicular [Maremanda y cols., 2016].

2. Definición del problema

El síndrome metabólico es la concurrencia de múltiples factores, tales como hipertensión arterial, obesidad central, alteraciones en el metabolismo de glucosa, dislipidemia, las cuales se establecen como factores de riesgo para generar problemas cardiovasculares, causado por excesos dietéticos y factores poco usuales, sin embargo, los estudios relacionados con testículos han sido limitados, tomando en cuenta que la principal alteración es la disfunción testicular, que conlleva a una ineficiencia en la espermatogénesis y la espermiogénesis, sin embargo, no hay estudios que relacionen al síndrome metabólico con zinc y testículo.

Según lo reportado por ENSANUT en el año 2018 se identificaron en la población mexicana a pacientes con diagnóstico de síndrome metabólico, de los cuales en personas mayores de 20 años 15.2 millones de esas personas padecen hipertensión arterial, de los cuales el 15.3% son hombres, 17.7% presentan dislipidemia 73% de esa padece obesidad o sobrepeso.

El zinc es un elemento presente de forma diversa en los tejidos, siendo testículo uno de los que tiene mayores concentraciones del metal y donde se lleva a cabo la regulación de la espermatogénesis y síntesis de testosterona, en presencia de síndrome metabólico se puede generar un estado de inflamación crónico a nivel sistémico que bien puede desencadenar una importante hipozinquemia y por consecuente un impacto en el tejido, sin embargo, no se encuentran estudios que evalúen y relacionen la interacción que existe entre el síndrome metabólico y la homeostasis de zinc en testículos.

3. Pregunta de investigación

¿Cómo se ve modificada la homeostasis del Zinc en testículos de rata Wistar con Síndrome Metabólico inducido por dieta hiperglúcida, hiperlipídica e intoxicación con cadmio?

4. Justificación

El síndrome metabólico representa un importante problema de salud pública debido a su creciente incidencia en todo el mundo y su asociación con afecciones graves que amenazan la vida, como las enfermedades cardiovasculares.

De 2015 a 2016, en México se detectaron 120,284 pacientes con síndrome metabólico, además, según los resultados de las encuestas de ENSANUT en el 2018 revelan que el 6% de la población en etapa preescolar, 15.3% en edad escolar, 14.2% en adolescentes y 33.6% de adultos presentaron obesidad o sobrepeso. Al categorizar a los adultos por perímetro de cintura, se observa que 71.8% tiene obesidad central. Mientras que la prevalencia de hipertensión arterial en adultos mexicanos en condición de vulnerabilidad fue de 49.2% (46.8% en mujeres y 52.2% en hombres) [Goulus y cols., 2008]. De acuerdo con estas cifras de 2016 al 2018, los hombres con factores de riesgo para síndrome metabólico han incrementado.

Por su parte, el INEGI estima que un 40% de las muertes en México se deben a alguna enfermedad relacionada con el síndrome metabólico: diabetes mellitus (15%), enfermedades isquémicas del corazón (13.4%), enfermedades del hígado (5.4%) y eventos cerebrovasculares (5.2%). Más grave aún, a pesar de su relevancia en la salud pública, el síndrome metabólico es desconocido por gran parte de la población (ENSANUT, 2018).

5. Hipótesis

Hipótesis alternativa (Ha)

La concentración de zinc y la expresión de los transportadores Zip14 y ZnT1 se ve alterada en testículos de rata de la cepa Wistar, al generar síndrome metabólico a partir del consumo de diferentes dietas.

Hipótesis nula (H0)

La concentración de zinc y la expresión de los transportadores Zip14 y ZnT1 no se ve alterada en testículos de rata de la cepa Wistar, al generar síndrome metabólico a partir del consumo de diferentes dietas.

6. Objetivos

Objetivo general

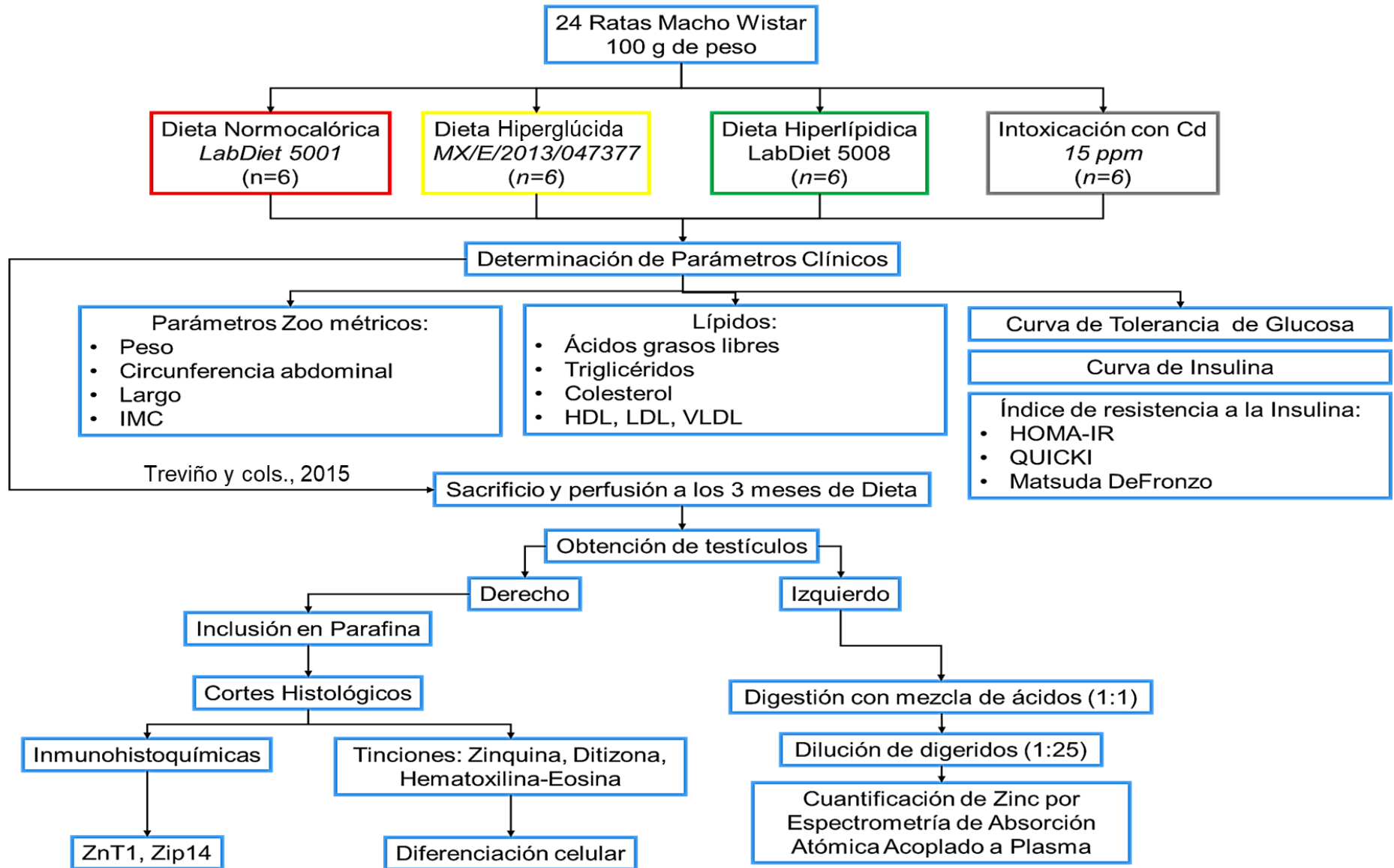
Evaluar el efecto del síndrome metabólico sobre la expresión de los transportadores Zip14, ZnT1 y la concentración de zinc en testículo de rata.

Objetivos específicos

En los distintos modelos de síndrome metabólico:

1. Establecer tres modelos del síndrome metabólico en rata cepa Wistar.
2. Evaluar el efecto del síndrome metabólico sobre los niveles de zinc en testículo.
3. Determinar cómo afecta el síndrome metabólico la expresión de ZnT1 y Zip14 en testículo.
4. Determinar si hay cambios histológicos en el testículo de rata con síndrome metabólico,

7. Diagrama de trabajo



8. Diseño experimental

8.1. Tipo de estudio

8.1.1. Experimental, exploratorio, analítico, cuantitativo, transversal.

8.2. Tipo de muestreo

8.2.1. Aleatorio simple.

8.3. Universo del trabajo

8.3.1. 24 ratas cepa Wistar macho, con aproximadamente un peso de 100 g.

8.4. Muestra

8.4.1. 24 ratas cepa Wistar: testículos.

8.5. Criterios de selección

8.5.1. Criterio de inclusión

8.5.1.1. Ratas macho, cepa Wistar, con aproximadamente un peso de 100 g.

8.6. Criterios de exclusión

8.6.1. Ratas macho diferentes a la cepa Wistar, ratas enfermas, ratas hembra, ratones macho.

8.7. Criterios de eliminación

8.7.1. Ratas enfermas durante la administración de la dieta, ratas que presenten un padecimiento ajeno a síndrome metabólico al finalizar la administración de la dieta.

8.8. Variables

8.8.1. Independientes

8.8.1.1. Edad (no mayores a 5 meses), sexo: machos.

8.8.2. Dependientes

8.8.2.1. Concentraciones de zinc en testículos, número de células germinales por túbulo seminífero, distribución de zinc intracelular y en compartimentos.

9. Metodología

9.1. 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; 24 ratas Wistar macho recién destetadas que, al alcanzar aproximadamente 100 g de peso, se dividieron en cuatro grupos:

- Grupo Control o con “Dieta normocalórica” ($n=6$) las cuales fueron alimentadas con dieta estándar (LabDiet 5001) y agua *ad libitum*;
- “Dieta hiperglúcida” ($n=6$) donde la dieta que se proporcionó se encuentra patentada y ésta permite inducir el síndrome metabólico al objeto de experimentación (MX/E/2013/047377) y agua *ad libitum*,
- “Dieta hiperlipídica” ($n=6$) donde la dieta a proporcionar es rica en lípidos (LabDiet 5008) y agua *ad libitum*,
- “Dieta normocalórica con acceso a agua con 15 ppm de CdCl_2 ”.

Estas condiciones de alimentación se mantuvieron el tiempo de inducción del síndrome metabólico, con una duración de 3 meses, en una caja de policarbonato, la cual fue acondicionada con una cama de aserrín limpio, se mantuvieron a una temperatura (22 °C) controlada y ciclos de luz oscuridad de 12 horas. Después de transcurridos los tres meses de dieta, se obtuvieron los testículos a partir del sacrificio de las ratas; con el siguiente procedimiento: las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/Kg), y se perfundieron a fondo con solución salina isotónica (8.5 g de NaCl/L), posteriormente las muestras se almacenaron en condiciones adecuadas hasta su análisis.

9.2. Parámetros metabólicos

A los tres meses de la administración de las dietas hipercalóricas y con cadmio, se realizó la determinación de parámetros metabólicos, de los cuales se incluyeron: 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, 60 y 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.

9.3. Cuantificación de Zinc en testículo

Se utilizaron 500 mg de tejido y se colocaron en una mezcla de ácido nítrico (15.6 M) y ácido perclórico (50%) en una relación 1:1, dicha mezcla se incubó a 37 °C por 5 días en un baño seco AccuBlock (Labnet) hasta que estuvo totalmente digerido el tejido. Posteriormente, el digerido fue diluido con agua desionizada en relación 1:25. El zinc presente en las soluciones fue determinado con un espectrómetro de emisión óptica de flama acoplado a flama inductivamente (Varian 730-ES ICP), el cual se calibrará con soluciones estándar de $ZnCl_2$ con concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 ppm; la concentración final del metal se obtendrá mediante la interpolación de la absorbancia de las muestras en la curva de calibración [Violeta Aburto y cols., 2016].

9.4. Tinción con Hematoxilina Eosina

Los portaobjetos con cortes de tejido a 8 μm fueron calentados a 60°C por 30 minutos para desparafinar y en seguida se colocaron en xilol para eliminar los restos de parafina.

Una vez desparafinadas las muestras, se estandarizaron las condiciones para definir los tiempos adecuados de cada colorante, se inició con hematoxilina, colorante que tiñe núcleos de las células y estructuras ácidas, el exceso de colorante se retiró con enjuagues de agua corriente, posteriormente se dio un baño por alcohol ácido, decolorando el exceso de hematoxilina, se enjuagó con agua corriente y se dio un baño en carbonato de litio para neutralizar y hacer virar la hematoxilina, se enjuagó con agua corriente y se procedió a contrastar los tejidos

con eosina, después se deshidrataron las muestras en una serie de alcoholes de menor a mayor concentración, empezando con alcohol al 96% hasta llegar a alcohol absoluto, finalmente se aclararon las muestras con xilol, se montaron con resina y se colocó un cubreobjetos para ser observadas con microscopio óptico (LEICA ICC 50 HD). El análisis de las fotomicrografías capturadas se realizó mediante un software llamado Image J.

9.5. Tinciones de zinquina y ditizona

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 aplicará a los tejidos contenidos en los portaobjetos cortados a 8 μm durante 40 minutos, después las muestras fueron lavadas tres veces con agua desionizada para remover el exceso de zinquina, se dejaron secar y finalmente se les adicionó medio de montaje (Vectashield). La fluorescencia de zinquina se visualizó por microscopia de fluorescencia (Olympus BX41) con una longitud de onda de excitación de 351-358 nm y una de emisión a 460 nm. El análisis de las fotomicrografías capturadas se realizó mediante el software Image J.

Para la tinción de ditizona se ocuparon 100 μg de ditizona (sigma) y se disolvieron en acetona, a la cual se le adicionó un volumen igual de agua libre de zinc. Los portaobjetos con los cortes de tejido a 8 μm fueron expuestos por 30 minutos, seguido por lavados de agua desionizada, estos se dejaron secar y se cubrieron con cubreobjetos y finalmente fueron observados con microscopio óptico (LEICA ICC 50 HD). El análisis de las fotomicrografías capturadas se realizó mediante el software Image J [Franklin y cols., 2012].

9.6. Cuantificación de células germinales

La identificación se basó en la descripción de los detalles citológicos de las células germinales proporcionados por Mancini y cols., 1965, que se resume en la tabla 3.

Tipo celular	Característica morfológica
Células de Sertoli	Núcleo polimorfo con membrana nuclear plegada; nucléolo grande que muestra núcleo esférico y flecos irregulares.
Espermatogonia tipo A (Pálida)	Núcleo ovoide con cromatina finamente granular uniforme; uno o más nucléolos, libres de cromatina, generalmente cerca de la membrana nuclear.
Espermatogonia tipo A (oscura)	Núcleo esférico u ovoide con cromatina homogénea densa y profundamente teñida; una o más cavidades claras en la masa de cromatina que frecuentemente contiene el nucléolo.
Espermatocito primario	Gránulos de cromatina bien teñidos distribuidos por todo el núcleo; nucléolo cubierto de cromatina.
Espermatocito secundario	Son más pequeños, tienen una vida útil muy corta y rara vez se ven, pueden localizarse presuntivamente en el compartimento adluminal.
Espermátida	Células esféricas o poligonales pequeñas con núcleos condensados (oscuros).

9.7. Inmunohistoquímica

La recuperación antigénica fue realizada con Diva Decloaker (Biocare Medical) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, después 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) 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 toda la noche

con el anticuerpo primario en una cámara húmeda; la detección del anticuerpo primario se realizó tras la incubación con un anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, 1:200, Abcam) por 2 h en cámara húmeda. La deposición de un producto marrón significa la presencia de las moléculas, esta se desarrolla utilizando un tampón DAB Betazoide (Biocare Medical). El análisis de las fotomicrografías capturadas se realizó mediante el software Image J.

9.8. Análisis de datos

Los resultados obtenidos por grupo de estudio se compararon en cada variable de respuesta individualmente frente al grupo control, mediante una prueba “t” de Student, los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a un nivel de $p < 0.05$

9.9. Implicaciones éticas

9.9.1. Medidas de seguridad

Todos los procedimientos descritos en este estudio se realizaron de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Consejo Mexicano para el Cuidado de los Animales NOM-062-ZOO-1999. Dolor mínimo y malestar de los animales se aseguraron en este estudio.

10. Resultados

10.1. Establecimiento del modelo de síndrome metabólico

10.1.1. Parámetros zoométricos

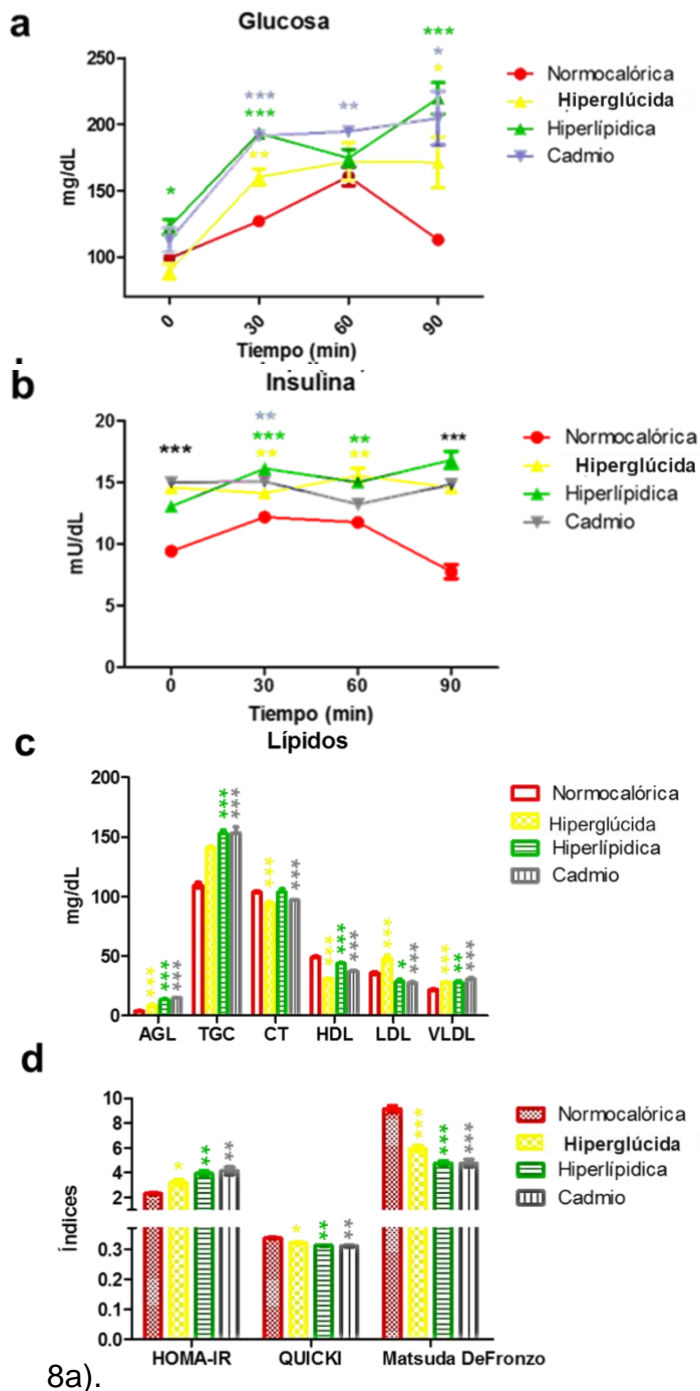
Posterior al consumo de los diferentes tipos de dieta y el consumo de agua con cadmio en cada uno de los grupos experimentales, se evaluaron parámetros zoométricos, los cuales permitieron poner de manifiesto la sospecha de alteraciones metabólicas para confirmar la presencia de SMet (Tabla 4). Con base a los resultados obtenidos, en las ratas con dieta hiperglúcida se encuentran mayores diferencias estadísticamente significativas en cuanto al peso, circunferencia abdominal e IMC.

Parámetros	Dieta			
	Normocalórica	Hiperglúcida	Hiperlipídica	Cadmio
	LabDiet5001	MX/E/2013/047377	LabDiet5008	15 ppm
Peso (g)	395.33 ± 10.26	313.16 ± 5.66***	401.33 ± 14.35	367.33 ± 17.98
Circunferencia abdominal (cm)	19.66 ± 0.36	17 ± 0.36 ***	20.83 ± 0.40	20 ± 0.36
Largo (cm)	23.58 ± 0.15	23.41 ± 0.20	24.33 ± 0.21	24.08 ± 0.30
IMC (g/cm ²)	0.71 ± 0.01	0.60 ± 0.01*	0.67 ± 0.01	0.63 ± 0.01

Tabla 4. Cada dato esta expresado como Media ± Error Estándar de la Media y la diferecia estadística fue determinada con la prueba *t de Student* de datos no pareados. Los asteriscos indican la diferencia estadística entre el grupo normocalórico contra los demás grupos, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

10.1.2. Parámetros metabólicos

Obteniendo los parámetros zoométricos se apreció la conformación corporal de los grupos de estudio, que, en conjunto con los marcadores metabólicos proporcionan la información necesaria para diagnosticar SMet, los parámetros metabólicos evaluados en condiciones de ayuno fueron glucosa, insulina, índices de resistencia a insulina, ácidos grasos libres, triglicéridos, colesterol total, lipoproteína de alta densidad, lipoproteínas de baja y muy baja densidad.



8a).

Figura 8. Validación metabólica del Síndrome metabólico. a) Tolerancia Oral a la Glucosa (n=3), b) Respuesta Insulínica a glucosa (n=3), c) Perfil lipídico (n=6), d) índices de resistencia a insulina (n=3). Los datos son expresados como la Media \pm Error Estándar de la Media. Los asteriscos indican la diferencia estadística entre el grupo Normocalórico contra los demás grupos, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; prueba *t* de Student. AGL (Ácidos grasos libres), TG (Triglicéridos), CT (Colesterol), HDL (Lipoproteína de alta densidad), LDL (Lipoproteína de baja densidad), VLDL (Lipoproteína de muy baja densidad).

Analizando los resultados se observó que las ratas alimentadas con la dieta hiperglúcida no mostraron cambios en la glucosa en suero en estado basal (Figura 8a), sin embargo, después de la carga oral de glucosa se evidenció un incremento significativo del 28% a los 30 min y a los 90 min del 59% con respecto al comportamiento glucémico del grupo alimentado con la dieta normocalórica. Para la dieta hiperlipídica, se observa una hiperglucemia, así como a los 30 y 90 min aumentando un 52% y 104%, respectivamente (Figura 8a). En cuanto al último grupo evaluado con consumo de cadmio se evidenció un incremento significativo después de la carga de glucosa del 52% manteniendo aumentado los niveles en un 30 y 77% en los minutos 60 y 90 (Figura

En lo que respecta a los niveles de insulina sérica (Figura 8b), para las tres condiciones experimentales se demostraron estados de hiperinsulinemia posterior al consumo de la carga glucémica, mostrando un incremento estadísticamente significativo del 66% en ratas con dieta hiperglúcida, 44% en ratas con dieta hiperlipídica y 66% en ratas con consumo de cadmio, respecto al grupo control.

Para corroborar la resistencia a la insulina se utilizó el modelo homeostático HOMA-IR, en donde se observa un aumento estadísticamente significativo del 50% para el grupo con dieta hiperglúcida y 100% para los otros dos grupos, respecto al control, para diferenciar la falta de sensibilidad o la resistencia a la insulina se utilizaron los dos índices restantes, Matsuda De Fronzo donde se evidenció una disminución del 12 al 17% y en el de QUICKI del 30 al 33% en todos los modelos de estudio, observando que la dieta hiperlipídica y con consumo de cadmio mostraron similitud en su comportamiento (Figura 8d).

Al confirmar con los parámetros anteriores que los modelos presentan hiperglucemia, resistencia y disminución de la sensibilidad a la insulina, con base al perfil lipídico evaluamos la presencia de dislipidemia, en el que se evidenció un incremento estadísticamente significativo de los ácidos grasos libres (AGL) en los tres modelos de estudio, de un 40% en la dieta hiperglúcida y del 140% en las otras dos, en cuanto a la concentración de triglicéridos (TG) se observó un aumento significativo del 31% en el grupo con dieta hiperglúcida, y en la dieta hiperlipídica y con cadmio de un 36% (Figura 8c). Por otro lado, no se presentó un cambio estadísticamente significativo en los niveles de colesterol de los grupos experimentales, pero si una baja en las fracciones de colesterol para las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en las tres dietas del 10 al 30%, al medir lipoproteínas de baja densidad (LDL) se encontró un incremento en la dieta hiperglúcida del 22%, y una disminución para la dieta hiperlipídica y con cadmio del 11%, finalmente para las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) las tres dietas mostraron un incremento estadísticamente significativo del 20 al 30%, evidenciando alteración lipídico en los tres grupos de estudio (Figura 8c).

Con este conjunto de datos zoométricos y metabólicos se demostró que los sujetos de experimentación presentaban alteraciones similares al síndrome metabólico en humanos, de acuerdo con las referencias normativas mexicanas para el diagnóstico de síndrome metabólico (Tabla 2).

10.1.3. Cuantificación de zinc testicular

Para determinar si en el Smet generado en las ratas con los diferentes modelos se ve afectada la concentración de zinc en testículo, se realizó la cuantificación del metal en el órgano completo (Figura 9a), el cual mostró un incremento estadísticamente significativo solamente en la dieta hiperlipídica del 25% respecto al grupo normocalórico. Por otro lado, a consecuencia del consumo de cadmio en uno de los grupos, también se realizó la cuantificación de este metal en testículo de las ratas del grupo de cadmio y se observó un incremento estadísticamente significativo del 300% con respecto al grupo normocalórico (Figura 9b).

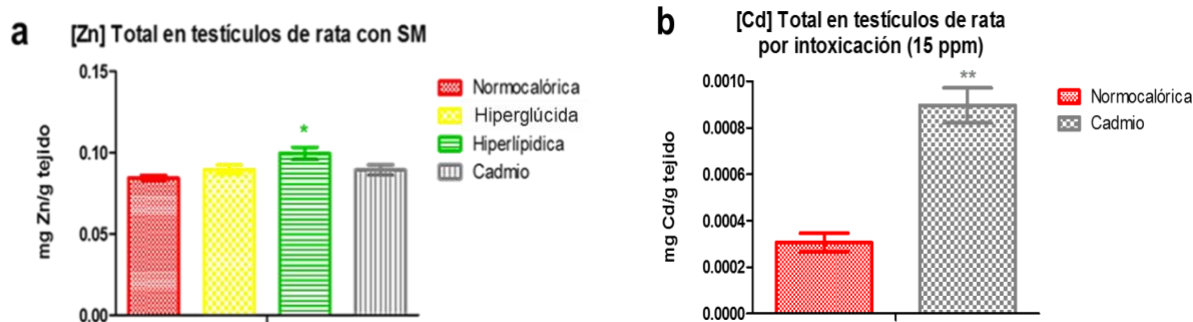


Figura 9. Efecto del síndrome metabólico sobre la concentración de zinc en tejido testicular. Las barras representan la media \pm EEM de 6 experimentos independientes; Prueba *t de student*, (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

10.1.4. Distribución intracelular de zinc

10.1.4.1. Localización de zinc total

Para evaluar el efecto del síndrome metabólico sobre el zinc intracelular se realizaron cortes histológicos de 8 μm de grosor, que fueron teñidos con ditizona; esta tinción se realiza para evidenciar el zinc total presente en las células y la capacidad de almacenamiento de zinc intracelularmente, las fotomicrográficas del corte histológico de testículo (Figura 10a) mostraron una disminución estadísticamente significativa entre el 14% y 22% en las tres dietas (Figura 10b),

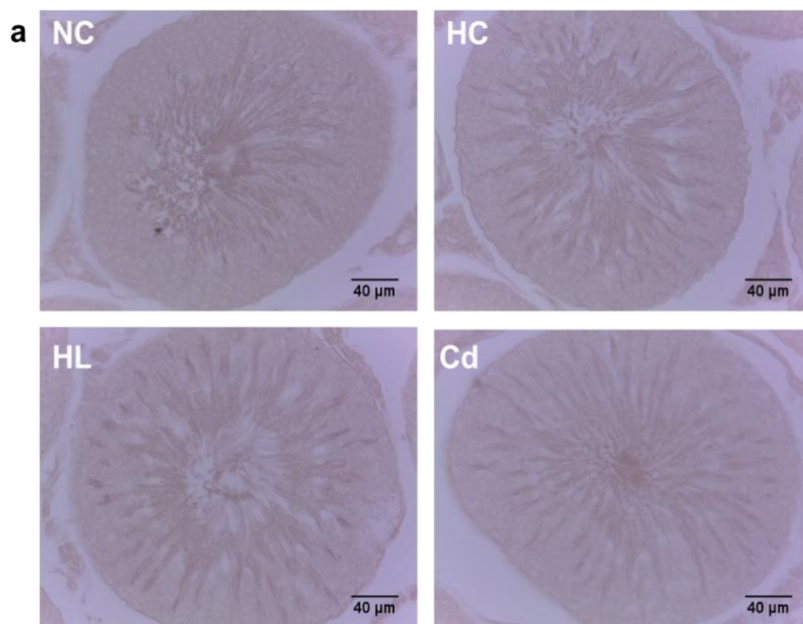
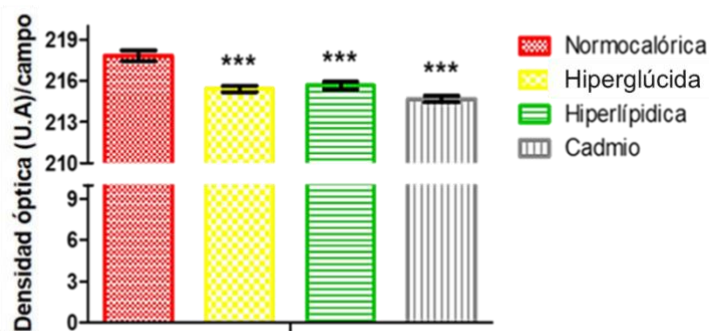


Figura 10. Efecto del Síndrome metabólico sobre el Zn^{2+} total en tejido testicular. a, Tinción con ditizona. b, Análisis densitométrico del Zn^{2+} . Cada punto representa la media + SEM de 3 experimentos independientes. El asterisco (***) indica diferencia significativa con respecto al grupo normocalórico, $p \leq 0.001$, prueba *t de Student*. Magnificación 40X.

b Análisis densitométrico de testículo con Ditizona



10.1.4.2. Localización de zinc libre

Para evaluar los niveles de zinc débilmente unidos a proteínas se realizó la tinción con Zinquina, que por su capacidad de permear la membrana celular y su alta especificidad permite visualizar a partir de fluorescencia las concentraciones nanomolares de zinc intracelular débilmente unido a proteínas. Las fotomicrográficas (Figura 11a) muestran una disminución en la marca fluorescente de Zn^{+2} a una emisión de 460 nm del grupo de dieta hiperglúcida e hiperlipídica, mientras que el grupo de cadmio muestra una misma marca fluorescente para Zn^{+2} , respecto al grupo control. El análisis densitométrico de las fotomicrográficas (Figura 11b), muestra una disminución estadísticamente significativa en el nivel de Zn^{2+} débilmente unido a proteínas del 7% en las dietas altas en carbohidratos y lípidos.

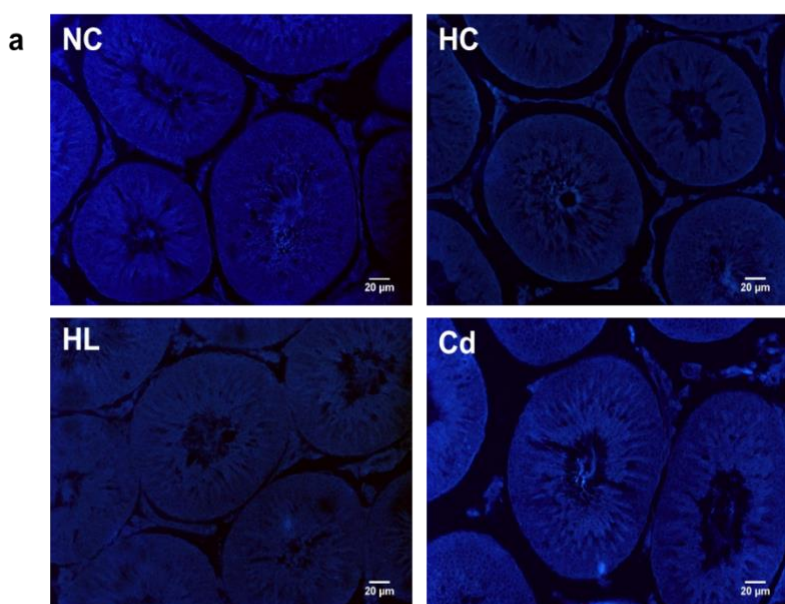
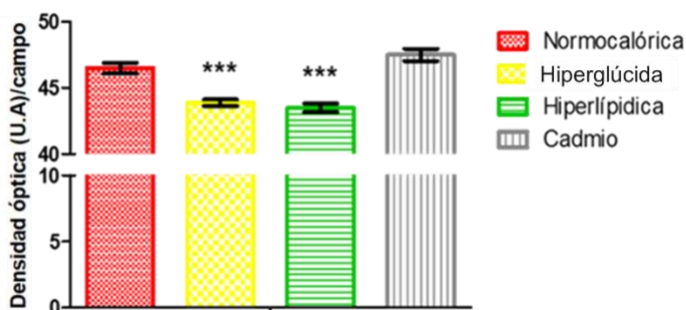


Figura 11. Efecto del síndrome metabólico sobre el Zn^{2+} libre en tejido testicular. a, Tinción de zinquina. b, Análisis densitométrico del Zn^{2+} . Cada punto representa la media + SEM de 3 experimentos independientes. El asterisco (***) indica diferencia significativa con respecto al grupo normocalórico, $p \leq 0.001$, prueba t de Student. Magnificación: 20X

b Análisis densitométrico de testículo con Zinquina



10.1.5. Evaluación de la expresión de Zip14 mediante inmunohistoquímica

Para determinar la expresión de Zip14 en las ratas con síndrome metabólico, la evaluación se realizó mediante inmunohistoquímica. Las fotomicrografías revelan un precipitado color marrón 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 no fue localizada en espermatogonias y espermatocitos primarios, sin posibilidad de diferenciar su estadio de maduración del grupo normocalórico y en el caso de los grupos con síndrome metabólico se presenta una disminución de la inmunorreactividad a nivel de membrana celular (Figura 12a). Esta marca inmunorreactiva fue corroborada a partir de la densidad óptica de las fotomicrografías, que fue dividida entre el número de células por campo para obtener la inmunorreactividad promedio de cada célula (Figura 12b), evidenciando la disminución en un 3% para las tres dietas.

La identificación celular fue presuntiva según las células ubicadas en los diferentes compartimentos del túbulo seminífero (Figura 6).

10.1.6. Evaluación de la expresión de ZnT1 mediante inmunohistoquímica

El impacto generado por el síndrome metabólico sobre la expresión de ZnT1 fue evaluado por ensayos inmunohistoquímicos. La marca marrón del precipitado antígeno-anticuerpo fue localizada a nivel de citoplasma de las células de mayor maduración en el túbulo seminífero del grupo normocalórico (Figura 13a), y en el caso solo el grupo con dieta hiperlipídica presentó un incremento del 2% de la inmunorreactividad, a nivel de citoplasma de las células de mayor maduración (Figura 13b).

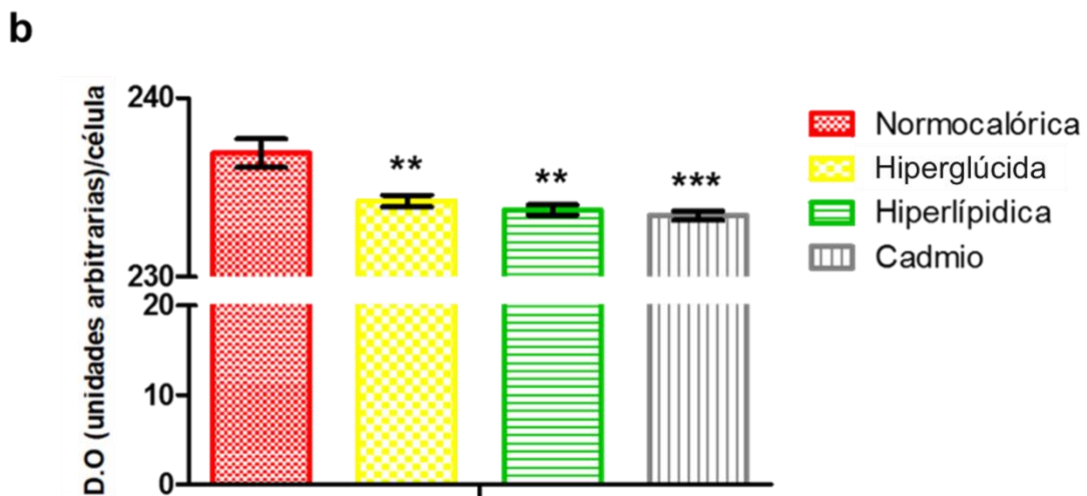
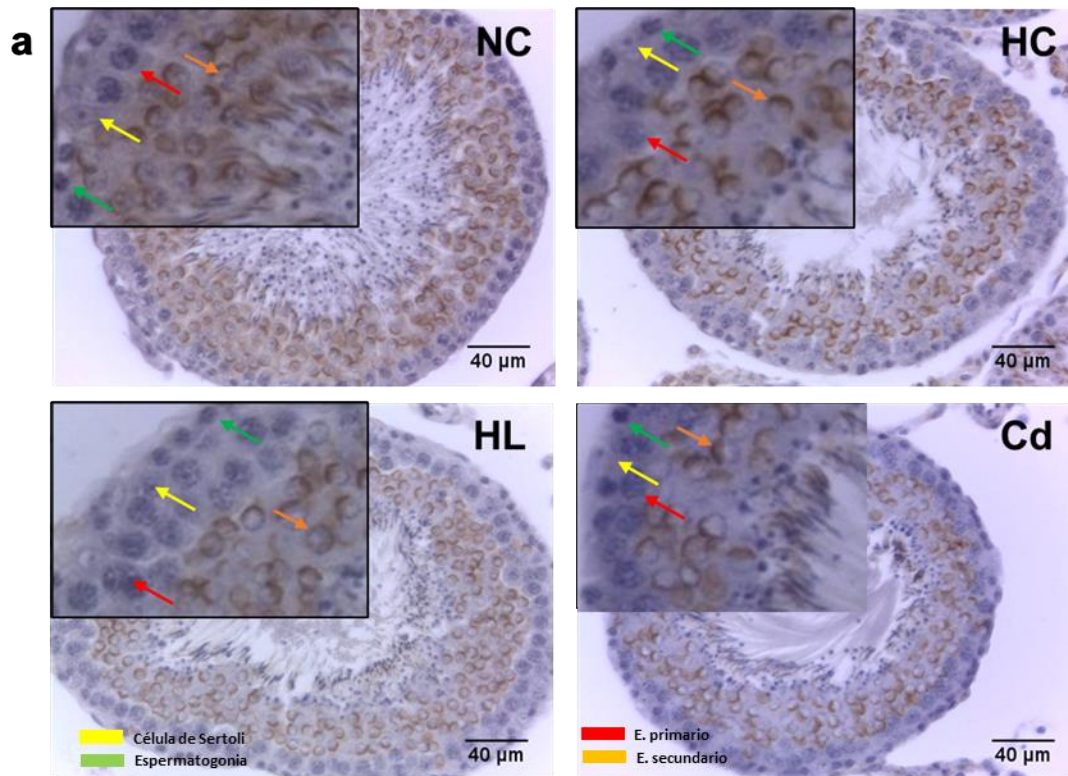
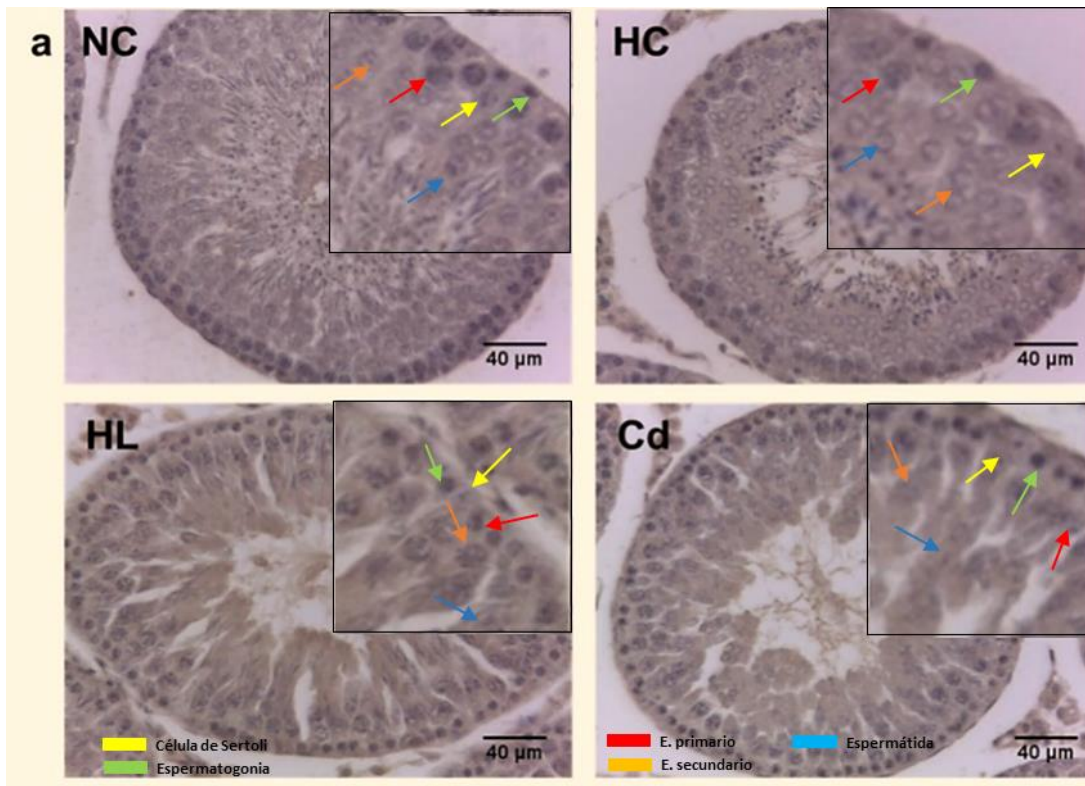


Figura 12. Detección inmunohistoquímica de la expresión de Zip14 durante el síndrome metabólico. a, Fotomicrografías representativas muestran la inmunorreactividad para Zip14 (precipitado café). b, Análisis densitométrico de la inmunorreactividad de Zip14 generada por célula. Cada punto representa la media + EEM de 50 campos diferentes. Los asteriscos (**) indican la diferencia significativa con respecto al grupo normocalórico, $p \leq 0.01$, prueba t de Student. Magnificación: 40X.



b

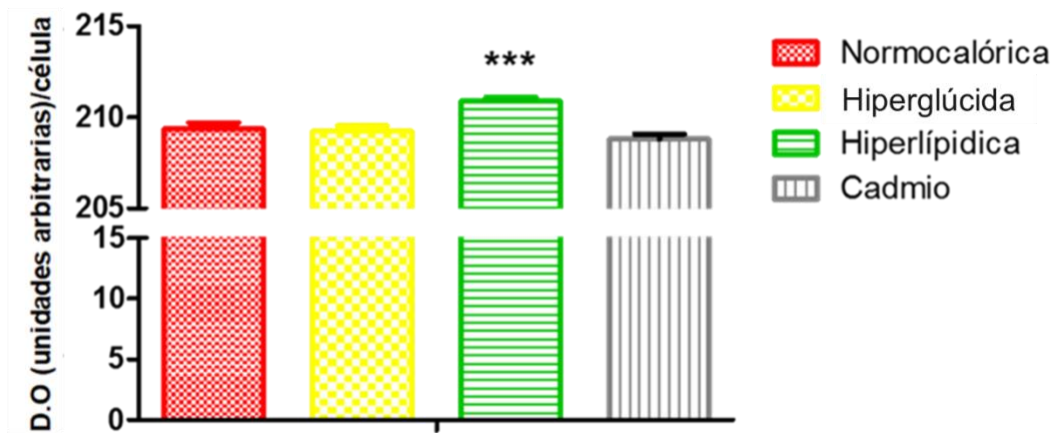


Figura 13. Detección inmunohistoquímica de la expresión de ZnT1 durante el síndrome metabólico. *a*, Fotomicrografías representativas muestran la inmunoreactividad para ZnT1 (precipitado café). *b*, Análisis densitométrico de la inmunoreactividad de ZnT1 generada por célula. Cada punto representa la media \pm EEM de 50 campos diferentes. Los asteriscos (***) indican la diferencia significativa con respecto al grupo normocalórico, $p \leq 0.001$, prueba *t de Student*. Magnificación: 40X.

10.1.7. Análisis histológico del túbulo seminífero

Para evaluar los cambios morfológicos generados por las alteraciones metabólicas se realizó una tinción de hematoxilina y eosina, mediante el conteo de los tipos celulares en diferentes grados de maduración que se presentan en el túbulo seminífero, se muestra una fotomicrografía representativa de cada grupo (Figura 14). El análisis estadístico (Figura 15) muestra una disminución significativa de células de Sertoli en las tres dietas de estudio en un 28%, así mismo, se ve afectada la cantidad de células espermatogonias solo de la dieta hiperglúcida disminuidas en un 20% y aumentados los espermatocitos primarios en las dietas hiperlipídica e intoxicación con cadmio en un 12%. En cuanto a los espermatocitos secundarios tanto en la dieta hiperlipídica e intoxicación con cadmio disminuyeron en un 22% y en la dieta hiperglúcida en un 12%, finalmente evaluando la cantidad de espermátidas se evidenció la disminución en las tres dietas, la hiperglúcida en un 27%, la hiperlipídica en un 16% y la de intoxicación con cadmio en un 20%.

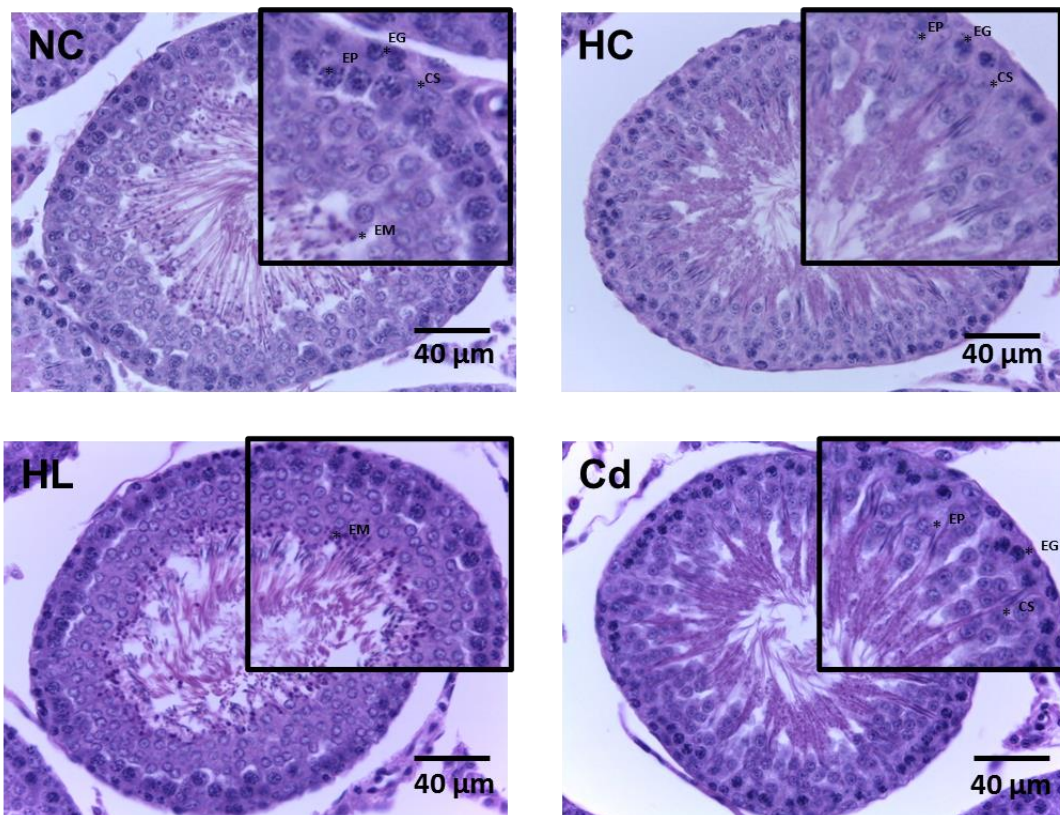


Figura 14. Distribución celular del túbulo seminífero. Fotomicrografías representativas de 100 campos del túbulo seminífero, donde se identifican diferentes tipos celulares, EG: Espermatogonia, EP: Espermatocito primario, ES: Espermatocito secundario, EM: Espermátida, CS: Célula de Sertoli. Magnificación 40X.

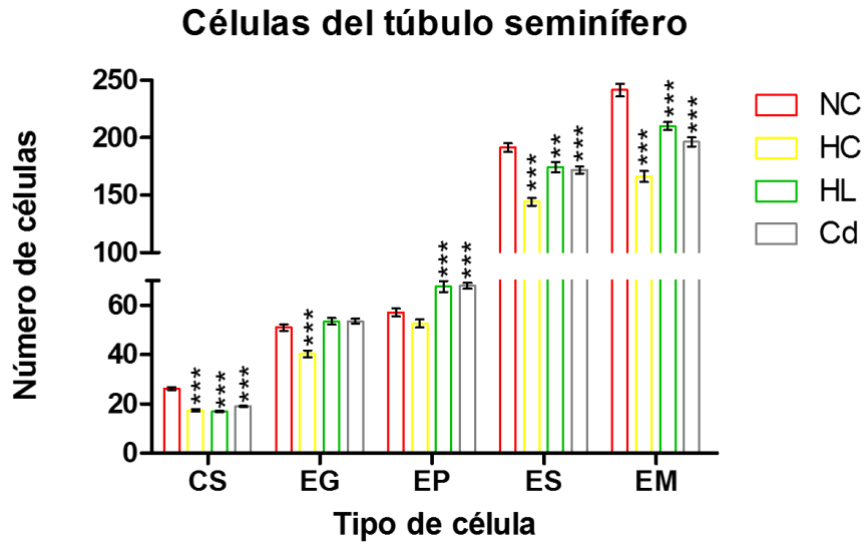


Figura 15. Análisis celular del túbulo seminífero de testículos de rata con síndrome metabólico, Células de Sertoli (CS), Espermatogonias EG), Espermatocitos primarios (EP), Espermatocitos secundarios (ES), Espermátidas (EM). Cada punto representa la media \pm EEM de 50 campos diferentes. Los asteriscos (***) indican la diferencia significativa con respecto al grupo normocalórico, $p \leq 0.001$, prueba t de Student.

11. Discusión

El desarrollo del SMet se caracteriza por un conjunto de trastornos fisiológicos y bioquímicos; disglucemia, obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión [Ford y cols., 2012], su etiología se basa en factores hereditarios o genéticos y ambientales, este último, resultado de hábitos dietéticos donde existe un consumo excedente de calorías con respecto a los requisitos metabólicos. Para inducir síndrome en los modelos, los sujetos experimentales se sometieron al consumo de dos dietas con alto contenido energético y una con un inductor diabetogénico; hipercalórica- hiperglúcida, hipercalórica- hiperlipídica y normocalórica- consumo de agua con Cd, durante tres meses. El comportamiento metabólico y zoométricos fue similar a los resultados publicados en el trabajo de Treviño y cols., en 2015, donde en el mismo periodo se logró la inducción de estas alteraciones semejando el síndrome metabólico en ratas parecida a la de humanos.

En la primer dieta hipercalórica-hiperglúcida fue donde se observaron mayores cambios significativos en los parámetros zoométricos, en cuanto a peso y circunferencia abdominal, ya que tendieron a la baja respecto al grupo control, se ha sugerido que los alimentos ricos en carbohidratos pueden influir en el equilibrio energético al reducir la ingesta de alimentos a través de mayores efectos de saciedad por activación de leptina [Stubbs y cols., 2001], añadiendo a esto, se desarrollan alteraciones del metabolismo de los carbohidratos y lípidos observados por los resultados en la curva de tolerancia oral a la glucosa y el perfil lipídico, con un aumento de TG y una baja concentración de HDL, y con la curva de insulina y los índices de resistencia y sensibilidad a la insulina, HOMA IR , Matsuda De Fronzo y QUICKI, se observa la generación de resistencia y pérdida de sensibilidad tisular de la insulina, a este nivel puede ser que la glucosa exógena o endógena alterada esté produciendo saturación de la vía glucolítica conllevando a una disfunción mitocondrial, inducción de enzimas productoras de ROS, daño generalizado de proteínas e intensificación de la inducción de NFKB entre otros mecanismos

subyacentes de la inflamación y el estrés oxidativo [Treviño y cols., 2015], además, paralelamente en la dieta hiperglúcida, la concentración de zinc presente es de 19 mg/kg , siendo menor a la concentración de zinc en la dieta normocalórica, esto, más las alteraciones metabólicas, puede generar una hipozinquemia [Toshiyuki y cols., 2014] siendo una de sus consecuencias, la falta de crecimiento en roedores y la disminución de circunferencia abdominal [Pour y cols., 1986].

En cuanto al grupo con alta ingesta de lípidos, en los parámetros metabólicos, desde el ayuno, se muestran cambios en la glucosa, característicos de una disglucemia, es importante mencionar que esta dieta es alta en lípidos respecto a la normocalórica, pero a su vez sigue conteniendo carbohidratos, lo que puede provocar un mayor daño celular. En sí, el consumo de lípidos contribuye a la disfunción del tejido adiposo y a la inflamación metabólica induciendo lipotoxicidad en los tejidos periféricos [Brien y cols., 2017], la elevada afluencia de ácidos grasos libres inhiben los efectos de la insulina sobre la lipólisis para provocar un aumento adicional de los ácidos grasos plasmáticos [Barnett y cols., 2013] y estos en hígado desencadenan la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y contribuye al desarrollo en cadena de la dislipidemia, demostrado por los resultados alterados de las lipoproteínas y bajas concentraciones de HDL. El consumo excesivo de grasa también desencadena la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos libres, lo que posteriormente conduce a un flujo excesivo de electrones utilizando el citocromo c oxidasa, aumentando la acumulación de ROS, propiciando inflamación y pérdida funcional [Pessayre y cols., 2001], a esto se le puede añadir la participación de los carbohidratos como agentes exacerbantes dentro de estos y otros mecanismos. Como resultado se observa la generación de resistencia y disminución de la sensibilidad de la insulina, pudiendo ser producida por los procesos anteriores consecuentes de la disglucemia y dislipidemia generada en este grupo de estudio.

La dieta normocalórica con una ingesta de agua con 15 ppm de Cd es considerada como el nivel sin efectos adversos observados según el trabajo de Treviño y cols en 2022, sin embargo, si se observaron eventos patológicos con esta

concentración, el mecanismo propuesto por el cual Cd genera alteraciones similares al Smet es que el intercambio entre metaloproteínas puede generar una cantidad de Cd libre que induce ROS [Buha A y cols., 2021]. Aunque el Cd no puede generar radicales libres directamente, se ha informado que las ROS aumentan después de la exposición al metal a través del complejo III mitocondrial mediante la acumulación de semiubiquinonas inestables, propensas a transferir un electrón al oxígeno molecular para formar superóxido [Alshehri y cols., 2020] que puede llegar a propiciar cambios en el metabolismo de la glucosa pudiendo causar la hiperglucemia observada por la curva de tolerancia oral a la glucosa en nuestro modelo. Por otro lado debido a las ROS, NF- κ B puede activarse, elevando la síntesis de novo de AG en los hepatocitos y la β -oxidación de ácidos grasos, pudiendo originar alteración en el metabolismo de los lípidos [Tsuchida y cols., 2015], que en nuestro grupo se refleja por los niveles alterados de las lipoproteínas. Asimismo, el Cd induce la producción de ROS en el hígado a través de las NADPH oxidasas e inhibición de enzimas antioxidantes como SOD y CAT alterando las vías metabólicas y/o mitogénicas de la insulina a través de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), desarrollando resistencia a la insulina [Newairy y cols., 2007], y con base a los resultados obtenidos se evidencia esa resistencia y disminución de sensibilidad de la insulina, comprobando con ello la desregulación generada por el Cd. Asimismo, se ha informado que en hígado la acumulación de Cd puede romper la homeostasis de metales esenciales como el zinc, lo que puede estar pasando también en testículo, ya que el zinc tiene efectos antioxidantes a través de activación e inhibición de factores de traducción y actividad de enzimas antioxidantes en general [Wellenreuther y cols., 2009].

De acuerdo con los criterios establecidos por la OMS para diagnosticar Smet en humanos; glucosa en ayunas elevada, aumento de TG, disminución de HDL, índice de masa corporal aumentada, y resistencia a la insulina, los tres grupos experimentales cumplen con al menos tres criterios suficientes para afirmar que los modelos adquirieron alteraciones metabólicas similares al Smet en humanos, pudiendo ser aptos para evaluar la distribución y comportamiento del zinc a nivel testicular.

Este metal normalmente tiene funciones multifactoriales y también funciones importantes ante alteraciones metabólicas, abarcando entre ellas, la regulación de enzimas gluconeogénicas, inhibición de factores de traducción y aumento de la actividad de la vía de señalización de la insulina (Puertollano y cols., 2011), hablando a nivel testicular este ha demostrado su importancia en varias etapas de la espermatogénesis y esteroidogénesis [Vera., 1991].

El zinc es adquirido a través de la dieta, y, una vez absorbido a nivel intestinal es distribuido por medio de las proteínas séricas; albumina y β -2 macroglobulina, además de aminoácidos como histidina y cisteína, se realiza su distribución hasta llegar al tejido diana (Cousins., 1985), una vez en tejido, el zinc total se puede encontrar unido a proteínas, que incluye en gran medida un conjunto que está ávidamente unido a motivos de dedos de zinc (ZFP), o como un pool de Zn lábil, o Zn biodisponible contenido dentro de vesículas intracelulares (zincosomas) [Haase y cols., 2007].

Este metal recobra una gran importancia en los procesos biológicos testiculares, como lo es la espermatogénesis, esta inicia mediante controles hormonales en el hipotálamo, desencadenando la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) desde la adenohipófisis. La LH ayuda con la esteroidogénesis al estimular las células de Leydig del intersticio, y la FSH estimula las células de Sertoli para ayudar en las etapas proliferativas [Rakesh., 2011], pero cuando hay presencia de síndrome metabólico puede ocasionar alteraciones endocrinas significativas hasta llegar a un hipogonadismo primario, demostrado por un estudio con ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en glúcidos en donde se evidencia una baja concentración sérica de testosterona, pero un aumento de la sensibilidad de la hormona luteinizante (LH) en células de Leydig (mediante la elevación de la expresión de los receptores de LH y la capacidad esteroidogénica) [Chiang., 2022]. Dicho mecanismo es una propuesta que explica por qué se encuentran concentraciones tisulares normales en la dieta hiperglúcida y consumo de agua con Cd, a pesar de la hipertrofia celular que están originando, esto, con base a los

resultados, puede ser por la estimulación aguda de las células de Leydig por la LH, ya que da como resultado la transferencia de colesterol a las mitocondrias, en parte a través de las acciones de la proteína reguladora aguda esteroideogénica (STAR) [Wang.,y cols 2017], que tiene relación directa con el zinc, dado a que la renovación del ARNm de STAR se ve reforzada por la proteína de dedos de zinc ZFP36L1, además, los niveles de ambas proteínas se regulan proporcionalmente [Haichuan., 2009], la razón por la que en la dieta hiperlipídica haya mayor concentración de zinc además de la inducción del receptor de LH, puede originarse por la alta demanda de la movilización de colesterol desde las gotitas de lípidos [Aghazadeh y cols., 2015] por lo que a mayor activación, mayor es el gasto de este metal en las células intersticiales, también, como los niveles de testosterona pueden encontrarse bajos se puede llegar a inducir la producción de un andrógeno más potente que sirve para amplificar la acción cuando los niveles de testosterona son bajos, la 5- α dihidrotestosterona, por la enzima 5 alfa-reductasa que es regulada por el zinc, propiciando aún más la presencia de este metal en el medio intersticial. Aunque los AG libres y el zinc compiten por el sitio de unión de la albúmina, su distribución se puede ver equilibrada dado a el transporte por aminoácidos y las necesidades del metal a nivel intersticial provocadas por la cantidad de lípidos almacenados [Barnett y cols., 2013].

Al evaluar los transportadores encargados de la dinámica del zinc, ya que estos impactan directamente en la ubicación de este metal, un importador de la familia SLC39A que fue estudiado es el ZIP14, este es el transportador de Zn que mayor respuesta muestra frente a una inflamación, Liuzzi en 2006 demostró que en los hepatocitos de ratón, se elevó la cantidad de ARNm y la cantidad de Zip14 en la membrana plasmática en presencia de interleucina 6 (IL6), sin embargo, en las células de los túbulos seminíferos de las tres grupos de estudio, la inmunorreactividad se vio disminuida a nivel de membrana celular, Sayadi en 2013 evaluó la regulación de Zip14 por NF κ B y demostró que este factor tiene un efecto inhibitorio en la expresión del gen del transportador Zip14 en macrófagos inducidos, pudiendo explicar la disminución de la inmunorreactividad de este transportador, y sincrónicamente la disminución de entrada de zinc a las células, reflejándose en los

resultados de los tres grupos de estudio con bajas concentraciones intracelulares. Las ratas con dieta hiperglúcida e hiperlipídica disminuyeron sus niveles de zinc libre pudiendo ser por la misma razón mencionada, pero en cuanto a la dieta de agua con Cd la inmunofluorescencia de zinc fue igual al grupo normocalórico, eso no quiere decir que el Zn se encuentre en una concentración normal, el análisis se realiza desde dos perspectivas con base a la similitud y competitividad de ambos metales ya que el Cd posee un orbital d^{10} completamente lleno, lo cual lo asemeja al Zn^{2+} , además Giedroc y cols en 2007 demostraron que la afinidad de Cd es alta en presencia de ligandos sulfúricos, por lo que el cadmio es más tiofílico que el propio zinc, además también puede formar enlaces covalentes e iónicos con átomos de azufre [Peacock y cols en 2013], con ello, hablando del segundo sistema redox independiente en el que el zinc zincosomal se une a solo un azufre por ion metálico [Wellenreuther y cols., 2009], cabe la posibilidad que el Cd este compitiendo por esos sitios de unión formando vesículas o complejos, es aquí en donde la metodología ocupada para la identificación de este zinc cobra relevancia ya que las sondas fluorescentes de zinquina pueden formar complejos fluorescentes con iones de cadmio [Merten y cols., 2009], entonces el poco zinc puede estar desplazado por el cadmio dentro de las células, y la sonda detecta a él poco zinc libre pero al mismo tiempo al Cd.

Hablando de la expresión del transportador ZnT1 exportador de la familia SLC30A, en la dieta hiperglúcida y consumo de agua con Cd, se observó inmunorreactividad en las células con mayor maduración pero no se encontró diferencia significativa respecto al control, al contrario que el grupo con dieta hiperlipídica en el que si hubo un aumento significativo de la inmunorreactividad, Jou y cols en 2009 demostraron que una deficiencia de Zn, similar a la que se encuentra en estos grupos de estudio, incrementan los niveles de expresión de ZnT1, como es el caso del grupo hiperlipídico, pero en los modelos con las otras dietas no se ven modificados, la explicación puede verse inmersa en la relación del daño e hipertrofia celular que está originando el Smet en el tejido testicular vs la requisición del metal, ya que al realizar el análisis histológico de los túbulos

seminíferos se mostró una disminución de células de Sertoli, espermatogonias, espermátidas secundarios y espermátidas.

Al hacer una retrospectiva en la espermatogénesis que se define como la transformación en donde las células primigenias del epitelio seminífero, espermatogonias (células diploides) originan por mitosis a los espermátidas primarios (células diploides) y éstos, por meiosis se convierten en espermátidas secundarios (células haploides), y en la segunda fase de la meiosis, originan a las espermátidas (células haploides), las cuales por transformación morfológica (espermiogénesis), originan a los espermatozoides (células haploides y flageladas) [César, 2015], aquí es en donde el zinc se ve involucrado en la mayoría los procesos; por un lado es activador de metaloenzimas antioxidantes, como es el caso de SOD, GPX5, factores de transcripción como Nrf2 necesarios para la inhibición de ROS originadas en el proceso y por otro lado funge como inhibidor específico sobre la oxidación del citrato al actuar sobre la aconitasa mitocondrial e inhibe el sistema de caspasa 3, 8 y el NFkB evitando la apoptosis celular [Foresta y cols., 2014], aunque una de las principales funciones, es en la condensación del ADN, regulando el cambio de cromatina desde la meiosis II en espermátidas secundarios, hasta la espermiogénesis, aquí el ADN se empaqueta en un estado altamente condensado mediante protamina-1 y protamina-2. Estas dos pequeñas proteínas son ricas en arginina, lo que les permite unirse al surco principal del ADN [Prieto y cols.,1997], y residuos de cisteína, aquí es en donde se cree que el Zn actúa como regulador de los enlaces cruzados de disulfuro en el núcleo del espermatozoide formando un número preciso de estructuras SH-Zn-SH [Aoki y otros,2006]. Por esta razón puede ser que, a pesar de la distrofia celular y las concentraciones bajas de zinc, los niveles de ZnT1 en los dos grupos sigan siendo normales en células con mayor maduración, ya que se trata de procurar el resguardo de acuerdo con las necesidades celulares de este metal con el fin de liberar la mayor cantidad de espermátidas posibles para su diferenciación y acondicionamiento final del espermatozoide.

Retomando la celularidad de los túbulos seminíferos en las diferentes dietas, se observa que el grupo con dieta hiperglúcida tiene un aumento en la destrucción celular, con una disminución de espermatogonias y el recuento de espermatocitos secundarios y espermátidas bajos, ya que son producto de la primera y segunda división meiótica, y es ahí en dónde el zinc ejerce efectos de condensación de ADN, al no estar presente en concentraciones adecuadas por la desregulación metabólica y por la dieta, propicia apoptosis celular por medio de mecanismos como activación de caspasas como se mencionó anteriormente. En cuanto al grupo con Cd podría ver un mecanismo propuesto por el cual se pueda ver moderada esta acción involucrando a una metaloproteína en específico, la metalotioneína (MT), que sirve como transporte y almacén de zinc, entre otras funciones, son la primera línea de defensa contra el Cd y otros metales divalentes debido a la competitividad del sitio de unión, ya que a través de sus grupos sulfhidrilo forman el grupo Cd-MT, en el que los tioles se oxidan, liberando su contenido de Zn y esta liberación en aumento activa el factor de transcripción 1 sensible al metal (MTF-1), que se une a los elementos de respuesta al metal y produce la consiguiente regulación positiva de la expresión del gen MT viéndose aumentadas proporcionalmente por la acumulación de Cd [Günther y cols., 2012], esto puede ayudar a que el daño celular no sea tan elevado, no obstante la expresión de esta proteína no fue evaluada, quedando solo como una alternativa, aunque por la misma toxicidad oxidativa, autofágica y apoptótica que el cadmio logra producir [Ali y cols., 2022], la disminución de zinc y utilización en otros procesos ya abordados, hace que no sea basto para continuar las divisiones meióticas, lo que puede hacer que los espermatocitos secundarios y espermátidas se vean disminuidas. En la dieta hiperlipídica las espermatogonias no mostraron diferencias significativas respecto al grupo control, pudiendo ser porque la energía transformada por las células de Sertoli en ATP proviene de lípidos, a través de la oxidación de ácidos grasos y éstos son las que brindan un microambiente adecuado para su proliferación [Xiong y cols., 2009], además de que se procuró en esta dieta el abastecimiento de zinc en los compartimentos dado por la sobreexpresión de los transportadores ZNT1 tratando de conservar el desarrollo de la celularidad germinal preservando aunque al no haber suficiente zinc ya que

las concentraciones intracelulares son bajas, los espermatocitos secundarios y espermatidas no logran la diferenciación celular adecuada, mostrando un déficit significativo.

Debido a los resultados en conjunto del trabajo realizado, en donde los transportadores Zip14 se ven disminuidos y los niveles extracelulares de zinc se observan normales e incluso altos, en un ambiente celular hipertrófico causado por alteraciones metabólicas, se propone un mecanismo adyacente a los ya abordados, contemplando el origen de una redistribución de zinc hacia los tejidos con mayor demanda debido a las concentraciones bajas de zinc que se puedan estar originando a nivel sistémico *per se* las funciones de control ante alteraciones metabólicas, ya que se tiene que considerar que el comportamiento celular y de los transportadores es independiente o coordinada a otros sucesos de la inflamación, y evaluando otras variables se puede llegar a comprender el comportamiento homeostático de zinc a nivel testicular.

12. Conclusión

1. Ingerir durante tres meses una dieta hiperglúcida, hiperlipídica y el consumo de 15 ppm de Cd en ratas de la cepa Wistar les genera un cuadro parecido al Síndrome metabólico humano.
2. La concentración de zinc en testículo total aumenta con el consumo de la dieta hiperlipídica, pero en los grupos que consumieron dieta hiperglúcida e hiperlipídica no hubo cambios; sin embargo, a nivel intracelular el zinc débilmente unido a proteínas disminuye en estos dos grupos, pero se mantiene en el grupo de ingesta de Cd; por otro lado, el zinc total disminuyó en los tres grupos.
3. El importador de zinc Zip 14 tiene una expresión baja a nivel de membrana plasmática en el epitelio germinal en los tres grupos evaluados; mientras que el exportador de Zinc ZnT1 solo sobre expresó en el grupo de dieta hiperlipídica.
4. Los tres modelos de estudio presentaron cambios significativos en la celularidad testicular con un comportamiento hipertrófico mayormente en Células de Sertoli, Espermatoцитos secundarios y Espermátidas.

13. REFERENCIAS

- Bafaro, Elizabeth; Liu Yuting; Xu Yan; Dempski, R. E. (2017). The emerging role of zinc transporters in cellular homeostasis and cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(17029).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.29>
- Barnett, J. P., Blindauer, C. A., Kassar, O., Khazaipoul, S., Martin, E. M., Sadler, P. J., & Stewart, A. J. (2013). Allosteric modulation of zinc speciation by fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(12), 5456–5464. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.028>
- Carlo Foresta, Andrea Garolla, Ilaria Cosci, Massimo Menegazzo, Marco Ferigo, Valentina Gandin, L. D. T. (2014). Role of zinc trafficking in male fertility: from germ to sperm. *Human Reproduction*, 29(6), 1134–1145.
<https://doi.org/10.1093/humrep/deu075>
- Croxford, T. P., McCormick, N. H., & Kelleher, S. L. (2011). Moderate Zinc Deficiency Reduces Testicular Zip6 and Zip10 Abundance and Impairs Spermatogenesis in Mice. *The Journal of Nutrition*, 141(3), 359–365.
<https://doi.org/10.3945/jn.110.131318>
- Cui, D., Naftel, J. P., Daley, W. P., Lynch, J. C., Haines, D. E., Yang, G., & Fratkin, J. D. (2001). *Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations* (First Edit).
- Downey, A. M., Hales, B. F., & Robaire, B. (2016). Zinc Transport Differs in Rat Spermatogenic Cell Types and Is Affected by Treatment with Cyclophosphamide. *Biology of Reproduction*, 95(1), 22–22.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140558>
- ENSANUT. (2018). *Sobrepeso y obesidad en población mexicana en condición de vulnerabilidad*.
- Giedroc, D. P., & Arunkumar, A. I. (2007). Metal sensor proteins: Nature's metalloregulated allosteric switches. *Dalton Transactions*, 29, 3107–3120.
<https://doi.org/10.1039/b706769k>
- Girijashanker, K., He, L., Soleimani, M., Reed, J. M., Li, H., Liu, Z., Wang, B., Dalton, T. P., & Nebert, D. W. (2008). Slc39a14 Gene Encodes ZIP14, A

- Metal/Bicarbonate Symporter: Similarities to the ZIP8 Transporter. *Molecular Pharmacology*, 73(5), 1413. <https://doi.org/10.1124/MOL.107.043588>
- Goulus, Dimitri G; Tarlatzis, B. C. (2008). Metabolic syndrome and reproduction: I. testicular function. *Gynecological Endocrinology*, 24(1), 33–39. <https://doi.org/10.1080/09513590701582273> [Indexed for MEDLINE]
- Hara, T., Takeda, T. aki, Takagishi, T., Fukue, K., Kambe, T., & Fukada, T. (2017). Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *Journal of Physiological Sciences*, 67(2), 283–301. <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0521-4>
- Himeno, S., & Fujishiro, H. (2019). Roles of Metal Transporters in Cellular Cadmium Transport in Mammals. *Springer*, 163–178. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3630-0_13
- Jou, M.-Y., Philipps, A. F., & Lönnerdal, B. (2010). Maternal Zinc Deficiency in Rats Affects Growth and Glucose Metabolism in the Offspring by Inducing Insulin Resistance Postnatally. *The Journal of Nutrition*, 140(9), 1621–1627. <https://doi.org/10.3945/jn.109.119677>
- 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>
- Lee, B.-K., & Kim, Y. (2013). Blood cadmium, mercury, and lead and metabolic syndrome in South Korea: 2005-2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *American Journal of Industrial Medicine*, 56(6), 682–692. <https://doi.org/10.1002/ajim.22107>
- Li, L., Xu, G., Shao, H., Zhang, Z. H., Pan, X. F., & Li, J. Y. (2017). Analysis of blood concentrations of zinc, germanium, and lead and relevant environmental factors in a population sample from Shandong Province, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/ijerph14030227>
- Liu, L. (2019). Applied Anatomy of the Scrotum and its Contents. In *Scrotoscopic Surgery* (pp. 1–8). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815008->

5.00001-7

- Liuzzi, J. P., & Cousins, R. J. (2004). MAMMALIAN ZINC TRANSPORTERS. *Annual Review of Nutrition*, 24(1), 151–172.
<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132402>
- Luz María Guzmán Salinas. (2018). *Cristalización de Insulina-Zn²⁺ - Insulina-Cd²⁺ y el estudio de su efecto biológico en ratas Wistar* [Benemérita Universidad Autónoma de Puebla].
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/bitstream/handle/20.500.12371/7370/700518TL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mancini, R. E., Rosemberg, E., Cullen, M., Lavieri, J. C., Vilar, O., Bergara, C., & Andrada, J. A. (1965). Cryptorchid and Scrotal Human Testes. I. Cytological, Cytochemical and Quantitative Studies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(7), 927–942. <https://doi.org/10.1210/jcem-25-7-927>
- Maremanda, K. P., Khan, S., & Jena, G. B. (2016). Role of Zinc Supplementation in Testicular and Epididymal Damages in Diabetic Rat: Involvement of Nrf2, SOD1, and GPX5. *Biological Trace Element Research*, 173(2), 452–464.
<https://doi.org/10.1007/s12011-016-0674-7>
- Maret, W. (2018). Metallomics: The Science of Biometals and Biometalloids. In *Metalómica* (Vol. 1055, pp. 1–20). Springer New York LLC.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-90143-5_1
- Park, J. H., Grandjean, C. J., Hart, M. H., Erdman, S. H., Pour, P., & Vanderhoof, J. A. (1986). Effect of pure zinc deficiency on glucose tolerance and insulin and glucagon levels. *The American Journal of Physiology*, 251(3 Pt 1), E273–8. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1986.251.3.E273>
- Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S., & Mehta, J. L. (2017). Metabolic syndrome: Pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. In *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* (Vol. 11, Issue 8, pp. 215–225). SAGE Publications Ltd.
<https://doi.org/10.1177/1753944717711379>
- S, S., SH, G., S, S., MA, S., & DA, S. (2021). Zinc, Zinc Transporters, and Cadmium Cytotoxicity in a Cell Culture Model of Human Urothelium. *Toxics*,

9(5). <https://doi.org/10.3390/TOXICS9050094>

Wang, S., Liu, G. C., Wintergerst, K. A., & Cai, L. (2016). Metals in Diabetes. In *Molecular Nutrition and Diabetes* (pp. 169–182). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801585-8.00014-2>

Wang, Y., Jia, X. F., Zhang, B., Wang, Z. H., Zhang, J. G., Huang, F. F., Su, C., Ouyang, Y. F., Zhao, J., Du, W. W., Li, L., Jiang, H. R., Zhang, J., & Wang, H. J. (2018). Dietary zinc intake and its association with metabolic syndrome indicators among chinese adults: An analysis of the China nutritional transition cohort survey 2015. *Nutrients*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/nu10050572>

Treviño, S., Waalkes, M., Flores, J.A., Leon, B.A., Aguilar, P., Brambila, B. (2015). Chronic cadmium exposure in rats produces pancreatic impairment and insulin resistance in multiple peripheral tissues. Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.07.010>