



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

“Análisis de metales en órganos de ratas wistar desnutridas”

T E S I S

Que presenta

ALMA ISABEL SANTOS DÍAZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de tesis:

FANIS MISSIRLIS

Ciudad de México

Agosto, 2019

AGRADECIMIENTOS

Toda investigación requiere siempre de la participación de un equipo de profesionales. Por eso de manera sencilla, pero sincera deseo expresar mi agradecimiento al Dr Fanis Missirlis quien fue mi mentor, la persona que me brindó la oportunidad de conocer y disfrutar de esta área. Gracias por su apoyo.

Al Dr Abraham Rosas que además de mi amigo siempre ha sido como un guía y consejero en este camino. Siempre buscando la manera de que descubra y crea en mis potenciales.

A mis asesores el Dr Ismael Jiménez y la Dra Malú Mendoza que a través de sus sugerencias y consejos me han permitido crecer y mejorar cada día.

A la maestra Claudia Valadez y el Dr Ernesto Alanís quienes sin saberlo crearon un profundo interés en mí de aventurarme en este camino.

Al Dr Marcos Nahmad por manifestarme su apoyo siempre que lo necesité.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, que hicieron muy amena esta etapa. Gracias por compartir muchos sentimientos y vivencias especiales. Carlos, Karen, Alonso, Gisela y Nicole gracias por su afecto sincero.

A mi familia: mis padres y hermanos que siempre me brindan su apoyo, amor y confianza. Gracias por creer en mí y apoyarme a donde quiera que vaya.

A Jordi Solís por su amor, su apoyo y paciencia. Gracias por tener siempre una palabra de aliento y darme esperanza en que todo saldrá bien.

A mi psicóloga Graciela, gracias por ayudarme cuando más lo necesité. Gracias por recordarme lo fuerte y valiente que puedo ser.

A Conacyt por el apoyo económico.

Infinitas gracias a todas aquellas personas que de una manera u otra contribuyeron al desarrollo de este proyecto que disfruto tanto.

DEDICATORIA

A Dios por nunca dejarme y siempre confiar en mí. Por hacer que las cosas siempre mejoren.

A mis hermanos: Elena, Aranza y Tony quienes son mi inspiración y modelo a seguir. Los amo

A mis padres, quienes siempre dan todo por nosotros, y de quienes me siento orgullosa.

A Jordi Solís mi apoyo incondicional.

CONTENIDO

	Página
Resumen.....	5
Abstract.....	6
I. Introducción.....	7
II. Justificación.....	11
III. Hipótesis y Objetivos.....	11
IV. Materiales y Métodos	
a) Animales.....	12
b) Colecta de muestras.....	14
c) Determinación de la concentración de metales (ICP-OES).....	16
d) Experimentos con el Sincrotrón de la Universidad de Stanford (EUA).....	17
e) Análisis estadístico.....	18
V. Resultados y Discusión	
a) Efecto de la restricción crónica de alimento sobre el peso corporal de las ratas experimentales.....	19
b) Análisis de la concentración de elementos en los órganos y tejidos de ratas control y experimentales.....	20
• Calcio.....	21
• Análisis de Ca y Zn en cortes de cerebro y médula espinal por microscopia de fluorescencia de rayos X.....	24
• Análisis de Mg, Na, K y P.....	26
• Acumulación de elementos en el páncreas de la rata desnutrida.....	29
• Análisis de los metales de transición: Fe, Mn, Cu y Zn.....	33
VI. Resumen y Conclusiones.....	41
VII. Anexo I. Resultados de Anova.....	44
VIII. Anexo II. Análisis de metales en el cerebro y médula espinal por microscopia de fluorescencia de rayos X.....	45
IX. Anexo III. Datos crudos obtenidos por ICP-OES	
• Calcio.....	48
• Cobre.....	49
• Hierro.....	50
• Potasio.....	51
• Magnesio.....	52
• Manganeso.....	53
• Sodio.....	54
• Fósforo.....	55
• Zinc.....	56
X. Referencias.....	57

RESUMEN

El principal objetivo del presente trabajo de tesis fue determinar la concentración de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P y Zn en tejido visceral (pulmones, riñones, hígado, páncreas, intestinos delgado y grueso), músculo esquelético y cardíaco (Extensor largo de los dedos - EDL, Soleo, Gastrocnemio y corazón), así como del sistema nervioso central (médula espinal y cerebro) de ratas machos y hembras mantenidos en condiciones de libre acceso a la comida (*ad libitum*) y en condiciones de restricción calórica crónica (desnutrición), esto es, alimentados con el 50% del alimento consumido por el grupo control. El protocolo de desnutrición comenzó 3 semanas antes de aparear a la madre y continuó durante la gestación, lactancia y después del destete, hasta los 60 días de edad posnatal, cuando las crías fueron sacrificadas. La concentración de minerales de los órganos disecados se determinó mediante Espectrometría de Emisión Óptica con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES). Los resultados muestran que no existen notables diferencias entre machos y hembras respecto a la concentración de metales en los órganos analizados. En los animales desnutridos crónicamente, solo algunos de los órganos extraídos de las ratas machos y hembras presentan alteraciones en los elementos analizados, siendo el páncreas desnutrido el único órgano que presentó un incremento en la concentración de todos los elementos. También se observó que la médula espinal de animales control presenta un contenido en promedio 10 veces mayor de calcio que el contenido en el cerebro de los animales control. En cambio, la médula espinal de los animales desnutridos presenta menor acumulación de calcio. Por otra parte, el Cu se encuentra más concentrado en el riñón, órgano clave para la desintoxicación de metales pesados, mientras que el Zn está en mayor concentración en el músculo sóleo (que contiene predominantemente fibras lentas y metabolismo oxidativo) pero no en los músculos EDL (con predominancia de fibras rápidas intermedias y metabolismo glucolítico-oxidativo) y Gastrocnemio (de fibras mixtas). Nuestros resultados permiten indicar que cada órgano contiene concentraciones particulares de cada uno de los minerales analizados y que la dieta restringida en cantidad, cubre apropiadamente las necesidades de minerales de los animales desnutridos.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the concentration of Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and Zn in the intestine (small and large), visceral organs (lung, kidney, liver, pancreas), muscles (skeletal muscles of various fiber types and heart) and the central nervous system (spinal cord and brain) of male and female rats maintained pre- and postnatally under *ad libitum* feeding conditions and under conditions of chronic caloric restriction at 50% of the food consumed by the control group. This malnutrition protocol began in females 3 weeks before mating and continued during pregnancy, lactation and after weaning to pups of both sexes until 60 days of postnatal age, when the offspring were sacrificed. The mineral concentration of the dissected organs was determined by optical emission spectrometry from an inductively coupled plasma source (PerkinElmer Optima 8300 ICP-OES). The results show that there are no notable differences between male and female rats with respect to the concentration of metals in the various organs analyzed. Only some of the organs extracted from male and female rats born and grown on a restricted diet presented alterations in the elements analyzed, with the pancreas being the only organ that presented an increase in the concentration of all the elements. In addition, we found that the spinal cord presents on average 10 times more calcium than the brain in control rats; the malnourished animals accumulated less calcium in their spinal cord. Cu concentrated in the kidney, the key organ that detoxifies heavy metals. Zn accumulated in the soleus muscle (of slow fibers and oxidative metabolism), but not in EDL (mainly containing intermediate fast fibers and glycolytic and oxidative metabolism) and Gastrocnemius (with mixed fibers) muscles. Our results indicate that each tissue shows characteristically distinct mineral concentrations and that in general the restricted diet covered the mineral requirements of the malnourished animals.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud reporta que en el año 2017, 821 millones de personas, uno de cada nueve habitantes de la población mundial padece hambre.¹ La desnutrición se define como el estado patológico ocasionado por la falta de ingestión o absorción de nutrientes. El 90% de los casos de desnutrición son ocasionados por la sub-alimentación del sujeto, bien sea por deficiencia en la calidad o en la cantidad de los alimentos consumidos. Este problema se asocia generalmente a la pobreza, ya que, en muchos países, las personas de clase socioeconómica baja tienen poco o ningún acceso a servicios de salud y educación y son más vulnerables a sufrir desnutrición.² Federico Gómez realizó en 1946 la primera clasificación de desnutrición con base al peso que el individuo debería tener, para su edad. Por lo tanto, es desnutrición de primer grado cuando la deficiencia de peso no pasa del 25% del peso en relación a la edad del individuo; de segundo grado cuando fluctúa entre el 25-40%; desnutrición de tercer grado a la deficiencia de peso del organismo más allá del 40%.² Actualmente también se utilizan las curvas establecidas en 2003 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para diagnosticar a un individuo con desnutrición.³ Los parámetros son un peso insuficiente respecto a la talla (emaciación), talla insuficiente para la edad (retraso en el crecimiento) y peso insuficiente para la edad (insuficiencia ponderal).⁴

En modelos animales los parámetros de desnutrición no están del todo definidos, por lo que se propone que la pérdida de peso corporal provocada por el consumo de aproximadamente el 50% de la ingesta promedio diaria de alimento provoca desnutrición severa en la rata^{5,6}. Con este protocolo de desnutrición se han estudiado los cambios que se presentan en la composición de tipos fibras presentes en el músculo extensor largo de la pata (EDL). Rosado y colaboradores (2013) muestran que en el músculo EDL de animales alimentados ad libitum (controles) presentan mayor proporción de fibras rápidas que los animales sometidos a dieta hipocalórica crónica (desnutridos) quienes presentan una mayor proporción de fibras intermedias y una ligera presencia de fibras lentas⁷⁻⁹ (Figura 1).

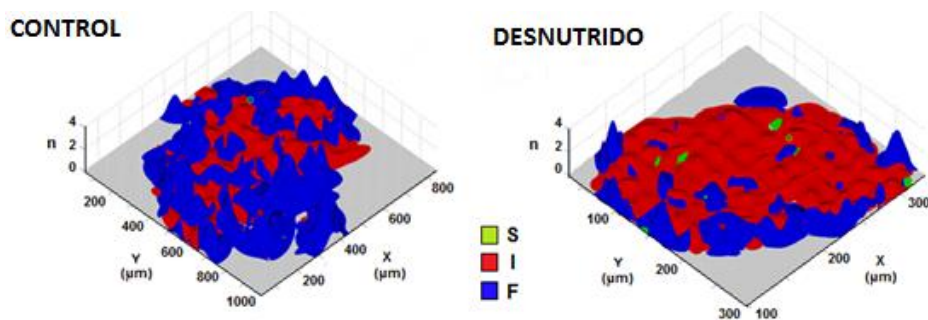


Figura 1. Distribución de fibras musculares en músculo EDL de machos de 60 días, control y desnutridos₉. Los animales control (izquierda) presentan mayor proporción de fibras rápidas (F), mientras que el desnutrido (derecha) contiene mayor número de fibras intermedias (I), sin cambios en la proporción de fibras lentas (S).

También con ese modelo animal de restricción alimenticia, Quiroz y colaboradores (2012)¹⁰ analizaron la posible relación existente entre la desnutrición y la despolarización presináptica de las fibras aferentes en la médula espinal, observando que los animales desnutridos presentan potenciales del dorso de la médula (CDP), particularmente de su componente positivo (onda P) y de raíz dorsal (DRP, por sus siglas en inglés) notoriamente menores que los observados en los animales control (Figura 2). Es conveniente señalar que tanto el componente positivo de los CDP y DRP resultan de la despolarización de aferentes primarias (DAP), la cual da origen a la inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisor en las terminaciones sinápticas de las fibras aferentes¹⁰.

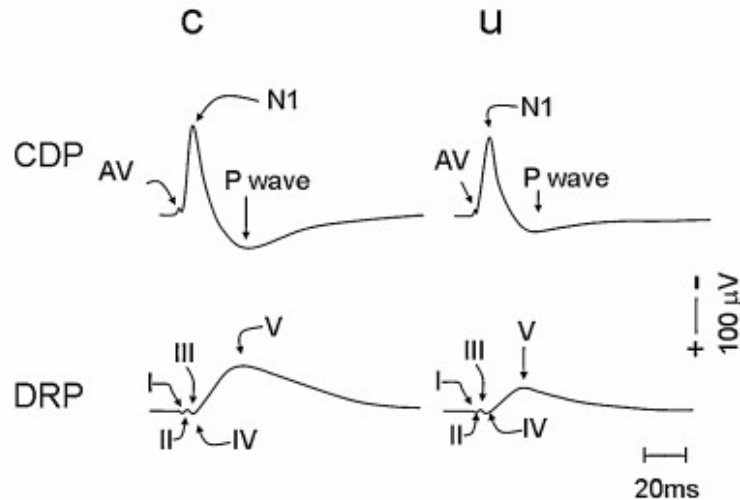


Figura 2. Potenciales del dorso de la médula (CDP) y de Raíz Dorsal (DRP) registrados en la médula espinal de ratas control o desnutridas crónicamente. Note la menor amplitud de los PDM y CDPs registrados en los animales desnutridos en comparación con los obtenidos en animales control.

Es frecuente que, en estudios de desnutrición en animales, se analicen los efectos de la restricción de hidratos de carbono, proteínas y/o lípidos (macronutrientes). Pero se debe de considerar también la relevancia al efecto de la ingesta insuficiente de vitaminas y/o minerales (micronutrientes). Para el organismo es indispensable cubrir los requerimientos adecuados de micronutrientes¹¹ algunos en miligramos (Ca, P, Na, K, Mg) o microgramos (Fe, Cu, Zn, Mn) por día¹². Los minerales funcionan como catalizadores en sistemas enzimáticos; en estructuras de proteínas o como reguladores iónicos de los microambientes celulares y extracelulares claves para procesos metabólicos¹²⁻¹⁴. Como ejemplos de la importancia biológica de los metales en el organismo están el calcio que participa en la contracción muscular¹⁵, en la liberación de neurotransmisores¹⁶, como segundo mensajero¹⁷ y como sello de las uniones adherentes¹⁸. Además, el hueso está formado por una matriz proteica que se mineraliza de forma mayoritaria con calcio¹⁹. Este elemento se encuentra principalmente en alimentos de origen animal como los lácteos. El sodio y potasio participan en el balance osmótico de la célula, en donde la concentración de sodio

es 10 veces mayor a nivel extracelular que intracelular y la concentración del potasio se encuentra 30 veces mayor a nivel intracelular que en el espacio extracelular; tal gradiente de concentración es mantenido gracias a la bomba de sodio-potasio²⁰. El sodio se encuentra presente en la mayoría de los alimentos mientras el potasio principalmente en frutas y cereales. El magnesio forma parte de la estructura del ATP activo²¹ y se encuentra principalmente en cereales y leguminosas. El manganeso forma parte de la estructura de enzimas como el superóxido dismutasa mitocondrial encargada de convertir los radicales superóxido a peróxido que posteriormente por otras enzimas se convertirá en agua y oxígeno, el manganeso se encuentra principalmente en cereales. El zinc es componente estructural en los dedos de zinc, dominios proteicos en factores de transcripción que median la interacción proteína-ADN²² este metal se encuentra principalmente en alimentos de origen animal, así como en las leguminosas. El cobre forma parte de estructuras proteicas como el citocromo c oxidasa de la cadena de transporte de electrones, este elemento se encuentra principalmente en alimentos de origen animal y cereales¹³. El hierro es parte del grupo hemo y cofactor de la hemoglobina, participando de esta forma en el transporte del oxígeno²³. Se conoce bien que el hierro se encuentra principalmente en carnes y leguminosas.

De todo lo anterior es evidente que, aunque los metales son clasificados como micronutrientes, por ser requeridos en cantidades menores que las proteínas, grasas y azúcares, son indispensables para las funciones fisiológicas del organismo y sus órganos, tejidos, células y complejos macromoleculares.

II. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad no existen estudios en donde se analice el metalóma de los diferentes órganos y tejidos de los animales desnutridos, por lo que se desconoce si esta condición de restricción alimenticia modifica la concentración de los metales en los tejidos de tales animales. En estudios previos se presenta la tendencia de analizar en animales normoalimentados por metalómica pocos órganos a la vez, por lo que es interesante realizar un estudio en el que se evalúe el metalóma de varios órganos y tejidos de ratas bien alimentadas o desnutridas para fines comparativos de la concentración de los elementos entre tejidos. Un estudio de tal naturaleza aportará además información comparativa sobre la condición de cada elemento en los animales desnutridos. Dada la importancia que tienen los metales en el metabolismo energético surge la cuestión de si al restringir al 50% la dieta de las ratas, cambian las concentraciones de metales en los órganos de las ratas desnutridas y si este efecto es dependiente del sexo de los animales.

III. HIPÓTESIS

La restricción alimenticia al 50% reducirá la concentración de metales en los órganos, tanto de ratas macho como de hembras.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el contenido de metales en el tejido de diversos órganos de ratas sometidas a una alimentación sin restricciones o bajo una dieta hipocalórica crónica, en machos y hembras.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

a) Animales

El protocolo de desnutrición, empleado por Ruiz-Rosado y cols, y por Pereyra-Venegas y cols.^{7,8,24} (Figura 3), se empleó en el presente estudio, el cual se describirá brevemente a continuación.

Grupos de ratas Wistar hembras fueron sometidas a las siguientes condiciones de alimentación:

Grupo control: ratas hembras adultas, con libre acceso a alimento comercial (Formulab 5008).

Grupo de ratas desnutridas: ratas hembras adultas que fueron alimentadas con aproximadamente la mitad de la ingesta media de alimentos administrada a los animales de control.

La composición de macronutrientes y micronutrientes del alimento utilizado (Formulab 5008 para rata) se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Ingredientes del alimento proporcionado a las ratas control y desnutridas.

Hidratos de carbono	56%
Proteína	27%
Grasa	17%
Potasio	1.09%
Calcio	0.95%
Fósforo	0.70%
Sodio	0.28%
Magnesio	0.20%
Hierro	0.021%
Zinc	0.009%
Manganeso	0.008%
Cobre	0.001%

El protocolo de alimentación de las ratas hembras adultas se empezó a aplicar 3 semanas previas al apareamiento y se mantuvo durante la gestación, el parto y la

lactancia. Las camadas resultantes fueron ajustadas a 6 miembros (3 machos y 3 hembras).

Cada madre y sus crías fueron alojadas en cajas de acrílico (43x53x20 cm), en donde tenían acceso libre al agua y se mantuvieron en un ciclo de luz y oscuridad (12 h-12 h) y temperatura (22–24 °C). No se agregaron suplementos minerales o vitamínicos a los animales desnutridos.

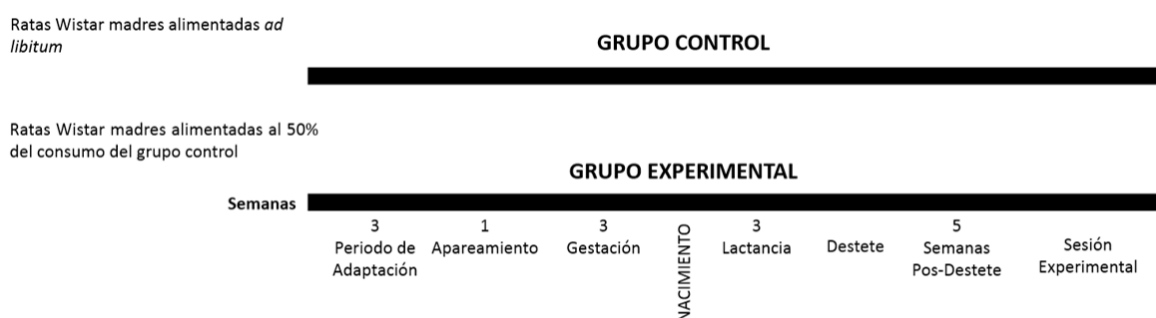


Figura 3. Protocolo de alimentación. Esquema de los protocolos de alimentación de los grupos de ratas control y desnutridas.

Después del destete, las crías fueron alojadas por sexo en cajas de acrílico, en donde se les mantuvo con el mismo protocolo de alimentación que el de sus madres (Las cantidades de alimento proporcionado a las madres y crías se indican en la Tabla 2), hasta alcanzados los 60 días de edad, fecha en que se realizó la sesión experimental.

Tabla 2. Consumo de alimento por rata de los grupos control (C) y desnutridos (D)

	PERIODO DE TIEMPO (semanas)	CTROL (g)	DN (g)
Ratas madre			
Adaptación	1		12.5
	2		12.5
	3		12.5
Apareamiento	4		15
Gestación	5	<i>Ad libitum</i>	15
	6		15

	7		16
Nacimiento/Lactancia	8		16
	9		20
	10		20
Descendencia			
Lactancia	1		
	2		
	3		1
Post-destete	4		2
	5	<i>Ad libitum</i>	3
	6		4
	7		5
Sacrificio	8		6

En el día 60 postnatal, las crías fueron pesadas antes de ser sacrificadas por decapitación, para posteriormente hacer la extracción de los siguientes órganos: Cerebro, médula espinal corazón, pulmones, hígado, riñones, intestinos delgado y grueso y páncreas, así como los músculos: extensor largo de los dedos –EDL-, Gastrocnemio –G- y Soleo –sol- (Figura 4).

b. Colecta de muestras

Los tejidos analizados se obtuvieron de los intestinos, las vísceras, los músculos y el sistema nervioso central. Para conocer la concentración de elementos independiente a la presencia de sangre, se analizaron 3 ratas macho controles y 3 macho desnutridas que fueron perfundidas con solución salina al 0.9%.

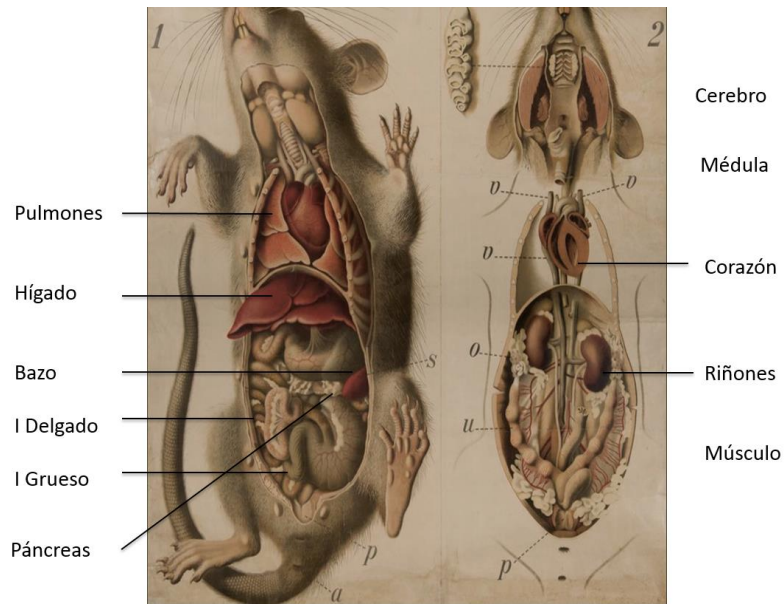


Figura 4. Órganos seleccionados para el análisis de la concentración de metales.
 Imagen: Pfurtscheller, Paul

En todos los casos, los intestinos fueron lavados para evitar que tuvieran quilo alimenticio. Todos los órganos fueron extraídos en frío, troceados y almacenados a -80°C . Posteriormente se liofilizaron los tejidos durante 30 horas y se pesaron y clasificaron para la realización de los análisis de elementos en cada uno de ellos (por triplicado del mismo órgano por cada rata). Después, se les añadió 1 mL de ácido nítrico Fluka Trace al 65%. La digestión de la muestra se realizó en el sistema de digestión de microondas MARS 6 CEM a 200°C por 15 minutos. Al obtener las muestras digeridas, éstas se aforaron a 5 mL con agua miliQ.

c. Determinación de la concentración de metales (ICP-OES).

La determinación de las concentraciones de los metales alcalinos Na, K, Ca y Mg, así como la de los metales de transición: Mn, Fe, Cu y Zn, y la del P, se realizó por medio de Espectroscopia de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) con el equipo Optima 8300 (PerkinElmer) (Figura 5). Cada muestra obtenida se cuantifico por triplicado y se obtuvo el promedio y desviación estándar (Ver anexo I).

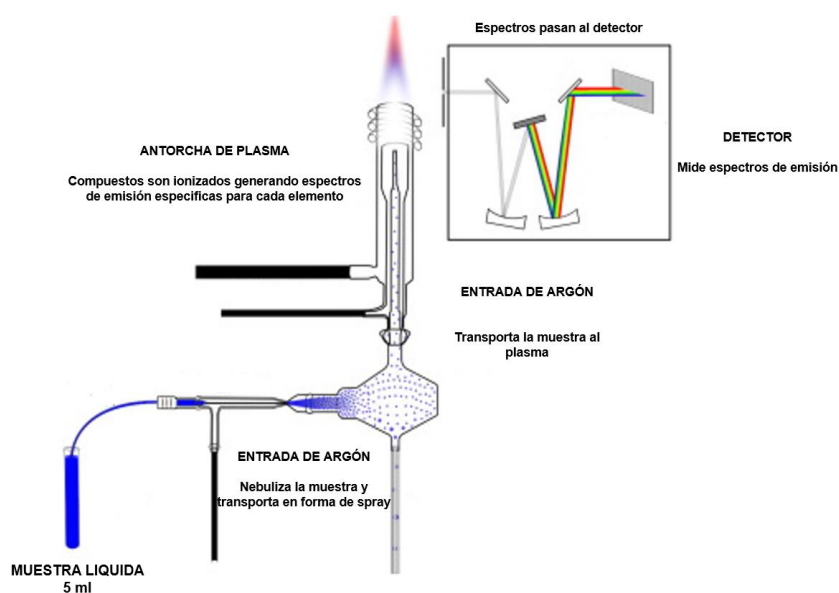


Figura 5. Principio de la Espectroscopia de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). La muestra ya digerida y aforada entra al nebulizador del ICP-OES con ayuda de una bomba y gas Argón, donde se va a transformar a forma de spray para llegar al plasma, donde la alta temperatura y la ionización excita los electrones de cada elemento; que al regresar a su estado original cada elemento emite espectros específicos cuya señal se cuantifica en el detector del espectrómetro.

d. Experimentos con el Sincrotrón de la Universidad de Stanford (E.U.A.)

Dado que el ICP-OES cuantifica las concentraciones de elementos principales y traza en muestras biológicas disueltas en una solución ácida, no es posible determinar la distribución espacial de las concentraciones elementales en los tejidos, particularmente en el cerebro y la médula espinal, por lo que decidió analizar la distribución espacial de los distintos elementos mediante el sincrotrón de la Universidad de Stanford (Stanford Synchrotron Radiation Lightsource –SSRL). El sincrotrón contiene un acelerador lineal que permite la salida de un flujo de electrones que son acelerados hasta cerca de la velocidad de la luz, los electrones son mantenidos en dirección gracias al campo magnético presente (Figura 6). Cuando los electrones alcanzan una energía constante emiten la luz de sincrotrón que va a ser redirigida por campos magnéticos al laboratorio de Línea de Luz. Al interactuar con la muestra, esta emite una señal específica para cada elemento que es recibida por un detector que permite visualizar la estructura atómica y molecular de los materiales, así como establecer la distribución específica de los elementos en las muestras bajo estudio²⁵.

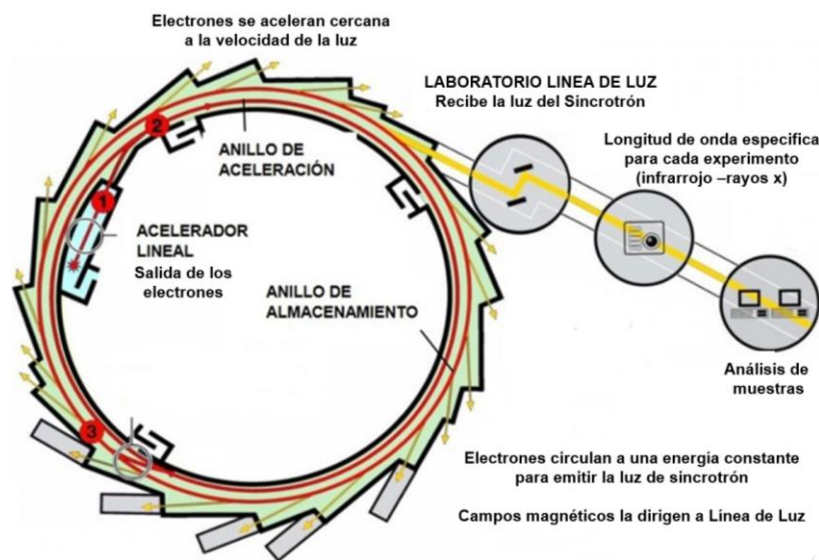


Figura 6. Esquema del funcionamiento del sincrotrón

Para la realización de tales medidas, se procedieron a obtener muestras del cerebro y de la médula espinal de la siguiente manera: Se extrajeron el cerebro y la médula espinal completa de 6 machos control con 60 días de edad postnatal. Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano y perfundidas con solución salina al 0.9%. Una vez extraídos los cerebros y médulas se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Posteriormente, las muestras fueron descongeladas y mantenidas a 4°C, y se prepararon para su sección. Se realizaron rebanadas sagitales del cerebro y de la médula espinal de 500 micras de grosor (Figura 7) con un vibratomo. Subsecuentemente, las rebanadas fueron desecadas a temperatura ambiente y montadas en portaobjetos de microscopio (Thermo Scientific Nunc Thermanox) y enviadas a la Universidad de Stanford para su estudio en el Sincrotrón, con el que se obtuvieron imágenes de fluorescencia de rayos X (Figura 7).

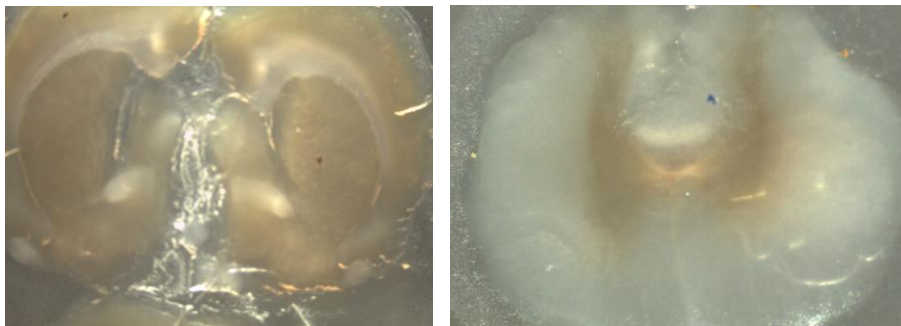


Figura 7. Imágenes de los cortes sagitales de cerebro (izquierda) y médula espinal (derecha) desecadas para su posterior análisis con el Sincrotrón de la Universidad de Stanford, E.U.A.

e. Análisis estadístico

Se analizaron 12 machos controles (incluyendo los 3 perfundidos), 11 machos desnutridos (3 perfundidos), 10 hembras controles y 9 hembras desnutridas. Se utilizó primero la prueba estadística Anova de 2 vías para establecer si había diferencias entre hembras y machos. Seguido otro anova de 2 vías para analizar la diferencia entre controles y desnutridos, ambos análisis se realizaron en el software GraphPad Prism 5. Las diferencias significativas se consideraron con $p \leq 0.05$.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presentación de esta sección contendrá la descripción de los resultados y una breve discusión de los mismos.

a. Efecto de la restricción crónica de alimento sobre el peso corporal de las ratas experimentales.

Tanto las ratas hembras como machos desnutridos tuvieron un peso inferior que el de las ratas control. El peso promedio de los machos control fue 329 ± 49 g, mientras que los machos desnutridos pesaron 86 ± 14 g. En promedio las ratas hembras presentaban 235 ± 15 g y las controles y 68 ± 10 g., presentándose una diferencia de alrededor del 70% entre los grupos (Tabla 3). Estos resultados concuerdan con los reportados por Ruiz-Rosado et al. (2013) y Pereyra–Venegas et al (2014).

Tabla 3. Peso corporal de ratas control y desnutridas (machos y hembras) a los 60 días de edad postnatal.

	MACHOS CTROL	MACHOS DN	HEMBRAS CTROL	HEMBRAS DN
	290 g	85 g	230 g	68 g
	280 g	73 g	248 g	83 g
	285 g	70 g	235 g	87 g
	285 g	108 g	216 g	80 g
	280 g	110 g	237 g	75 g
	285 g		215 g	
	388 g	74 g	232 g	68 g
	368 g	81 g	265 g	53 g
	399 g	89 g	227 g	77 g
	363 g	74 g	248 g	72 g
	370 g	103 g		
	357 g	84 g		
Machos perfundidos				
		>74%		>71%

Discusión: Se conoce que la dieta *ad libitum* proporcionada a las ratas del grupo control es suficiente para cubrir la Ingesta Diaria Recomendada ²⁶ pero no lo es para el grupo con restricción calórica crónica. Como se muestra en la Figura 8, los animales desnutridos también presentaron una diferencia notoria en la talla con respecto a los animales control (Tabla 3) mostrando un cambio >70% en ambos grupos. Por lo anteriormente expuesto, consideramos que los animales del grupo con restricción alimenticia están en una condición de desnutrición severa.



Figura 8. Fotografía de un macho control (izquierdo) y uno desnutrido (derecha) de 60 días de edad, que representan la diferencia de talla entre ambos.

b. Análisis de la concentración de elementos en los órganos y tejidos de ratas control y experimentales.

A continuación, se expondrán los resultados del análisis de los valores de concentración de los distintos elementos estudiados, determinados por medio del ICP-OES (Los datos brutos se muestran en el Anexo III al final de la presente tesis). Cabe señalar que los resultados obtenidos serán descritos para cada metal. Los valores de las hembras se representarán con puntos naranjas, mientras que los de los machos en azul oscuro, y los machos perfundidos en azul claro. Así mismo, en el eje de las ordenadas se indicarán los órganos analizados mientras que en el eje de la abscisa se indicará la concentración del metal (en miligramos) por masa seca del órgano o tejido (en gramos). Por otra parte, en color verde se señalará cuando

las ratas controles y desnutridos presentaron diferencias significativas entre sí y en color rosa, cuando se presentaban diferencias en uno de los órganos analizados en comparación con el resto.

CALCIO

Descripción de resultados: Los datos obtenidos con respecto de la concentración de iones Calcio en los órganos estudiados, mostraron que este elemento se presenta en concentraciones relativamente bajas en la mayoría de los órganos y tejidos analizados, a excepción de la médula espinal, la cual contiene aproximadamente 10 veces más calcio que el cerebro (Figura 9; 4.19 mg y 0.44 mg de Ca por gramo de masa seca, respectivamente). Con respecto a la concentración de Ca en cada uno de los órganos de las ratas desnutridas, la única diferencia encontrada fue nuevamente de la médula espinal, en la que el Ca fue significativamente menor en los desnutridos (Figura 10).

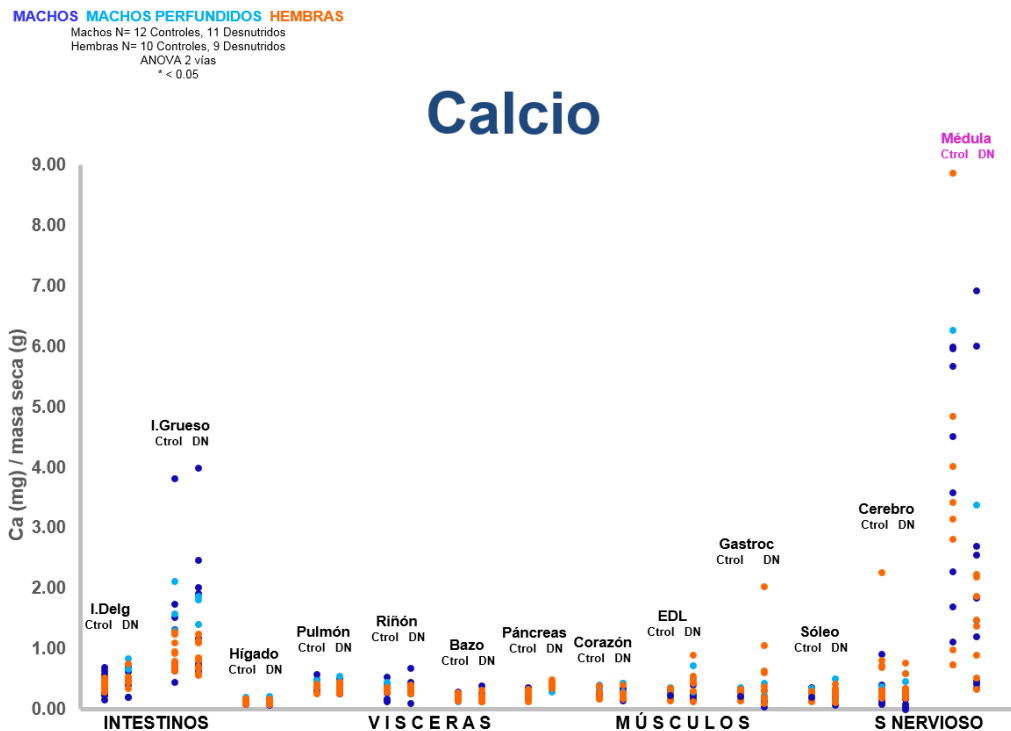


Figura 9. Contenido de calcio en los distintos órganos y tejidos de ratas control vs desnutridas.

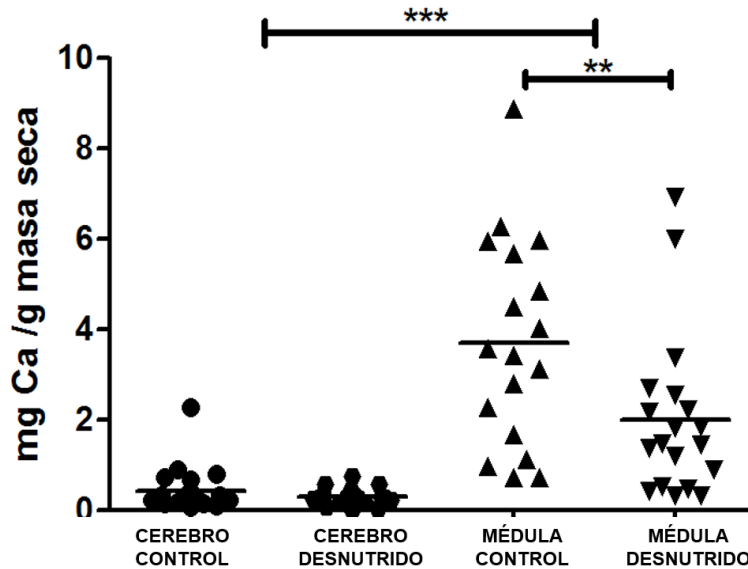


Figura 10. Concentración de iones calcio en el cerebro y médula espinal de ratas control y desnutridas.

Discusión: El calcio juega un papel esencial en la excitabilidad celular y la señalización intracelular en el sistema nervioso. Los canales de calcio activados por alto voltaje están ampliamente distribuidos en el SNC. Se ha reportado que las células que contienen ARNm de los genes que codifican para los canales de calcio tipo $\alpha 2 \delta - 1$, $\alpha 2 \delta - 2$ y $\alpha 2 \delta - 3$ se encuentran ampliamente distribuidos por todo el cerebro y la médula espinal de la rata²⁷. Zhang y cols. (2008) mostraron que el canal de calcio Ca V 1.3 se encuentra localizado en la materia gris de la médula espinal del gato, pero que se encuentra en mayor proporción en la parte profunda del asta dorsal²⁸. A su vez, Sukiasyan y cols en 2009 observaron en la rata, que las neuronas positivas para Ca V 1.3 estaban en todos los segmentos de la médula espinal, desde el asta dorsal hasta el asta ventral, pero la mayor proporción se ubicaba en la región ventral²⁹.

Como se mencionó en la Introducción, en el modelo animal de desnutrición empleado en esta tesis, se analizó la posible relación existente entre la desnutrición y la inhibición presináptica de las fibras aferentes en la médula espinal, observando

que los animales desnutridos presentan potenciales del dorso de la médula (CDP) y de raíz dorsal (DRP) notoriamente inferiores a los observados en los animales control¹⁰. A partir de estas observaciones, podría proponerse que la reducción en la inhibición presináptica en los animales desnutridos podría deberse a alteraciones en la liberación de neurotransmisores, ya sea por un menor contenido de los neurotransmisores en las terminales sinápticas o bien, a una menor cantidad de Ca^{2+} extracelular disponible para inducir la liberación de los neurotransmisores. Dado que los resultados obtenidos en esta tesis indican que los animales desnutridos presentan menor concentración de Ca^{2+} con respecto a la médula espinal de los animales control, podría proponerse que la liberación de la mayoría de los neurotransmisores de las terminales sinápticas estaría notoriamente afectada, lo cual podría explicar en parte la disminución de la inhibición presináptica observada en los animales desnutridos¹⁰. Más aún, se ha reportado una reducción sensible en el grosor de la vaina de mielina en axones de nervios periféricos y de mielina en la médula espinal de animales desnutridos³⁰. En este aspecto, existen evidencias experimentales que demuestran una intensa actividad de Ca^{2+} en células precursoras de oligodendrocitos, oligodendrocitos mielinizantes e incluso en vainas de mielina maduras in vitro y ex vivo³¹ y que los cambios dinámicos en la concentración de Ca^{2+} en la vaina de mielina regulan el crecimiento de la misma. Así mismo, se ha mostrado que los transitorios de Ca^{2+} de gran amplitud y larga duración se relacionan con la retracción de las vainas de mielina³¹⁻³². En base a lo anterior, es factible proponer que la hipomielinización provocada por la desnutrición crónica resulta de una reducción en el contenido de Ca^{2+} intramedular, como la observada en el presente estudio.

Para establecer si nuestras observaciones son apropiadas, se procedió a analizar la cantidad de calcio y de otros elementos en cortes cerebrales y de la médula espinal por microscopía de fluorescencia de rayos X (Sincrotrón).

Análisis de Ca en cortes de cerebro y médula espinal por microscopía de fluorescencia de rayos X

Descripción de resultados: Los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia de rayos X de sincrotrón muestran una distribución de calcio relativamente homogénea a lo largo del cerebro de la rata. La Figura 11 A muestra una imagen representativa de las estructuras analizadas en el cerebro. La región A_B: partes del Córtex (Ctx), Cuerpo calloso (CC) y Caudado Potámico (CP) y la región A_C: Hipocampo (Hip) y Giro Dentado (DG). En la imagen B de la figura 11, se muestra una amplificación de la región A_B del cerebro. Donde el máximo espectral para la emisión de calcio fue de 259.82 fotones por 100 ms. Mientras que la figura 11 C, región A_C del cerebro, un espectral para la emisión de calcio de 145.64 fotones por 100 ms. En ambas regiones el promedio espectral para la emisión de iones calcio fue alrededor de 200 fotones por 100 ms (datos no mostrados). Por otra parte, la distribución de calcio en la médula espinal de la misma rata no es uniforme (figura 11 D y E), se puede observar algunos cúmulos de calcio en el borde de la médula y en menor medida en la materia gris, el promedio para la emisión de calcio fue alrededor de 3500 fotones por 100 ms (datos no mostrados). Mientras que en la gráfica F de la figura 11 se muestra que la médula espinal presenta un promedio espectral para la emisión de calcio mayor al del cerebro.

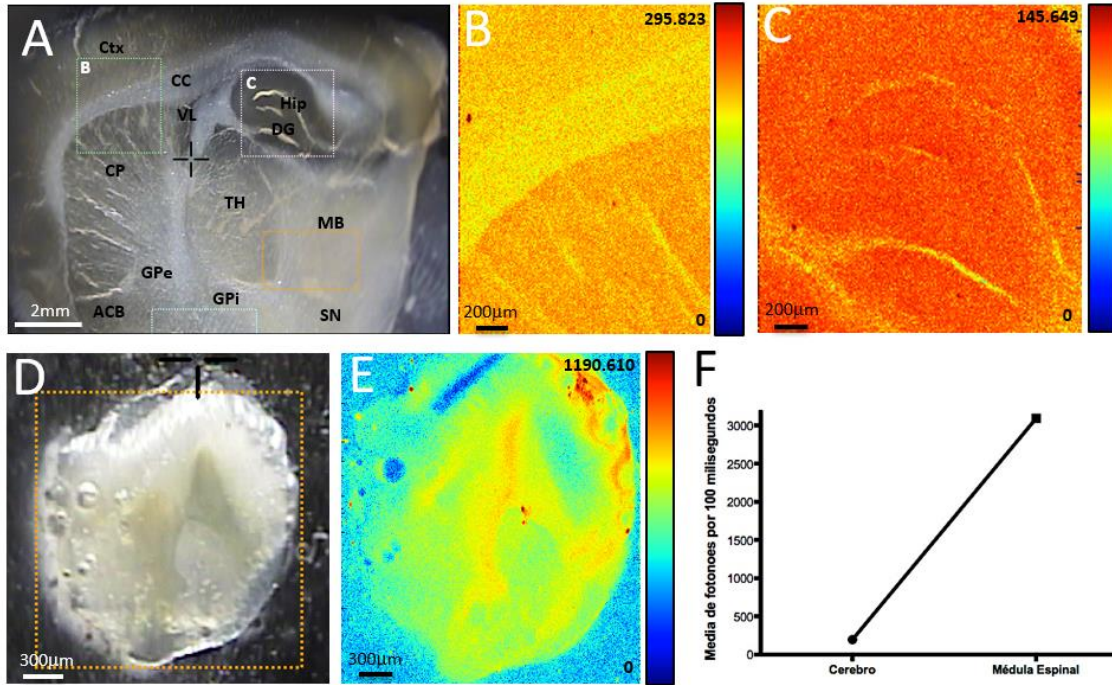


Figura 11. La microscopía de fluorescencia de rayos X de sincrotrón muestra una distribución homogénea de calcio en cerebro y no en médula espinal de ratas macho controles de 60 días. La resolución de pixeles a $10 \mu\text{m}^2$. (A) Se muestra una imagen representativa de las estructuras analizadas en el cerebro. La región A_B: partes del Córtex (Ctx), Cuerpo calloso (CC) y Caudado Potámico (CP) y la región A_C: Hipocampo (Hip) y Giro Dentado (DG). (B) Amplificación de la región A_B del cerebro. El máximo espectral para la emisión de calcio fue de 299.82 fotones por 100 ms. (C) Distribución homogénea de calcio en la región A_C del cerebro siendo el máximo espectral para la emisión de calcio de 145.64 fotones por 100 ms. (D) Imagen representativa de médula espinal (zona cervical). (E) La distribución de calcio en la médula espinal no es uniforme, se pueden observar cúmulos del ión en el borde del corte y la materia gris. (F) La médula espinal reporta un promedio espectral para la emisión de calcio mayor al del cerebro.

Discusión: Aunque el incremento en Ca^{2+} en la médula espinal es muy evidente en comparación con los cortes cerebrales, no podemos todavía discutir sobre la significancia de los datos, dado que obtuvimos un incremento en la señal de los demás elementos analizados (Zn, Fe, Cu; Anexo II).

Como está técnica permite la evaluación de la concentración absoluta de cada elemento analizado por cada pixel de la imagen. Pretendemos más adelante evaluar por regiones anatómicas la concentración relativa entre los elementos.

Análisis de Mg, Na, K y P

Descripción de resultados: Al contrario del calcio, el magnesio (Figura 12) presenta una distribución similar en la médula espinal y cerebro. El único cambio presente en este elemento es en el páncreas, en donde los animales desnutridos tienen una mayor concentración del metal respecto a los controles. Sin embargo, esta variación está presente en todos los elementos analizados. Por lo tanto, se describirán otros resultados observados en el análisis de Mg, Na, K y P. Y al final se discutirá la relación del páncreas con estos elementos.

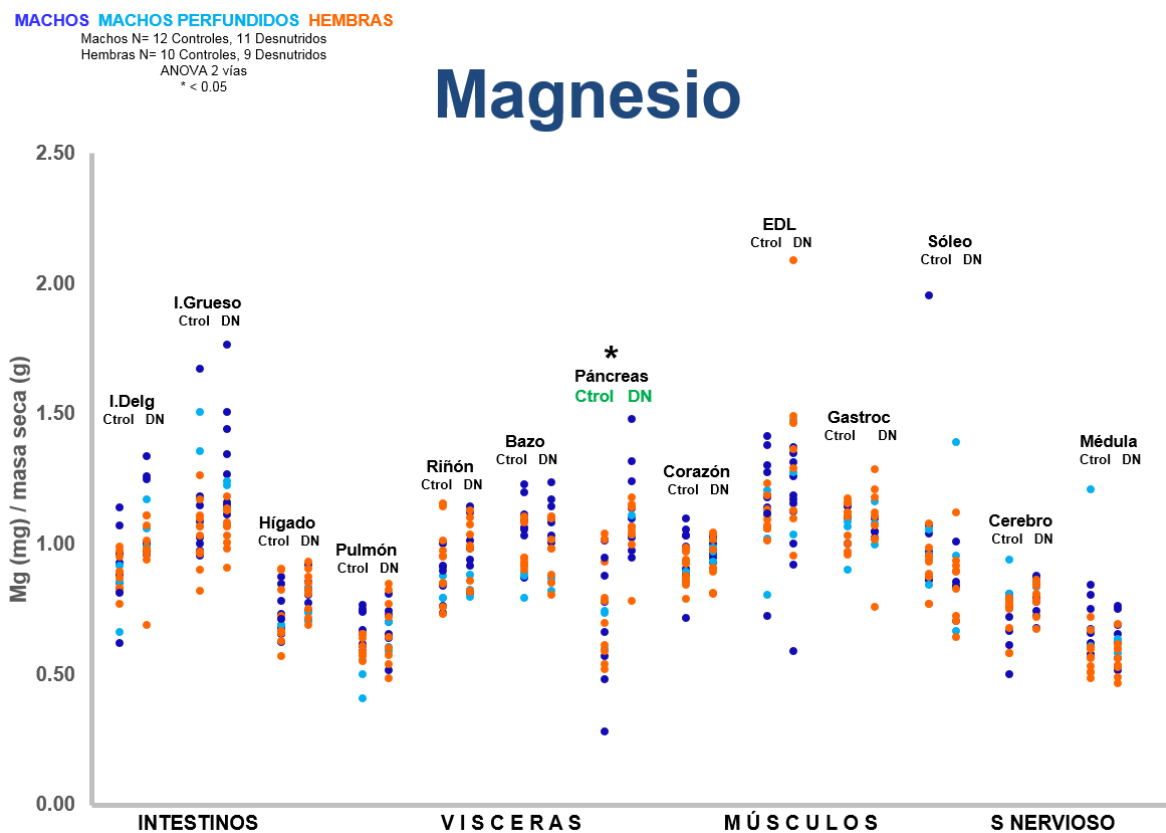


Figura 12. El páncreas desnutrido aumenta la concentración de magnesio comparado al control.

La bomba de Na^+ / K^+ ATPasa, es una enzima clave para la homeostasis del gradiente electroquímico de solutos y el potencial de membrana³³. Los valores determinados para el Na se demuestran en la Figura 13 y para el K en la Figura 14. El pulmón y el riñón son los órganos con mayor concentración de Na, sin cambio

significativo entre ellos. En el caso del riñón se sabe que la función principal del túbulo proximal (PT) es la reabsorción de solutos filtrados, incluidos Na⁺, K⁺, Cl⁻ y Ca²⁺.³⁴⁻³⁵ La Claudina 2 es la principal Claudina responsable de la reabsorción de Na⁺ y está altamente expresada en el PT³⁴.

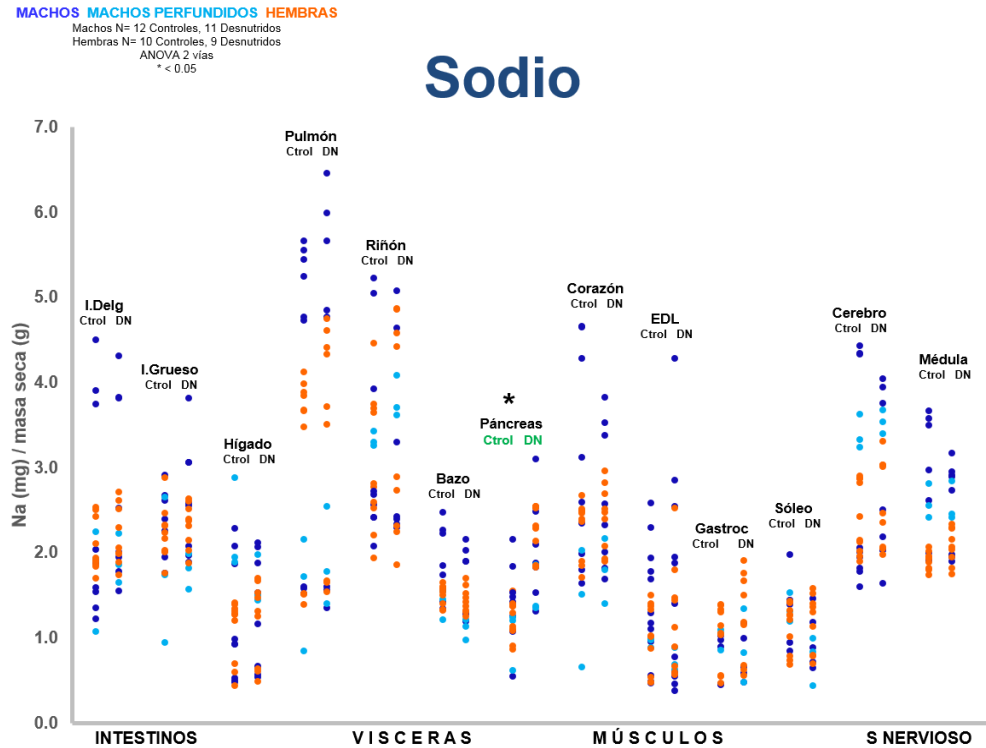


Figura 13. El pulmón y riñón son los órganos con mayor concentración de Na⁺.

MACHOS MACHOS PERFUNDIDOS HEMBRAS
 Machos N= 12 Control, 11 Desnutridos
 Hembras N= 10 Control, 9 Desnutridos
 ANOVA 2 vías
 * < 0.05

Potasio

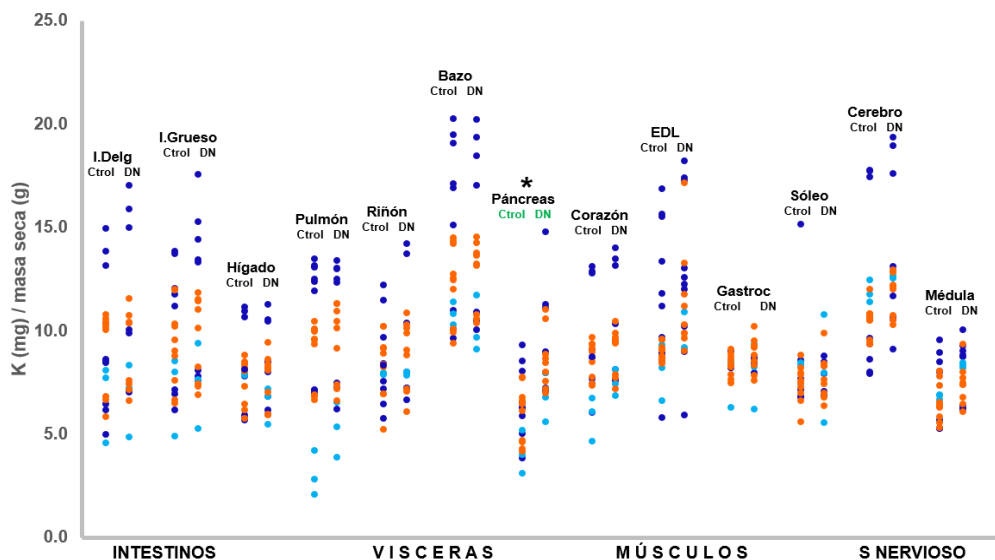


Figura 14. La concentración de potasio esta en un rango similar en todos los órganos y tejidos analizados.

El único elemento no-metal determinado fue el fósforo que es componente de la molécula de ATP, participa en estructuras proteicas y en membranas fosfolipídicas¹³. Por su amplia distribución este elemento también se usa algunas veces como referente para normalizar las demás mediciones. En la Figura 15 observamos que el fósforo mantiene concentraciones similares en los intestinos y las vísceras. Y que esta concentración se ve disminuida en los músculos, pero no tan disminuida en sistema nervioso central. Por otro lado, a excepción del páncreas no hay diferencias entre los animales controles y desnutridos.

Los resultados en el páncreas se discuten enseguida.

MACHOS MACHOS PERFUNDIDOS HEMBRAS
 Machos N= 12 Control, 11 Desnutridos
 Hembras N= 10 Control, 9 Desnutridos
 ANOVA 2 vías
 * < 0,05

Fósforo

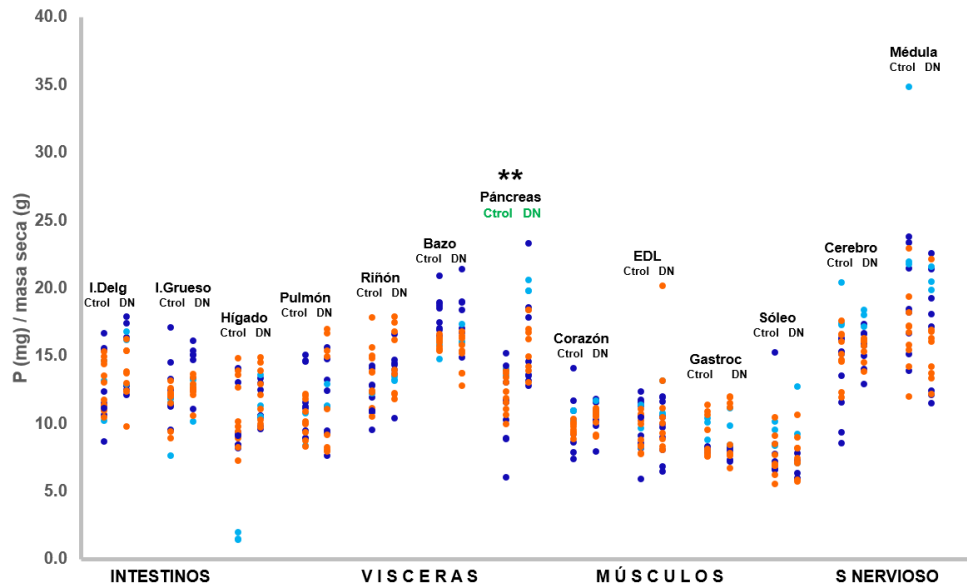


Figura 15. La concentración de fósforo parece ser ligeramente menor en los músculos comparado al resto de los órganos analizados.

Acumulación de elementos en el páncreas de la rata desnutrida

Descripción de resultados: En todos los elementos analizados observamos que el páncreas desnutrido presenta niveles más altos en la concentración de metales comparados con los animales control. Elementos como Mg, Na, K y P tienen un incremento de aproximadamente un 50% en las ratas desnutridas, siendo los elementos que más aumentan (Figura 16).

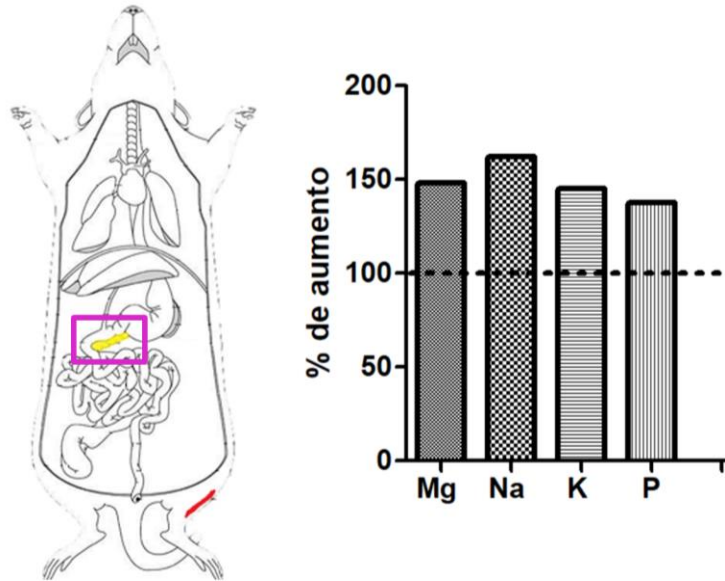


Figura 16. Mg, Na, K y P aumentan en el páncreas desnutrido

Discusión: El páncreas es una glándula mixta compuesta por 2 tipos de tejido: endocrino y exocrino³⁶. El 95% del páncreas corresponde a tejido exocrino que produce enzimas pancreáticas para la digestión. Estas enzimas incluyen la tripsina y la quimotripsina para digerir las proteínas; amilasa para la digestión de carbohidratos; y lipasa para descomponer las grasas.^{37,38} La síntesis de las enzimas digestivas tiene lugar en el retículo endoplásmico rugoso, desde donde son transportadas al aparato de Golgi experimentando diversas modificaciones postraduccionales, especialmente por glicosilación, se concentran y, posteriormente, son transportadas a los gránulos de zimógeno o proenzimas inactivas, para evitar la autodigestión y la consiguiente lesión del propio páncreas.^{36,37} En condiciones normales, las células acinares del páncreas contienen grandes cantidades de enzimas digestivas envasadas en gránulos de zimógeno pero en deficiencia de alimento hay disminución en el tamaño y el número de gránulos³⁹ y por tanto el proceso digestivo se ve afectado.

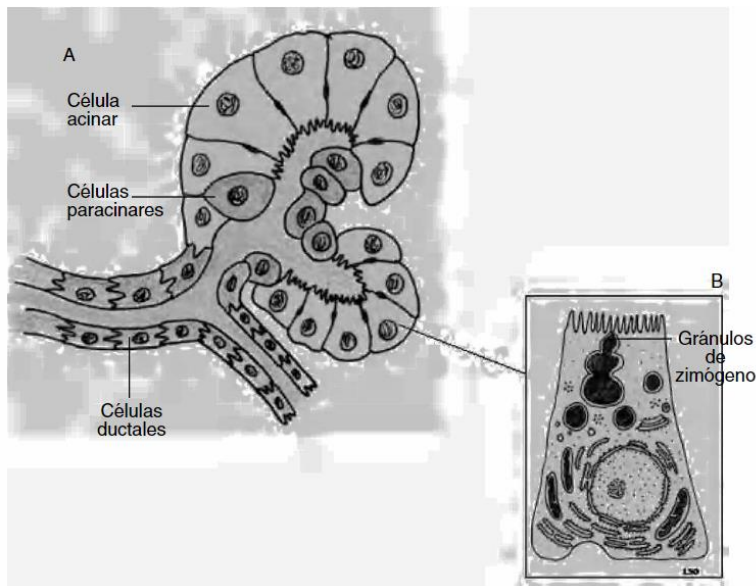


Figura 17. Estructura del páncreas exocrino

El jugo pancreático es un líquido incoloro, acuoso, de densidad entre 1.007 y 1.035 según la concentración de proteínas, con pH alcalino, que contiene 2 tipos de secreciones: la enzimática y la hidroelectrolítica. La enzimática es la causante de la hidrólisis de las sustancias nutritivas de los alimentos, mientras que la hidroelectrolítica actúa como vehículo de la enzimática y proporciona un medio alcalino, necesario para la actuación de las enzimas.³⁶ Las células centroacinares y las ductales son las encargadas de la secreción hidroelectrolítica del páncreas exocrino. Los principales cationes presentes son: sodio (154 ± 7 mEq/l), potasio ($4,8 \pm 0,9$ mEq/l), calcio ($1,7 \pm 0,3$ mEq/l) y magnesio ($0,27 \pm 0,08$ mEq/l)^{36,40,41} los aniones, son fundamentalmente el cloro y el bicarbonato. En el período digestivo se produce la mayor secreción exocrina del páncreas, inducida por los estímulos hormonales y nerviosos provocados por los alimentos. Clásicamente se reconocen en este período 3 fases: cefálica, gástrica e intestinal. La fase cefálica es desencadenada por vía vagal mediante un estímulo psíquico, la vista, el olfato y, especialmente, la masticación. La fase gástrica está mediada por un mecanismo colinérgico, tras la distensión gástrica, además la llegada del bolo alimenticio al estómago causa la liberación de gastrina, estímulo causante de la secreción pancreática. El ritmo de vaciamiento de los alimentos desde el estómago modula la

siguiente fase o fase intestinal. La secreción hidroelectrolítica es estimulada principalmente por la secretina (liberada por mucosa del intestino), que controla, por tanto, el volumen de jugo pancreático³⁹. Estudios demuestran que la producción de volumen del jugo pancreático y la producción de enzimas digestivas tiene una correlación directa con el estado de nutrición del individuo, En individuos con desnutrición crónica, como marasmo y kwashiorkor se observó que tenían una producción muy deficiente de jugo pancreático que cambiaba después de la terapia dietética⁴². Por lo tanto, si el ritmo de vaciamiento de los alimentos desde el estómago modula la secreción pancreática exocrina la deficiencia de alimentos causaría una menor secreción de jugo pancreático y por lo tanto un aumento en la concentración del jugo pancreático y de las enzimas digestivas en el propio páncreas, lo que causaría el incremento de los elementos que lo constituyen resultados observados en la restricción calórica- proteica crónica.

El tejido restante está formado por células endocrinas llamadas islotes de Langerhans que producen hormonas para regular el metabolismo de los hidratos de carbono. Dos de las principales hormonas pancreáticas son la insulina producidas por las células beta y el glucagón producidas por células alfa⁴⁰. La secreción de insulina es un proceso que implica la fusión de gránulos de insulina con la membrana plasmática y la exocitosis del contenido de gránulos⁴². La exocitosis de insulina, se desencadena por la elevación intracelular de Ca^{2+} . Y los canales de calcio de tipo L, son responsables del aumento de la concentración de calcio intracelular⁴³⁻⁴⁵ La insulina activa sus receptores de membrana que pertenecen a la familia de receptores tirosina-cinasa. La activación de los receptores activa la vía de fosfoinositol 3-quinasa / AKT2 y da como resultado la translocación del transportador de glucosa GLUT4 sensible a la insulina a la membrana plasmática y un aumento del transporte de glucosa al músculo y al tejido adiposo. En el hígado, el AKT de glucógeno y el almacenamiento hepático de glucosa⁴⁶. El glucagón contrarresta la acción de la insulina promoviendo la despolimerización del glucógeno y la salida de glucosa a la circulación sanguínea. La gluconeogénesis hepática es la fuente principal de producción de glucosa endógena y es estimulada

por la restricción de alimento. El ayuno prolongado promueve además la lipólisis en el tejido adiposo para liberar ácidos grasos no esterificados que se convierten en cuerpos cetónicos en el hígado a través de la oxidación β mitocondrial y la cetogénesis. Los cuerpos cetónicos proporcionan un combustible metabólico para los tejidos extrahepáticos⁴⁷. Aunque nuestros resultados muestran apenas un ligero aumento de calcio en las ratas desnutridas sobre los controles, quizá esté sea un indicativo de que el páncreas de los animales desnutridos está sufriendo cambios funcionales con respecto a la capacidad de las células beta para producir y secretar insulina.

Análisis de los metales de transición: Fe, Mn, Cu y Zn

Los metales alcalinos se ubican en abundancia en la naturaleza, en el caso de Na (más abundante) y K (segundo más abundante) funcionan como iones solubles y se pueden unir a proteínas con afinidades relativamente bajas. En contraste, los metales de transición se encuentran en menor cantidad, normalmente unidos a proteínas (directamente o mediante cofactores, como es el caso del grupo hemo para el hierro). Los elementos de transición incluyen los importantes metales para la biología como el manganeso, hierro, cobre y zinc.

H																			He
Li	Be									B	C	N	O	F					Ne
Na	Mg									Al	Si	P	S	Cl					Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br			Kr

Metales alcalinos
Metales de transición
Fósforo

Figura 18. Metales de transición analizados en los diferentes órganos: Manganeso, Hierro, Cobre y Zinc

Descripción de resultados: Los resultados para el hierro muestran que las vísceras (excepto páncreas) son los órganos con mayor concentración de hierro (Figura 19). Principalmente el bazo, el pulmón y el hígado, y seguido el corazón y el riñón. Intestinos, músculos y sistema nervioso central presentan concentraciones de hierro mucho menores y similares entre ellos. Inicialmente nuestros experimentos fueron realizados en ratas no perfundidas (puntos azul oscuro y naranja), nuestros resultados previos señalaban que los órganos con mayor irrigación sanguínea tenían los niveles más altos del metal.

Como mencionamos en la metodología, para descartar que la concentración de hierro en los órganos se debía a la sangre presente, se perfundieron y analizaron 3 machos controles y 3 machos desnutridos (Ver metodología). Los resultados fueron señalados en las gráficas como puntos azul claro, encontrando que no hay diferencia entre los animales perfundidos y no perfundidos. Ni tampoco hay diferencias entre controles y desnutridos. Sugiriendo que los altos niveles de hierro en el bazo, hígado, pulmón, corazón y riñón no se deben a la irrigación sanguínea.

MACHOS MACHOS PERFUNDIDOS HEMBRAS
 Machos N= 12 Control, 11 Desnutridos
 Hembras N= 10 Control, 9 Desnutridos
 ANOVA 2 vías
 * < 0.05

Hierro

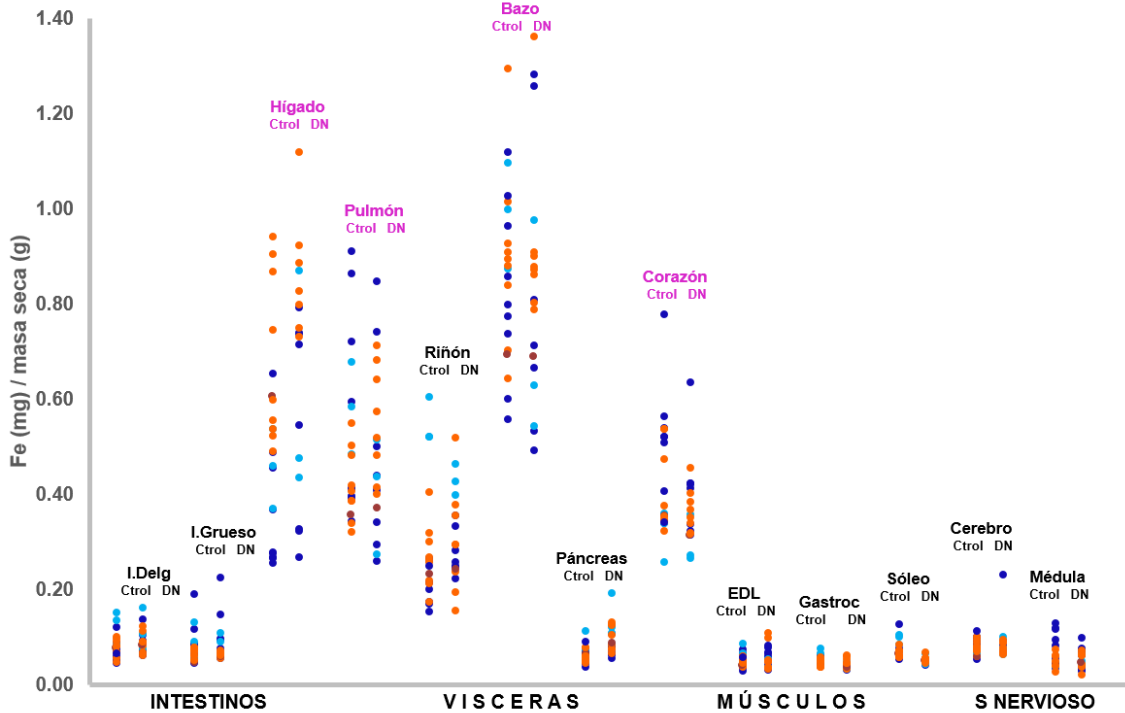


Figura 19. Los mayores niveles de Fe estuvieron en hígado, pulmón, bazo y corazón de animales perfundidos y no perfundidos.

Discusión: El metabolismo del hierro es un acto de equilibrio, y los sistemas biológicos han desarrollado mecanismos reguladores para mantener la homeostasis de este metal. Se sabe que la ferritina presente en el hígado y el bazo funciona como almacén de hierro. En el bazo los glóbulos rojos que pierden su flexibilidad, presumiblemente debido al daño acumulativo de la membrana son fagocitados por macrófagos fijos⁴⁸. El hígado desempeña un papel importante en el metabolismo del hierro, como en la producción de Transferrina (Tf), proteína portadora de hierro y la hepcidina, conocida como una hormona que funciona en la regulación del metabolismo del hierro.⁴⁹

Sin embargo, la Tf, es igualmente, abundante en el líquido del revestimiento respiratorio. Se ha reportado que el hierro aumenta la expresión del gen Ferroportina (FPN1) en células epiteliales de las vías respiratorias tanto in vivo como

en células cultivadas, y se sugiere que participa en el reciclaje y la desintoxicación del hierro en el pulmón. Si las células epiteliales respiratorias y los macrófagos alveolares no pueden restablecer el equilibrio de hierro durante los períodos de alta disponibilidad de metales y estrés oxidativo, el metal puede ser absorbido y metabolizado por los neutrófilos. Los neutrófilos liberan gránulos secundarios que contienen lactoferrina; esto puede formar complejos con Fe^{3+} y ser absorbido por macrófagos o células epiteliales respiratorias para su almacenamiento dentro de la ferritina. Sin embargo, los neutrófilos también producen moléculas reductoras tales como el ascorbato y el superóxido; estos pueden reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} y exacerbar aún más el nivel de estrés oxidativo⁵⁰. Por lo tanto, estas funciones fisiológicas tejido-específicas podrían relacionarse con nuestros resultados obtenidos.

Reabsorción de manganeso en el Intestino Grueso

Descripción de resultados: El intestino grueso es el órgano con mayor concentración de manganeso (Figura 20). Los músculos y sistema nervioso presentan concentraciones mínimas de este elemento.

MACHOS MACHOS PERFUNDIDOS HEMBRAS
 Machos N= 12 Controles, 11 Desnutridos
 Hembras N= 10 Controles, 9 Desnutridos
 ANOVA 2 vías
 * < 0.05

Manganeso

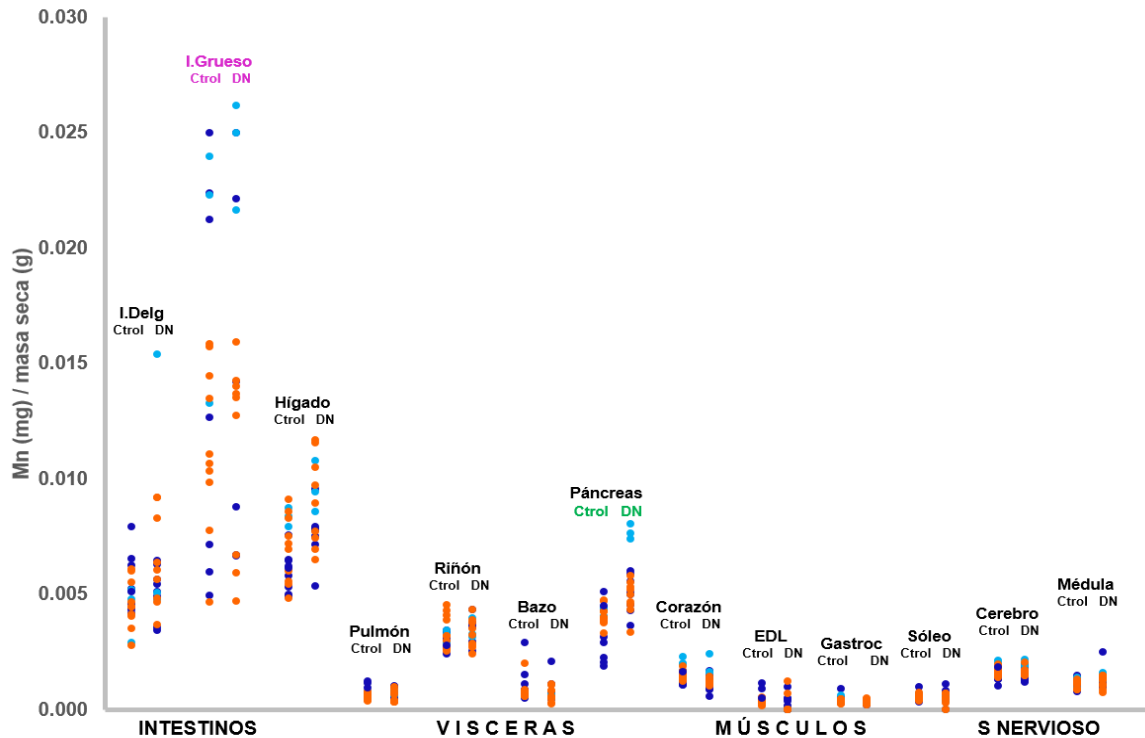


Figura 20. El manganeso está en mayor cantidad en intestino grueso y en menor concentración en los músculos y sistema nervioso.

Discusión: Estudios sugieren que el intestino grueso puede participar en la reabsorción de manganeso, al observar que esta región es muy activa en la reabsorción de manganeso cuando la ingesta dietética es baja⁵¹. Con base en estos antecedentes nuestra hipótesis es que, si suplementamos con manganeso la dieta de las ratas probablemente el proceso de reabsorción en intestino grueso disminuya y con ello la concentración de manganeso en este órgano.

Alta concentración del Cu en el riñón y su disminución en el desnutrido

Descripción de resultados: El riñón presenta una alta concentración de cobre respecto al resto de los órganos analizados (Figura 21). Los riñones de los animales control presentan niveles aún mayores sobre los desnutridos.

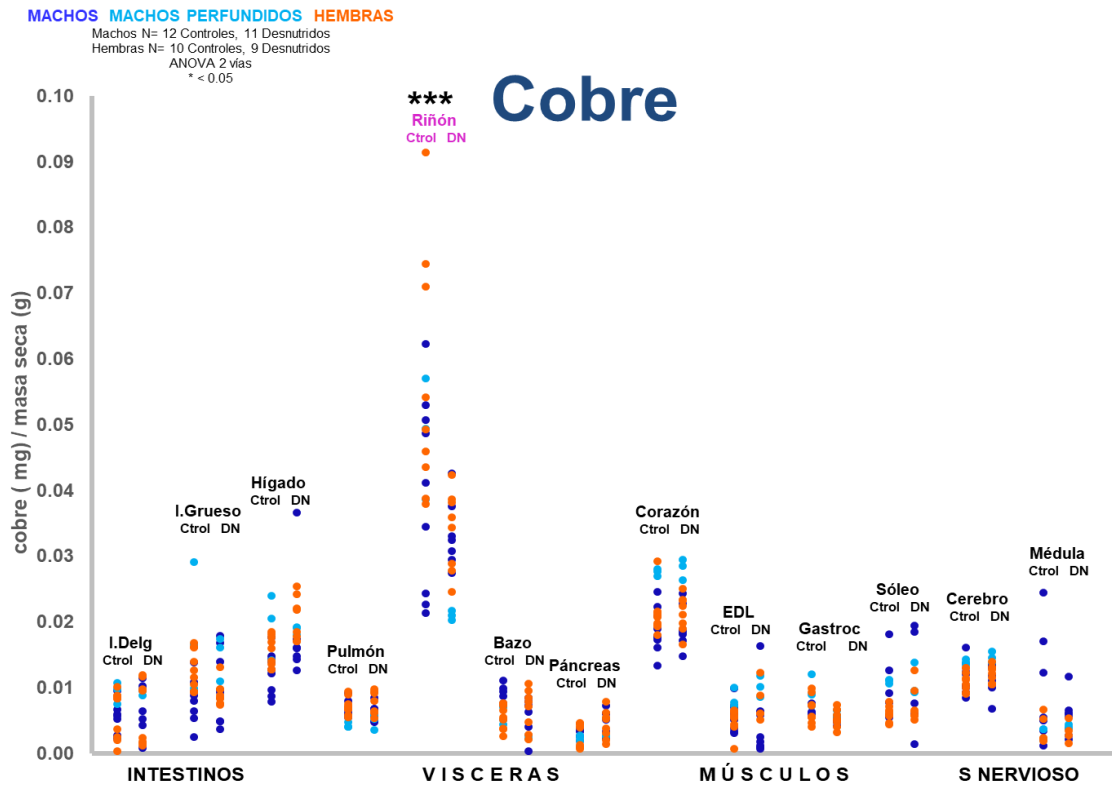


Figura 21. El cobre se acumuló en altas concentraciones en el riñón.

Discusión: Estudios en ratas alimentadas con una dieta alta en Cu han demostrado que el metal aparentemente se excreta por el riñón a través del túbulo contorneado proximal⁵² y que a los cambios degenerativos temporales les sigue la recuperación y la tolerancia al Cu^{53,54} (Figura 22) indicando que esta función adaptativa del riñón hacia la sobrecarga de Cu puede estar asociada con una metalotioneina (MT) renal inducida⁵³. Pues el cobre funciona como inductor de ARNm de MT en la misma región donde está ubicado, lo que sugiere que Cu-MT se sintetiza continuamente⁵⁵.

Estos datos son relevantes, ya que nuestros resultados muestran altos índices de cobre almacenados en el riñón y seguido en el hígado de las ratas, por lo que podría significar que la dieta empleada en este estudio contiene mayor concentración de cobre del necesario, y por lo tanto el riñón e hígado emplean probablemente en conjunto un mecanismo adaptativo similar a los ya reportados, evitando así que el metal llegue al resto de los órganos intoxicándolos y modificando su funcionamiento.

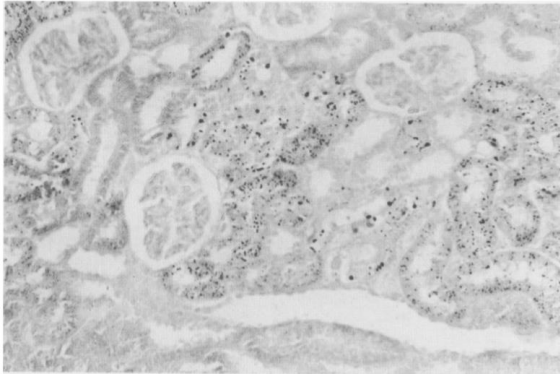


Figura 22. Estudios demostraron que el exceso de cobre se almacena en los túbulos contorneados proximales como Cu-MT⁵⁴

La tinción de cobre particulado estaba presente en el citoplasma del epitelio de revestimiento de algunos túbulos contorneados proximales

Alta concentración de zinc en el músculo soleo de fibras lentas y metabolismo oxidativo

Como se mencionó en la Introducción, las fibras musculares pueden clasificarse de acuerdo con sus características metabólicas (oxidativas y/o glucolíticas), funcionales (contracción lenta o rápida y fatiga) y moleculares (tipo de miosina) en fibras rápidas, lentas o intermedias. Todos los músculos presentan los tres tipos de fibras, pero en distintas proporciones: Soleo presenta más fibras del tipo lento^{8, 56}, el gastrocnemio es un músculo mixto²⁴, con un poco más de fibras lentas y el EDL contiene una predominancia de fibras rápidas.

Descripción de resultados: Nuestros resultados muestran que el zinc se almacena principalmente en fibras lentas, siendo el músculo sóleo el órgano con mayor concentración del metal (Figura 24).

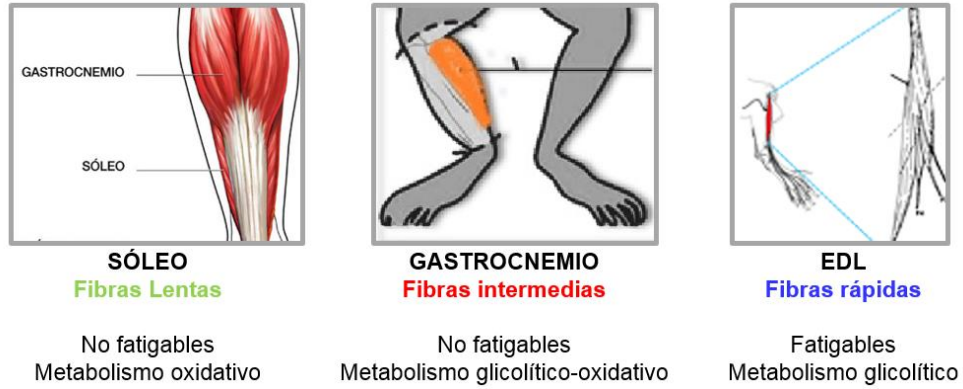


Figura 23. Tipos de fibras musculares

MACHOS MACHOS PERFUNDIDOS HEMBRAS
 Machos N= 12 Controles, 11 Desnutridos
 Hembras N= 10 Controles, 9 Desnutridos
 ANOVA 2 vías
 * < 0.05

Zinc

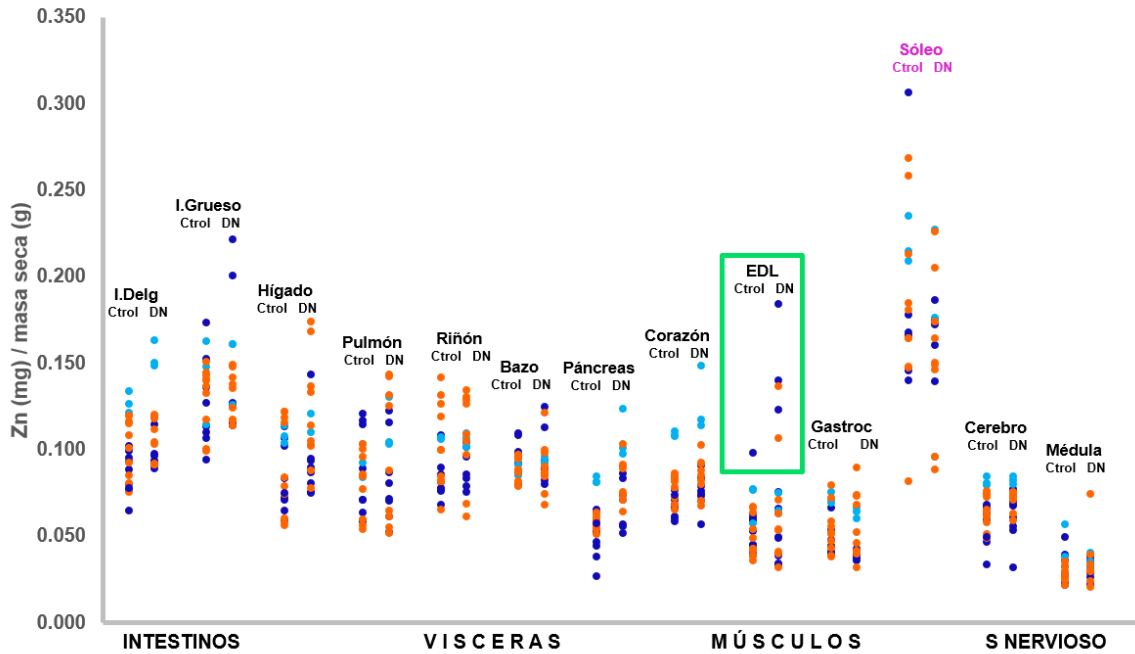


Figura 24. Músculo Soleo con mayor concentración de zinc

Discusión: El exceso de acumulación de zinc en los músculos se relaciona con los procesos de distrofia⁵⁷ y caquexia⁵⁸ en modelos animales. Además, se ha reportado que los transportadores de zinc *Zip3* y *Zip8* están regulados al alza en el transcurso

de la miogénesis⁵⁹ esto es importante porque 5 datos que obtuvimos de los músculos EDL (resaltados en recuadro verde) tienen mayor concentración de zinc comparado con su promedio. Como mencionamos previamente, con este protocolo de desnutrición se han estudiado cambios en la composición de las fibras musculares de los tres tipos de fibras musculares mencionadas y se ha observado que en el músculo EDL control hay una mayor proporción de fibras rápidas, pero cuando se analizan las fibras musculares de los animales sometidos al protocolo de desnutrición se ve una mayor presencia de fibras intermedias. Es probable que este proceso de cambio de fibras rápidas a intermedias este sucediendo en los 5 datos señalados, ya que se ha observado que el contenido de Zn celular es dinámico en el curso de la miogénesis⁵⁹.

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que analiza la concentración de varios metales simultáneamente, en diversos órganos de rata en una restricción calórica crónica. La principal aportación fue dar a conocer la distribución específica de los varios elementos analizados en los diversos órganos (Figura 25), información que hasta ahora no estaba disponible en la bibliografía. Nuestros hallazgos podrían ayudar a comprender mejor las alteraciones funcionales y posiblemente estructurales de los órganos en la desnutrición. Por otra parte, el páncreas, la médula espinal y el riñón presentaron cambios en la concentración de metales entre los animales control y desnutridos (Figura 26). Nuestras observaciones sugieren que la restricción del 50% de alimento no afecta de forma generalizada la concentración de metales en todos los órganos de las ratas. Probablemente porque exista un proceso de adaptación a la desnutrición independiente del sexo que no permite la interrupción de la homeostasis de los metales.

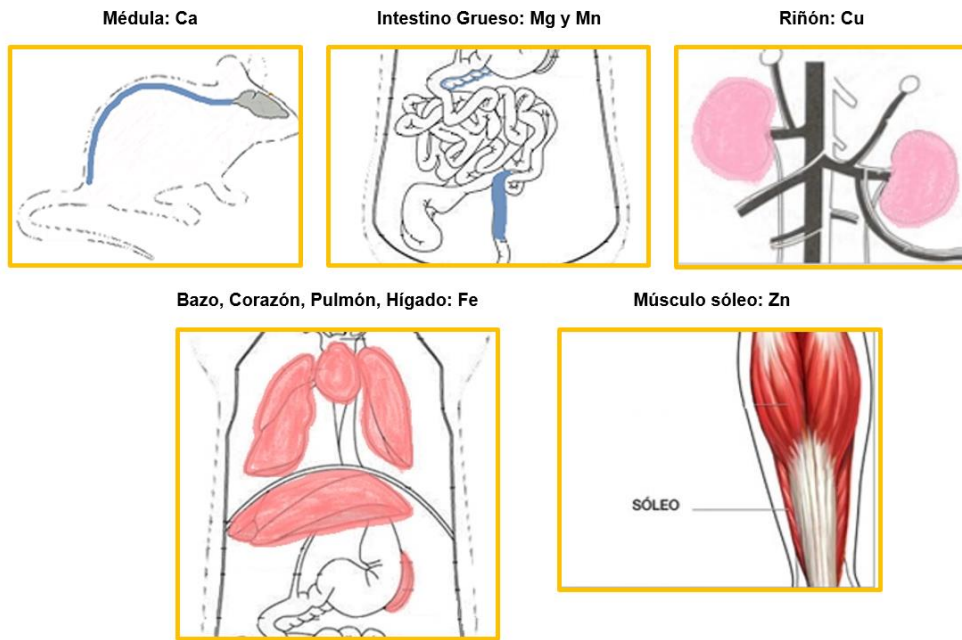


Figura 25. Acumulación de metales específicos en órganos particulares

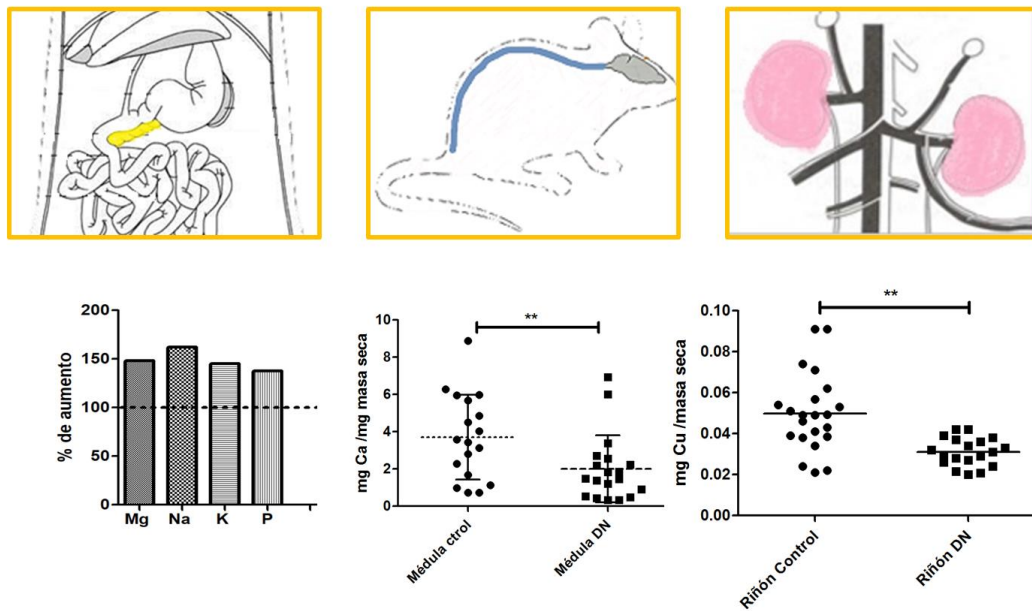


Figura 26. Cambios en la concentración de elementos por restricción calórica

Con base a nuestros resultados obtenidos concluimos lo siguiente:

1. No existen diferencias notables en la concentración de metales entre hembras y machos en los 13 órganos analizados. Además, existen pocas diferencias en la concentración de metales de animales control y desnutridos, siendo más bien diferencias órgano-específicas, en la cual el páncreas desnutrido fue el órgano con mayor diferencias. Por lo tanto, no se puede generalizar que la restricción crónica de alimento afecta la concentración de metales.
2. La médula espinal posee aproximadamente 10 veces más calcio comparada con el cerebro. Nuestros resultados del sincrotrón muestran que este ion se distribuye de forma distinta. En los animales desnutridos se nota una disminución en la acumulación de Ca en la médula espinal que muy probablemente se relacione con las alteraciones observadas en la inhibición presináptica en la médula espinal del animal desnutrido.
3. El páncreas desnutrido tiene mayor cantidad de metales comparado con su control. Faltan estudios que describan si el páncreas endocrino, exocrino o ambos son los responsables de la acumulación de metales durante la desnutrición.
4. El riñón guarda más cobre que el resto de los órganos analizados, posiblemente para evitar la intoxicación del resto de los órganos por el flujo de este metal pesado. La acumulación de cobre en el riñón del animal desnutrido es menor.
5. El músculo Sóleo de fibras lentas y metabolismo oxidativo, es el músculo y órgano con mayor concentración de zinc.

VII. ANEXO I

RESULTADOS ANOVA DE 2 VÍAS

Tabla 4. Diferencias entre machos y hembras

	Por sexo									Por desnutrición								
	Cu	Mn	Zn	Fe	Ca	Mg	Na	K	P	Cu	Mn	Zn	Fe	Ca	Mg	Na	K	P
Int.Delgado	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Int. Grueso	n.s.	*DN	n.s.	n.s.	n.s.	*C	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Hígado	n.s.	n.s.	n.s.	*DN	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*h	*h	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Pulmón	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Riñón	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bazo	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Páncreas	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*h	n.s.	n.s.	**m,h	**h	*m**h	**m.h
Corazón	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
EDL	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*h	n.s.
Gastrocnemio	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Sóleo	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*C	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*m	n.s.	n.s.	n.s.
Cerebro	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Médula esp	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*C	*C	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*h	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

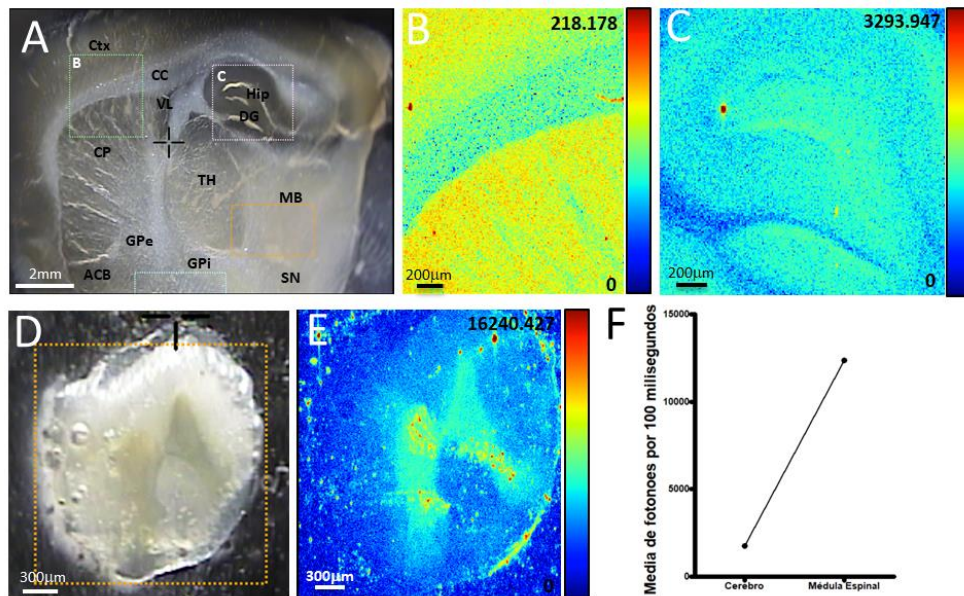
Tabla 5. Diferencias entre controles y desnutridos

	Por órgano									Por desnutrición								
	Cu	Mn	Zn	Fe	Ca	Mg	Na	K	P	Cu	Mn	Zn	Fe	Ca	Mg	Na	K	P
Int.Delgado	a	b	b,c	a	a	a,b	c	a,b	b	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Int. Grueso	a,b	c	c	a	b	c	c	a,b	b	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Hígado	b	b	a,b	c	a	a	a,b	a	b	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Pulmón	a	a	a,b	b,c	a	a	d	b	b	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Riñón	c	a,b	a,b	b	a	b	d	b	b	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bazo	a	a	a,b	c	a	b	a	d	b,c,d	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Páncreas	a	b	a,b	a	a	b	a,b	a	c,b	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	***	**	*	***
Corazón	b	a	a,b	b	a	a,b	c,d	a	a	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
EDL	a	a	a,b	a	a	b,c	a	a,b	a	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Gastrocnemio	a	a	a	a	a	b	a	a	a	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Sóleo	a	a	d	a	a	b	a	a	a	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Cerebro	a	a	a	a	a	a	c	c,d	c,d	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Médula esp	a	a	a	a	c	a	c	a	c,d	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

VIII. ANEXO II

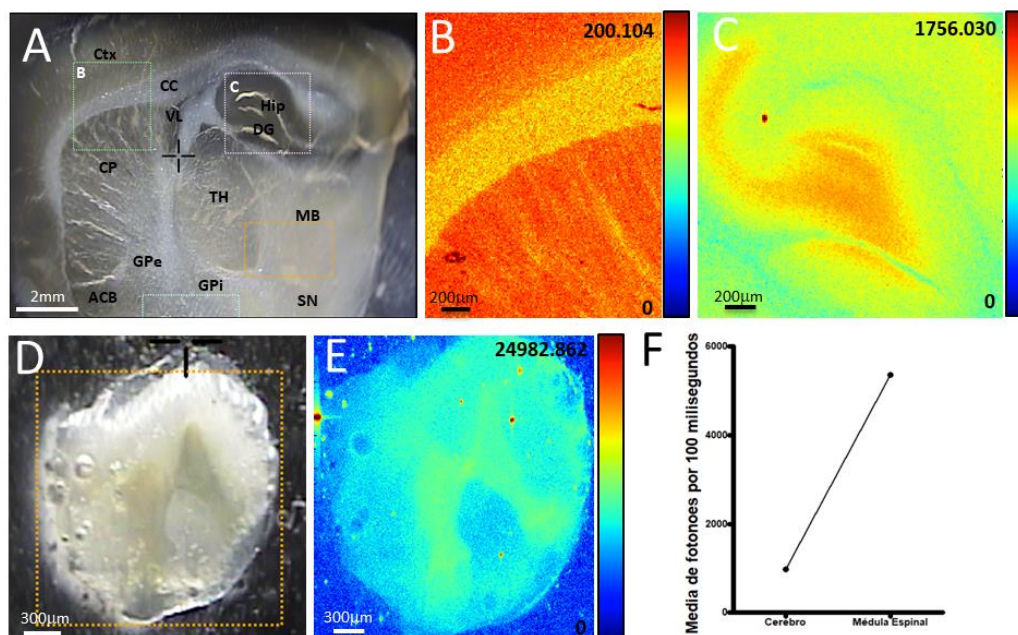
ANÁLISIS DE METALES EN EL CEREBRO Y MÉDULA ESPINAL POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE RAYOS X

En el cerebro y médula espinal de las ratas control (ver metodología) además de las mediciones en calcio, se cuantificó la concentración de hierro (anexo Figura 1), zinc (anexo Figura 2) y cobre (anexo Figura 3) por microscopía de fluorescencia de rayos X de sincrotrón. Los resultados mostrados a continuación y señalan que el cerebro tiene menor densidad de hierro comparado con la médula espinal (1351.71 y 12359.82 fotones por 100 ms respectivamente).



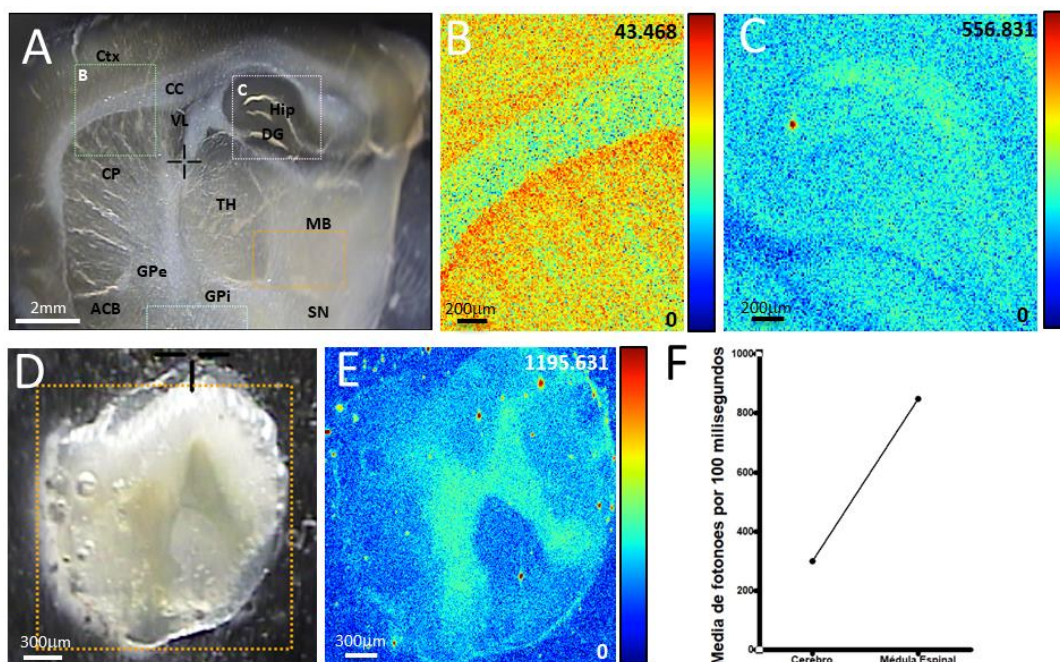
Anexo Figura 1. La microscopía de fluorescencia de rayos X de sincrotrón. Resolución de pixeles a $10 \mu\text{m}^2$. (A) Se muestra una imagen representativa de las estructuras analizadas en cerebro. La región AB: partes del Córtex (Ctx), Cuerpo calloso (CC) y Caudado Potámico (CP) y la región AC: Hipocampo (Hip) y Giro Dentado (DG). (B) Amplificación de la región AB del cerebro. El máximo espectral para la emisión de Hierro es de 218.178 fotones por 100 ms. (C) Distribución homogénea de hierro en la región AC del cerebro, el máximo espectral para la emisión de hierro es de 3293.947 fotones por 100 ms. (D) Imagen representativa de médula espinal. (E) La distribución de hierro en la médula espinal no es uniforme, se pueden observar pequeños cúmulos del metal en el borde del corte y cercanos a la materia gris. (F) La médula espinal reporta un espectral para la emisión de hierro mayor al del cerebro.

A su vez el zinc presenta una concentración similar al hierro en la región AB del cerebro (Córtex (Ctx), Cuerpo calloso (CC) y Caudado Potámico (CP)) y la mitad de la densidad del hierro en la región AC (Hipocampo (Hip) y Giro Dentado (DG)). En la médula espinal el zinc se concentra 54% más que el hierro. Concluyendo que en estas regiones la médula espinal almacena más zinc que el cerebro.



Anexo Figura 2. La microscopía de fluorescencia de rayos X de sincrotrón. Resolución de pixeles a $10 \mu\text{m}^2$. (A) Se muestra una imagen representativa de las estructuras analizadas en cerebro. La región AB: partes del Córtex (Ctx), Cuerpo calloso (CC) y Caudado Potámico (CP) y la región AC: Hipocampo (Hip) y Giro Dentado (DG). (B) Amplificación de la región AB del cerebro. El máximo espectral para la emisión de zinc es de 200.104 fotones por 100 ms. (C) La zona central del hipocampo y giro dentado presentan mayor concentración de zinc. El máximo espectral para la emisión de zinc es de 1756.030 fotones por 100 ms. (D) Imagen representativa de médula espinal. (E) Se pueden observar una distribución uniforme de zinc en la materia gris y cercana a ella pequeños cúmulos identificados con puntos rojos. (F) La médula espinal reporta un espectral para la emisión de zinc mayor al del cerebro.

El cobre fue el elemento de los reportados con menor densidad en cerebro y médula espinal. En el cerebro el promedio de fotones emitidos por cada 100 ms fue de 300.15, mientras en la médula espinal de 847.59. Con estos resultados concluimos que en la región cervical de la médula espinal hay mayor presencia de calcio, hierro, zinc y cobre respecto a las regiones del Córtex, Cuerpo caloso, Caudado Potámico, Hipocampo y Giro Dentado del cerebro.



Anexo Figura 3. La microscopía de fluorescencia de rayos X de sincrotrón. Resolución de pixeles a $10 \mu\text{m}^2$ (A) Se muestra una imagen representativa de las estructuras analizadas en cerebro. La región AB: partes del Córtex (Ctx), Cuerpo caloso (CC) y Caudado Potámico (CP) y la región AC: Hipocampo (Hip) y Giro Dentado (DG). (B) Amplificación de la región AB del cerebro. El máximo espectral para la emisión de cobre es de 43,468 fotones por 100 ms. (C) Distribución homogénea de cobre en la región AC del cerebro, el máximo espectral para la emisión de cobre es de 556,831 fotones por 100 ms. (D) Imagen representativa de médula espinal. (E) Se pueden observar una distribución casi uniforme de cobre en la materia gris, mayor densidad en las astas ventrales (F) La médula espinal reporta un espectral para la emisión de cobre mayor al del cerebro.

ANEXO III: DATOS CRUDOS OBTENIDOS POR ICP-OES

CALCIO	MACHOS										PERFUNDIDOS					HEMBRAS									
I. Delgado Ctrol	0.63	0.58	0.29	0.24	0.15	0.23	0.25	0.52	0.69				0.35	0.50	0.31	0.50	0.34	0.33	0.42	0.52	0.47	0.35	0.45	0.37	0.29
I. Delgado DN	0.70	0.61	0.52	0.21	0.19		0.48	0.45	0.41				0.66	0.83	0.52	0.35	0.44	0.53	0.45	0.45		0.51	0.75	0.52	0.53
I. Grueso Ctrol	1.52	1.74	0.64	3.81	0.44		0.70	0.76	1.31				1.58	2.12	1.30	1.27	0.73	0.63	0.93	0.70	1.24	1.09	1.25	0.95	0.80
I. Grueso DN	0.73	1.92	2.46	2.02	4.00		1.18	0.64	0.76				1.81	1.40	1.86	0.68	0.60	0.56	0.80	0.85		1.24	1.15	1.10	0.70
Higado Ctrol	0.10	0.09	0.13				0.09	0.09	0.09				0.11	0.20	0.14	0.10	0.10	0.08	0.13	0.15	0.13	0.17	0.18	0.14	0.17
Higado DN	0.10	0.09	0.11				0.10	0.07	0.08				0.19	0.21	0.11	0.08	0.08	0.09	0.12	0.16	0.14	0.14	0.14	0.14	0.18
Pulmón Ctrol	0.35	0.40	0.34	0.49	0.58	0.44	0.29	0.28	0.27				0.47	0.47	0.48	0.37	0.25	0.27	0.38	0.37	0.38	0.38	0.36	0.38	0.42
Pulmón DN	0.37	0.36		0.40	0.50		0.35	0.25	0.26				0.46	0.42	0.55	0.33	0.27	0.25	0.32	0.36	0.40	0.45	0.44	0.43	
Riñón Ctrol	0.16	0.12	0.15	0.28	0.29	0.53	0.41	0.42	0.37				0.43	0.37	0.44	0.32	0.34	0.36	0.28	0.35	0.34	0.28	0.34	0.34	0.36
Riñón DN		0.10	0.36	0.26			0.38	0.45	0.67				0.26	0.26	0.25	0.25	0.34	0.40	0.37	0.28	0.34	0.38	0.30	0.33	
Bazo Ctrol	0.14	0.17	0.15	0.28	0.16	0.19	0.23	0.23	0.26				0.16	0.12	0.18	0.26	0.24	0.24	0.17	0.16	0.19	0.14	0.15	0.16	0.16
Bazo DN	0.39	0.14		0.25	0.21		0.20	0.24	0.18				0.22	0.13	0.22	0.32	0.22	0.22	0.19	0.16			0.20	0.13	0.12
Páncreas Ctrol	0.29	0.16	0.21			0.36	0.32	0.34					0.28	0.27	0.29	0.31	0.33	0.28	0.29	0.25	0.26	0.18	0.13	0.18	0.14
Páncreas DN													0.31	0.29	0.39	0.38	0.38	0.44	0.36	0.35		0.41	0.44	0.49	0.39
Corazón Ctrol	0.18	0.21	0.21	0.38	0.27	0.29	0.23	0.22	0.23				0.34	0.40	0.28	0.21	0.18	0.28	0.19	0.18	0.18	0.20	0.28	0.22	0.39
Corazón DN	0.14	0.20	0.19	0.30	0.30		0.19	0.22	0.35				0.43	0.29	0.43	0.22	0.41	0.21	0.22	0.16		0.28	0.26	0.22	0.21
EDL Ctrol	0.23	0.26	0.25		0.27	0.31	0.17	0.20	0.18	0.24	0.26	0.22	0.365	0.278	0.281	0.18	0.14	0.22	0.22	0.23	0.26	0.22	0.26	0.34	0.35
EDL DN	0.40	0.26	0.24	0.26			0.24	0.21	0.15				0.521	0.726	0.285	0.54	0.47	0.30				0.12	0.48	0.89	0.44
Gastrocnemio Ctrol							0.15	0.18	0.18	0.32	0.25	0.22	0.338	0.269	0.364	0.15	0.15	0.17	0.26	0.26	0.22	0.24	0.33	0.33	0.30
Gastrocnemio DN							0.21	0.18	0.14	0.04	0.11		0.231	0.301	0.437	0.17	0.63	0.19	0.09	1.06		2.03	0.31	0.61	0.37
Soleo Ctrol							0.36	0.17	0.17	0.23	0.20	0.20	0.23	0.21	0.35	0.12	0.14	0.21	0.15	0.16	0.14	0.30	0.27	0.27	0.18
Soleo DN								0.08	0.20				0.51	0.16	0.28	0.35	0.18	0.12				0.32	0.31	0.42	0.25
Cerebro Ctrol	0.08	0.10	0.91	0.41	0.15	0.15	0.30	0.25	0.33				0.37	0.30	0.27	0.24	0.22	0.29	0.32	0.19	0.81	0.26	2.27	0.69	0.73
Cerebro DN	0.00	0.09	0.03	0.29	0.23		0.17	0.26	0.31				0.59	0.46	0.28	0.76	0.26	0.25	0.19	0.31		0.59	0.35	0.35	0.31
Médula ctrol	1.69	2.27	5.96	1.12	4.51	5.68		5.99	3.59					6.27		8.87	4.02	0.74	2.81	0.74	3.42	12.99	0.98	4.85	3.14
Médula DN	6.93	0.47	2.70	1.21	6.01	0.42	0.34	1.84	2.55				3.38	1.46		1.38	2.19	1.48	0.32	2.23		14.10	0.53	0.90	1.86

COBRE	MACHOS									PERFUNDIDOS						HEMBRAS							
I. Delgado Ctrol	0.005	0.006	0.006	0.002	0.002	0.003	0.007	0.009	0.009														
I. Delgado DN	0.004	0.005	0.006		0.001		0.010	0.011	0.010	0.011	0.010	0.007	0.009	0.008	0.010	0.009	0.009	0.008	0.004	0.002	0.000	0.002	
I.Grueso Ctrol	0.005	0.006	0.002	0.014	0.009		0.008	0.009	0.011														
I. Grueso DN	0.004	0.005	0.005	0.017	0.018		0.014	0.009	0.009	0.029	0.016	0.010	0.009	0.011	0.009	0.013	0.009	0.014	0.017	0.016	0.016	0.010	
Higado Ctrol	0.014	0.015	0.017	0.008	0.009	0.010	0.014	0.013	0.012														
Higado DN	0.014	0.015	0.037	0.017	0.013		0.017	0.016	0.016	0.020	0.014	0.024	0.014	0.013	0.013	0.014	0.015	0.016	0.018	0.017	0.018	0.018	
Pulmón Ctrol	0.006	0.008	0.006	0.005	0.006	0.009	0.006	0.007	0.007														
Pulmón DN	0.005	0.005	0.008	0.007	0.006		0.006	0.005	0.007	0.005	0.004	0.004	0.007	0.006	0.007	0.007	0.007	0.007	0.009	0.005	0.007	0.009	
Riñón Ctrol	0.021	0.024	0.022	0.034	0.041	0.049	0.053	0.062	0.051														
Riñón DN	0.037	0.031	0.042	0.032			0.027	0.033	0.029	0.039	0.057	0.049	0.046	0.054	0.038	0.043	0.091	0.071	0.049	0.091	0.039	0.074	
Bazo Ctrol				0.011	0.009	0.009	0.007	0.008	0.010														
Bazo DN			0.000	0.004	0.008		0.006	0.008	0.007	0.004	0.005	0.007	0.006	0.007	0.008	0.005	0.005	0.005	0.003	0.004	0.007	0.004	
Páncreas Ctrol	0.003	0.002	0.003		0.003	0.003	0.004																
Páncreas DN	0.003	0.007	0.002		0.005	0.006	0.006			0.002	0.003	0.002	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004	0.004	0.001	0.001	0.001	0.001	
Corazón Ctrol	0.017	0.016	0.017	0.021	0.024	0.022	0.013	0.018	0.019														
Corazón DN	0.015	0.019	0.017	0.019	0.023		0.018	0.018	0.024	0.027	0.028	0.028	0.020	0.019	0.018	0.019	0.022	0.021	0.021	0.021	0.021	0.029	
EDL Ctrol	0.003	0.003	0.005	0.007	0.005	0.004	0.007	0.010	0.006	0.005	0.006	0.006	0.010	0.007	0.008	0.004	0.005	0.006	0.004	0.004	0.005	0.001	
EDL DN	0.001	0.002	0.002	0.006	0.006		0.001	0.001	0.001	0.016	0.006	0.006	0.012	0.009	0.010	0.006	0.006	0.005	0.009	0.073		0.012	
Gastrocnemio Ctrol							0.006	0.006	0.007	0.007	0.006	0.005	0.012	0.007	0.009	0.004	0.005	0.009	0.005	0.006	0.007	0.006	
Gastrocnemio DN							0.005	0.005	0.004	0.005	0.005		0.005	0.006	0.006	0.005	0.003	0.004	0.006	0.004		0.007	
Soleo Ctrol							0.018	0.005	0.009	0.013	0.008	0.006	0.011	0.011	0.011	0.006	0.006	0.007	0.006	0.005	0.004	0.008	
Soleo DN							0.006	0.008		0.019	0.001	0.018	0.009	0.009	0.014	0.006	0.005	0.006	0.013	0.011		0.006	
Cerebro Ctrol	0.008	0.010	0.009	0.010	0.009	0.016	0.014	0.012	0.012														
Cerebro DN	0.010	0.012	0.011	0.013	0.013		0.007	0.013	0.013	0.014	0.013	0.014	0.013	0.012	0.013	0.010	0.010	0.011	0.011	0.009	0.010	0.009	
Médula ctrol	0.005	0.005	0.017	0.024	0.012		0.001	0.003	0.005														
Médula DN	0.005	0.006	0.006	0.012	0.006		0.004	0.002	0.003	0.004	0.004	0.004	0.003	0.001	0.003	0.005	0.005	0.007					

HIERRO	MACHOS									PERFUNDIDOS					HEMBRAS							
I. Delgado Ctrol	0.08	0.12	0.09	0.07	0.06	0.07	0.05	0.05	0.06	0.15	0.14	0.08	0.048	0.056	0.083	0.068	0.078	0.082	0.069	0.097	0.102	0.092
I. Delgado DN	0.14	0.11	0.07	0.09	0.09		0.06	0.07	0.09	0.11	0.08	0.16	0.069	0.090	0.062	0.083	0.085		0.092	0.113	0.123	0.091
I.Grueso Ctrol	0.08	0.09	0.07	0.19	0.12		0.05	0.05	0.05	0.09	0.13	0.06	0.065	0.052	0.072	0.061	0.046	0.077	0.070	0.078	0.078	0.052
I. Grueso DN	0.08	0.10	0.10	0.15	0.23		0.06	0.06	0.06	0.09	0.06	0.11	0.064	0.060	0.060	0.057	0.059		0.069	0.072	0.064	0.063
Higado Ctrol	0.49	0.65	0.46	0.37	0.28	0.27	0.26	0.27	0.28	0.37	0.54	0.46	0.492	0.523	0.539	0.556	0.606	0.746	0.943	0.599	0.869	0.905
Higado DN	0.33	0.32	0.27	0.55	0.72		0.74	0.74	0.79	0.48	0.44	0.87	1.671	1.119	0.924	0.799	1.899	0.749	0.827	0.886	0.733	
Pulmón Ctrol	0.60	0.41	0.41	0.86	0.91	0.72	0.39	0.40	0.34	0.59	0.68	0.49	0.387	0.387	0.322	0.340	0.358	0.419	0.408	0.483	0.550	0.504
Pulmón DN	0.26	0.50	0.30	0.85	0.74		0.34	0.44	0.41	0.52	0.44	0.28	0.683	0.415	0.643	0.574	0.371	0.482	0.714	0.401	0.519	
Riñón Ctrol	0.17	0.26	0.22	0.27	0.21	0.25	0.17	0.20	0.15	0.52	0.61	0.52	0.175	0.263	0.213	0.219	0.232	0.258	0.268	0.301	0.406	0.319
Riñón DN	0.26	0.36	0.33	0.28			0.25	0.22	0.25	0.43	0.40	0.46	0.356	0.156	0.194	0.239	0.243	0.379	0.519	0.295	0.295	
Bazo Ctrol	0.74	0.77	0.56	1.12	0.97	1.03	0.60	0.80	0.86	1.00	1.10	0.88	0.644	0.839	1.296	0.703	0.694	0.896	0.910	0.927	1.016	0.882
Bazo DN	0.53	0.49		1.28	1.26		0.71	0.81	0.67	0.54	0.63	0.98	1.363	0.804	0.872	0.879	0.691		0.789	0.910	0.902	0.863
Páncreas Ctrol	0.047	0.069	0.071	0.065	0.070	0.092	0.051	0.037	0.046	0.07	0.11	0.06	0.046	0.056	0.049	0.078	0.066	0.060	0.061	0.049	0.078	0.061
Páncreas DN	0.057	0.064	0.106	0.079	0.075		0.066	0.084	0.065	0.12	0.11	0.19	0.074	0.076	0.068	0.085	0.087		0.105	0.132	0.128	0.126
Corazón Ctrol	0.52	0.54	0.41	0.56	0.34	0.34	0.51	0.78	0.52	0.36	0.34	0.26	0.538	0.474	0.538	0.344	0.356	0.355	0.323	0.344	0.377	0.348
Corazón DN	0.32	0.32	0.42	0.42	0.64		0.34	0.42	0.41	0.27	0.27	0.36	0.385	0.456	0.352	0.369	0.314		0.404	0.317	0.341	0.319
EDL Ctrol	0.06	0.07	0.05	0.07	0.05	0.06	0.04	0.04	0.04	0.088	0.066	0.052	0.039	0.040	0.044	0.046	0.040	0.047	0.052	0.054	0.060	0.060
EDL DN	0.06	0.08	0.08	0.07	0.07		0.05	0.04	0.04	0.053	0.039	0.052	0.050	0.033	0.038	0.035	0.050		0.047	0.110	0.099	0.053
Gastrocnemio Ctrol							0.05	0.04	0.04	0.076	0.067	0.053	0.037	0.039	0.051	0.038	0.044	0.043	0.051	0.057	0.047	0.057
Gastrocnemio DN							0.04	0.04	0.03	0.040	0.035	0.048	0.060	0.041	0.035	0.041	0.038		0.047	0.062	0.046	0.054
Soleo Ctrol							0.13	0.05	0.08	0.105	0.086	0.102	0.061	0.059	0.059	0.073	0.066	0.072	0.061	0.073	0.085	0.065
Soleo DN							0.05	0.05	0.05	0.044	0.045	0.067	0.055	0.052	0.053	0.068	0.051		0.047	0.050	0.056	0.056
Cerebro Ctrol	0.10	0.09	0.09	0.10	0.05	0.11	0.10	0.09	0.08	0.07	0.07	0.08	0.102	0.088	0.094	0.060	0.058	0.071	0.076	0.073	0.080	0.080
Cerebro DN	0.08	0.09	0.09	0.23	0.08			0.09	0.09	0.08	0.07	0.10	0.089	0.090	0.096	0.069	0.068		0.065	0.067	0.073	0.078
Médula ctrol	0.12	0.12	0.13	0.09	0.08		0.04	0.04	0.06	0.04	0.04	0.04	0.041	0.042	0.028	0.047	0.045	0.039	0.075	0.062	0.050	0.061
Médula DN	0.06	0.08	0.07	0.10	0.07		0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.06	0.044	0.037	0.023	0.042	0.047		0.073	0.063	0.066	0.063

POTASIO	MACHOS										PERFUNDIDOS					HEMBRAS									
I. Delgado Ctrol	13.8	15.0	13.2	8.5	8.5	8.6	5.0	6.2	6.4			8.09	7.71	4.58	5.83	6.66	6.82	10.32	10.38	10.18	10.07	10.60	10.78	10.40	
I. Delgado DN	17.0	15.9	15.0	10.1	9.9		7.0	7.1	7.2			7.25	4.88	8.32	7.42	7.62	6.62	11.57	10.75		7.16	10.39	10.39	10.41	
I.Grueso Ctrol	11.8	11.2	13.9	12.0	13.7		6.2	6.9	7.1			8.52	8.00	4.90	7.60	6.66	6.49	11.98	8.81	12.01	9.57	10.22	9.04	10.34	
I. Grueso DN	17.6	14.4	15.3	13.3	13.4		8.1	7.6	7.8			7.65	5.26	9.39	6.92	7.45	7.33	11.87	11.45		8.27	10.12	11.01	11.54	
Higado Ctrol	11.2	10.7	10.9	8.2	7.8	8.1	5.8	5.7	5.9			7.86	7.88	7.92	6.47	6.15	5.77	8.36	8.42	8.23	8.05	8.83	7.30	8.51	
Higado DN	10.5	10.5	11.3	8.0	8.5		6.8	6.2	6.0			6.83	5.47	7.18	5.94	5.98	7.02	8.22	9.44	8.20	8.38	8.08	8.62		
Pulmón Ctrol	12.4	12.5	11.9	13.5	13.2	13.1	7.1	7.0	7.1			4.19	2.82	2.08	6.65	6.82	6.90	9.54	9.95	10.05	10.45	9.34	9.59	10.11	
Pulmón DN	13.4	12.4	12.5	13.0	13.0		7.5	6.2	7.2			3.88	6.54	5.37	6.60	7.41	7.20	9.16	10.48	10.14	11.33	11.32	10.95		
Riñón Ctrol	9.7	11.5	12.2	8.4	7.5	8.3	6.5	7.2	5.8			7.89	7.98	7.91	5.22	6.93	6.96	8.25	9.18	9.14	8.36	10.21	10.23	8.90	
Riñón DN	13.7	14.2	10.4	8.0			7.2	6.7	7.3			7.86	8.02	8.01	6.10	7.19	7.06	9.06	8.83	10.31	10.88	10.14	9.87		
Bazo Ctrol	19.5	19.1	20.3	17.1	15.1	16.9	9.7	10.1	11.0			11.39	10.83	10.28	9.42	9.94	10.11	14.50	14.33	14.24	12.45	12.56	12.75	12.03	
Bazo DN	20.2	19.4		17.1	18.5		10.1	10.9	10.5			9.11	9.67	11.73	10.40	10.78	10.58	13.75	13.16		14.56	13.24	13.65	14.28	
Páncreas Ctrol	6.30	6.29	8.05	3.85	9.32	8.52	6.56	5.01	5.90			4.02	5.19	3.11	6.15	6.79	6.61	7.78	7.74	6.47	4.64	4.15	4.72	4.29	
Páncreas DN	11.11	14.78	11.28	8.98			7.99	7.25	7.09			6.77	5.60	7.96	7.17	8.01	7.56	11.02	10.58		8.67	8.46	6.99	8.88	
Corazón Ctrol	12.8	12.9	13.1	8.7	9.1	8.8	6.1	7.4	7.7			6.75	6.10	4.67	7.78	7.43	7.36	9.34	9.67	9.36	8.51	8.99	9.13	9.32	
Corazón DN	13.1	14.0	13.5	9.5	10.3		7.6	8.2	7.6			6.85	8.12	7.42	7.87	7.21	7.71	9.61	9.67		9.51	9.90	9.41	10.46	
EDL Ctrol	15.5	16.9	15.6	13.3	11.8	11.2	8.9	9.7	8.7	8.5	8.9	5.8	9.32	6.64	8.20	9.55	9.08	8.41	8.54	8.60	9.06	8.74	8.78	9.61	9.21
EDL DN	17.4	18.2	17.3	12.6	12.0		12.3	13.0	10.2	9.0	10.2	5.9	10.91	9.20	9.13	10.30	11.20	13.29	9.64	9.88		9.01	17.15	11.76	9.88
Gastrocnemio Ctrol							8.2	8.4	9.0	8.3	8.2	8.3	8.57	8.46	6.31	7.64	8.34	8.58	8.24	7.89	8.38	9.10	8.74	7.50	8.92
Gastrocnemio DN							8.8	8.6	8.0	8.7	8.4		8.25	6.21	9.34	7.61	7.86	8.84	8.54	8.35		9.20	9.27	9.51	10.22
Soleo Ctrol							15.2	6.8	8.6	6.8	7.7	7.2	8.32	7.43	8.45	7.99	7.29	7.48	6.63	5.58	7.62	8.84	8.21	7.88	6.98
Soleo DN							8.5	8.8		7.9	6.9	7.1	10.79	5.54	7.98	7.44	8.42	8.29	6.99	6.77		6.40	8.30	7.63	9.91
Cerebro Ctrol	17.5	17.7	17.8	10.5	7.9	8.0	9.6	9.4	8.6			11.40	11.77	12.44	9.57	9.34	9.44	10.51	10.54	12.00	10.84	10.71	10.83	10.71	
Cerebro DN	17.6	19.0	19.4	11.7	13.1		9.1	10.7	10.5			12.88	12.66	12.56	10.30	10.56	10.73	12.12	12.83		12.97	12.23	12.19	12.02	
Médula ctrol	8.50	7.99	9.55	8.06	8.96		5.28	5.28	5.69			6.93	6.65	6.86	5.56	5.85	5.31	7.80	7.36	8.06	6.43	6.55	6.31	6.35	
Médula DN	8.82	10.07	9.30	8.75	9.04		6.21	6.26	6.38			8.47	8.32	8.22	6.80	6.45	6.09	7.99	9.36		7.40	7.47	7.38	7.71	

MAGNESIO	MACHOS									PERFUNDIDOS					HEMBRAS										
I. Delgado Ctrol	1.07	1.14	0.96	0.93	0.85	0.81	0.62	0.83	0.88	0.92	0.86	0.66	0.77	0.84	0.82	0.82	0.89	0.87	0.90	0.99	0.98	0.95			
I. Delgado DN	1.34	1.25	1.26	1.00	1.01		0.98	0.97	0.96	1.17	0.99	1.06	0.94	0.98	1.01	0.96	0.98		0.69	1.11	1.07	1.11			
I. Grueso Ctrol	1.09	1.15	0.97	1.67	1.03		0.96	1.00	1.19	1.07	1.51	1.36	1.17	0.96	0.90	1.11	0.82	1.27	1.07	1.10	0.97	1.03			
I. Grueso DN	1.27	1.35	1.51	1.44	1.77		1.16	1.11	1.15	1.22	1.07	1.24	1.03	1.08	1.14	0.98	1.01		0.91	1.07	1.18	1.13			
Hígado Ctrol	0.85	0.78	0.88	0.68	0.73	0.72	0.66	0.62	0.66	0.69	0.67	0.69	0.72	0.67	0.57	0.63	0.66	0.67	0.82	0.91	0.73	0.90			
Hígado DN	0.83	0.86	0.92	0.80	0.78		0.83	0.71	0.75	0.74	0.83	0.70	0.75	0.72	0.85	0.69	0.81	0.82	0.87	0.91	0.93				
Pulmón Ctrol	0.67	0.74	0.66	0.75	0.77	0.75	0.62	0.59	0.61	0.56	0.50	0.41	0.59	0.57	0.65	0.55	0.59	0.58	0.66	0.58	0.61	0.64			
Pulmón DN	0.74	0.65	0.70	0.73	0.81		0.66	0.52	0.64	0.61	0.59	0.70	0.54	0.65	0.58	0.49	0.60	0.72	0.77	0.85	0.83				
Riñón Ctrol	0.76	0.85	0.91	0.84	0.74	0.90	0.92	1.00	0.85	0.79	0.79	0.88	0.76	0.98	0.96	0.73	0.85	0.85	0.95	1.15	1.16	1.01			
Riñón DN	0.94	0.92	1.15	0.81			1.02	0.98	1.12	0.88	0.80	0.83	0.86	0.98	1.00	0.82	0.82	1.08	1.13	1.10	1.04				
Bazo Ctrol	1.07	1.09	1.20	1.06	0.87	1.03	1.11	1.10	1.23	0.88	0.79	0.89	1.10	1.08	1.11	0.94	0.92	0.93	0.90	0.95	0.95	0.92			
Bazo DN	1.24	1.10		1.01	1.08		1.04	1.17	1.14	0.82	0.87	0.86	1.11	1.11	1.10	0.85	0.81		1.02	0.88	0.99	0.98			
Páncreas Ctrol	0.572	0.483	0.665	0.281	1.015	0.950	1.020	0.780	0.878	0.74	0.74	0.60	0.93	1.04	1.02	0.78	0.79	0.70	0.59	0.52	0.61	0.54			
Páncreas DN	0.947	1.242	1.483	1.319	0.975		1.137	1.100	1.025	1.11	1.04	1.07	1.15	1.18	1.15	1.14	1.05		1.00	1.04	0.78	1.07			
Corazón Ctrol	1.03	1.03	1.10	0.89	0.91	1.06	0.72	0.88	0.99	0.93	0.90	0.86	0.98	0.97	0.88	0.79	0.86	0.85	0.87	0.94	0.93	0.99			
Corazón DN	1.03	0.96	0.93	0.96	1.03		0.95	1.00	1.02	0.97	0.93	0.99	1.05	0.91	1.04	0.81	0.82		0.89	0.98	0.91	1.02			
EDL Ctrol	1.28	1.42	1.30	1.38	1.18	1.12	1.06	1.19	1.07	1.14	1.19	0.73	1.21	0.81	1.02	1.11	1.01	1.06	1.11	1.09	1.23	1.06	1.07	1.19	1.13
EDL DN	1.31	1.35	1.26	1.17	1.13		1.19	1.37	1.16	0.92	1.00	0.59	1.48	1.28	1.04	1.36	1.47	1.49	1.10	1.13		0.96	2.09	1.47	1.29
Gastrocnemio Ctrol							1.00	1.00	1.10	1.16	1.15	1.11	1.09	1.07	0.90	0.96	1.00	1.03	1.12	1.11	1.18	1.16	1.12	0.97	1.17
Gastrocnemio DN							1.10	1.10	1.03	1.05	1.05		1.08	1.00	1.16	1.02	0.76	1.11	1.07	1.02		1.21	1.12	1.18	1.29
Soleo Ctrol							1.96	0.87	1.07	0.86	1.04	0.97	0.96	0.85	1.06	0.88	0.88	0.96	0.89	0.77	0.99	1.08	0.95	0.93	0.77
Soleo DN							0.86	1.01		0.84	0.71	0.84	1.39	0.67	0.96	0.90	0.92	0.90	0.72	0.65		0.70	0.94	0.83	1.12
Cerebro Ctrol	0.76	0.78	0.79	0.67	0.50	0.61	0.81	0.79	0.72	0.78	0.81	0.94	0.78	0.77	0.79	0.58	0.58	0.68	0.75	0.79	0.77	0.77	0.77		
Cerebro DN	0.72	0.78	0.79	0.74	0.88		0.68	0.87	0.85	0.86	0.84	0.84	0.84	0.86	0.85	0.68	0.72		0.79	0.78	0.81	0.81			
Médula ctral	0.81	0.68	0.84	0.62	0.75		0.58	0.66	0.62	0.61	1.21	0.67	0.67	0.60	0.49	0.57	0.51	0.60	0.72	0.51	0.57	0.53			
Médula DN	0.75	0.66	0.69	0.62	0.76		0.52	0.53	0.56	0.64	0.64	0.58	0.60	0.62	0.54	0.49	0.60		0.70	0.47	0.53	0.56			

MANGANESO	MACHOS									PERFUNDIDOS					HEMBRAS												
I. Delgado Ctrol	0.0052	0.0066	0.0046	0.0053	0.0044	0.0051	0.0042	0.0063	0.0080																		
I. Delgado DN	0.0063	0.0057	0.0051	0.0034	0.0036		0.0065	0.0049	0.0054	0.0052	0.0048	0.0029	0.0055	0.0045	0.0028	0.0047	0.0041	0.0035	0.0061	0.0041	0.0060	0.0045					
I.Grueso Ctrol	0.0212	0.0224	0.0250	0.0588	0.0072		0.0060	0.0050	0.0127																		
I. Grueso DN	0.0088	0.0221	0.0250	0.0398	0.0656		0.0142	0.0067	0.0067	0.0223	0.0240	0.0133	0.0099	0.0078	0.0047	0.0104	0.0107	0.0145	0.0157	0.0159	0.0135	0.0111					
Hígado Ctrol	0.0076	0.0065	0.0065	0.0062	0.0058	0.0061	0.0053	0.0050	0.0049																		
Hígado DN	0.0075	0.0078	0.0054	0.0096	0.0079		0.0079	0.0078	0.0072	0.0084	0.0079	0.0088	0.0055	0.0048	0.0056	0.0060	0.0070	0.0072	0.0083	0.0086	0.0075	0.0091					
Pulmón Ctrol	0.0006	0.0006	0.0005	0.0012	0.0011	0.0010	0.0005	0.0005	0.0006																		
Pulmón DN	0.0005	0.0005	0.0004	0.0010	0.0010		0.0006	0.0008	0.0005	0.0008	0.0006	0.0006	0.0005	0.0005	0.0005	0.0004	0.0004	0.0004	0.0008	0.0006	0.0008	0.0006					
Riñón Ctrol	0.0033	0.0030	0.0034	0.0031	0.0024	0.0028	0.0030	0.0033	0.0027																		
Riñón DN	0.0030	0.0036	0.0043	0.0026			0.0037	0.0038	0.0036	0.0033	0.0029	0.0035	0.0027	0.0027	0.0030	0.0026	0.0032	0.0032	0.0039	0.0043	0.0045	0.0041					
Bazo Ctrol	0.0006	0.0005	0.0007	0.0029	0.0011	0.0015	0.0008	0.0009	0.0008																		
Bazo DN	0.0004	0.0005		0.0011	0.0021		0.0007	0.0008	0.0006	0.0007	0.0006	0.0007	0.0020	0.0009	0.0008	0.0006	0.0006	0.0006	0.0008	0.0008	0.0008	0.0007					
Páncreas Ctrol	0.0023	0.0021	0.0029	0.0019	0.0051	0.0045	0.0044	0.0032	0.0040																		
Páncreas DN	0.0036	0.0056	0.0051	0.0060	0.0043		0.0050	0.0059	0.0046	0.0044	0.0043	0.0041	0.0040	0.0048	0.0047	0.0042	0.0040	0.0039	0.0038	0.0033	0.0043	0.0038					
Corazón Ctrol	0.0011	0.0011	0.0011	0.0011	0.0012	0.0017	0.0014	0.0017	0.0017																		
Corazón DN	0.0009	0.0009	0.0006	0.0010	0.0015		0.0012	0.0013	0.0017	0.0020	0.0020	0.0023	0.0016	0.0016	0.0014	0.0012	0.0015	0.0014	0.0015	0.0017	0.0015	0.0019					
EDL Ctrol	0.0003	0.0003	0.0005	0.0009	0.0012	0.0005	0.0003	0.0003	0.0003																		
EDL DN	0.0004	0.0005	0.0002	0.0010	0.0005		0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0002	0.0002	0.0004	0.0004					
Gastrocnemio Ctrol							0.0004	0.0004	0.0003																		
Gastrocnemio DN							0.0002	0.0003	0.0002	0.0009	0.0004	0.0006	0.0005	0.0004	0.0002	0.0003	0.0004	0.0004	0.0005	0.0004	0.0004	0.0005					
Soleo Ctrol							0.0010	0.0004	0.0005																		
Soleo DN							0.0008	0.0000		0.0005	0.0005	0.0007	0.0005	0.0006	0.0008	0.0006	0.0005	0.0007	0.0004	0.0005	0.0005	0.0005					
Cerebro Ctrol	0.0015	0.0013	0.0014	0.0013	0.0010	0.0019	0.0018	0.0017	0.0015																		
Cerebro DN	0.0013	0.0014	0.0012	0.0019	0.0016		0.0013	0.0018	0.0020	0.0021	0.0020	0.0021	0.0019	0.0016	0.0020	0.0014	0.0015	0.0016	0.0018	0.0016	0.0017	0.0017					
Médula ctrol	0.0014	0.0012	0.0013	0.0015	0.0011		0.0009	0.0008	0.0009																		
Médula DN	0.0012	0.0025	0.0014	0.0013	0.0014		0.0011	0.0010	0.0011	0.0013	0.0009	0.0014	0.0009	0.0009	0.0009	0.0011	0.0012	0.0011	0.0013	0.0012	0.0012	0.0012					

SODIO	MACHOS						PERFUNDIDOS						HEMBRAS												
I. Delgado Ctrol	3.91	4.51	3.75	1.36	1.23	1.59	1.54	2.04	1.88	2.25	1.92	1.08	1.89	1.71	1.86	1.84	1.91	1.94	2.54	2.51	2.43	2.11			
I. Delgado DN	4.32	3.83	3.82	1.96	1.55	2.53	1.78	2.01	1.86	1.65	2.23	1.99	2.00	2.06	1.89	2.30	1.74	2.61	2.52	2.71					
I.Grueso Ctrol	2.40	2.61	2.91	2.26	2.68	1.76	1.76	1.96	1.75	2.65	0.95	2.24	1.76	2.01	2.47	2.04	2.88	2.17	2.33	2.02	2.32				
I. Grueso DN	3.82	3.06	3.06	2.59	2.55	1.90	2.08	1.97	1.58	1.99	1.82	2.32	1.88	2.03	2.38	2.39	2.15	2.52	2.64	2.60					
Higado Ctrol	1.88	2.08	2.29	0.98	0.93	0.92	0.50	0.54	0.48	1.95	2.89	1.90	0.60	0.70	0.44	1.21	1.28	1.28	1.35	1.41	1.32	1.40			
Higado DN	2.12	1.88	2.07	1.17	1.54	0.67	0.57	0.54	1.98	1.51	1.45	0.50	0.61	0.64	1.26	1.47	1.53	1.32	1.70	1.67					
Pulmón Ctrol	5.55	5.66	5.45	4.77	5.25	4.74	1.61	1.53	1.59	2.16	1.73	0.85	1.40	1.52	1.52	3.48	3.68	3.67	4.13	3.89	3.85	3.99			
Pulmón DN	5.67	5.99	6.46	4.85	4.77	1.57	1.36	1.60	1.40	2.55	1.78	1.54	1.65	1.68	3.51	3.72	4.34	4.75	4.41	4.62					
Riñón Ctrol	3.93	5.23	5.05	2.57	2.42	2.73	2.42	2.68	2.08	3.26	3.30	3.43	1.95	2.52	2.59	2.21	2.81	2.78	3.74	3.70	4.47	3.65			
Riñón DN	4.64	5.08	3.30	2.43	2.40	2.34	2.29	4.09	3.71	3.62	1.87	2.25	2.32	2.74	2.90	4.86	4.87	4.42	4.59						
Bazo Ctrol	2.27	2.23	2.48	1.74	1.55	1.85	1.43	1.35	1.58	1.45	1.56	1.22	1.34	1.33	1.40	1.60	1.50	1.60	1.65	1.61	1.58	1.54			
Bazo DN	2.16	2.03	1.90	1.90	1.20	1.29	1.30	0.97	1.14	1.22	1.47	1.33	1.26	1.42	1.30	1.70	1.38	1.53	1.62						
Páncreas Ctrol	1.43	1.84	2.16	0.55	1.25	1.53	1.48	1.08	1.41	1.24	1.20	0.62	1.37	1.55	1.37	1.40	1.30	1.09	1.13	0.86	1.11	0.91			
Páncreas DN	2.49	2.54	3.10	1.53	1.31	1.89	2.10	1.83	1.38	1.35	1.87	1.83	2.31	2.14	1.85	1.86	2.54	2.54	2.29	2.52					
Corazón Ctrol	4.29	4.66	4.66	2.35	2.59	3.13	1.64	1.81	1.99	2.03	1.51	0.66	1.85	1.71	1.91	2.37	2.52	2.50	2.40	2.47	2.49	2.67			
Corazón DN	3.38	3.53	3.83	2.33	2.58	1.70	2.01	1.83	2.17	1.40	1.81	1.94	2.08	1.90	2.70	2.48	2.97	2.40	2.82	2.52					
EDL Ctrol	1.94	2.59	2.30	1.69	1.30	1.78	0.49	0.56	0.47	1.11	1.17	0.96	0.98	0.99	0.89	0.49	0.48	0.54	0.88	1.02	1.03	1.37	1.34	1.51	1.41
EDL DN	2.86	4.29	2.55	1.95	1.88	0.55	0.61	0.47	1.40	0.78	0.38	0.63	0.69	0.89	0.57	0.60	0.67	0.90	1.12	1.44	2.53	1.81	1.48		
Gastrocnemio Ctrol							0.46	0.45	0.46	1.03	0.98	0.89	1.06	1.10	0.86	0.47	0.56	0.55	1.14	1.04	1.06	1.30	1.39	1.39	1.33
Gastrocnemio DN							0.60	0.66	0.48	1.00	1.17	0.83	0.49	1.35	0.68	0.63	0.57	1.18	1.16	1.91	1.76	1.51	1.68		
Soleo Ctrol							1.99	0.85	0.95	1.45	1.45	1.40	1.20	1.32	1.53	0.79	0.74	0.69	1.21	1.02	1.33	1.27	1.44	1.42	1.27
Soleo DN							0.72	0.65	1.47	0.89	1.19	1.00	0.44	0.84	0.80	0.79	0.70	1.30	1.14	1.37	1.58	1.40	1.52		
Cerebro Ctrol	4.34	4.34	4.43	1.95	1.60	1.78	2.01	2.06	1.83	3.25	3.33	3.63	2.02	1.96	1.90	2.13	2.15	2.43	2.87	2.90	2.87	2.83			
Cerebro DN	3.76	3.94	4.05	2.19	2.51	1.64	2.04	2.03	3.54	3.40	3.68	1.98	2.05	2.07	2.36	2.46	3.31	3.01	3.03	3.04					
Médula ctrol	3.50	2.98	3.58	2.62	3.67	1.91	1.93	2.00	2.56	2.81	2.41	2.02	1.94	1.80	1.82	1.74	1.95	2.07	1.89	1.96	1.93				
Médula DN	2.74	2.92	2.90	3.17	2.96	1.91	1.98	1.95	2.42	2.46	2.84	2.29	2.07	1.95	1.75	2.16	2.34	1.82	2.04	2.30					

FÓSFORO	MACHOS										PERFUNDIDOS					HEMBRAS									
I. Delgado Ctról	15.53	16.64	15.43	12.39	11.31	11.12	8.65	10.65	11.52			14.66	13.15	10.24	10.45	11.40	10.97	11.76	13.01	13.51	14.38	14.93	15.33	14.61	
I. Delgado DN	17.91	17.39	16.36	12.48	12.85		12.41	12.81	12.12			16.15	12.93	16.78	12.41	12.99	12.33	13.71	13.85		9.78	15.38	15.36	16.22	
I.Grueso Ctról	12.50	11.84	13.26	14.54	17.12		11.28	11.36	9.53			11.56	11.86	7.62	12.00	9.39	11.53	12.63	8.92	13.18	12.14	12.19	12.33	12.03	
I. Grueso DN	16.13	14.67	15.09	15.07	15.38		11.06	12.41	13.36			12.83	10.12	13.20	12.12	12.61	12.91	12.65	12.42		10.57	12.36	13.62	13.43	
Higado Ctról	14.03	13.05	14.08	9.34	9.14	9.10	8.43	8.44	8.16			1.98	1.51	1.45	8.91	8.27	7.28	9.43	9.80	10.15	13.57	13.92	12.69	14.79	
Higado DN	12.46	12.99	13.36	10.58	10.57		10.48	9.62	9.80			11.31	13.58	10.54	9.73	9.98	11.09	10.26	12.12	13.92	12.93	14.49	14.88		
Pulmón Ctról	11.23	11.58	11.16	15.08	14.55	14.61	9.46	8.95	8.90			10.77	10.07	8.37	8.75	8.31	9.33	9.94	10.15	10.03	12.15	10.89	11.79	12.08	
Pulmón DN	13.25	11.24	12.42	14.73	15.59		9.48	7.66	9.32			11.29	11.16	12.91	7.92	9.19	8.24	8.09	11.09	14.92	15.35	16.98	16.65		
Riñón Ctról	10.92	12.85	14.11	10.84	9.53	10.93	12.79	14.26	11.93			12.26	12.24	12.35	11.14	13.85	13.75	10.52	12.32	12.39	14.81	15.61	17.86	14.99	
Riñón DN	14.45	13.66	13.97	10.41			14.72	14.33	16.61			13.19	13.24	13.44	11.83	13.62	13.94	12.16	12.21	16.78	17.88	17.49	16.17		
Bazo Ctról	18.52	17.47	20.92	18.69	16.45	18.84	17.02	16.89	18.93			16.06	14.73	15.82	15.99	16.14	16.35	15.44	15.41	15.65	15.38	16.31	16.63	15.50	
Bazo DN	19.02	18.91		18.36	21.39		14.89	17.06	16.72			16.03	17.35	16.00	15.18	15.83	15.39	13.71	12.77		16.50	13.72	16.28	16.80	
Páncreas Ctról	8.9	8.9	11.6	6.0	15.2	14.3	13.0	10.3	11.7			13.53	13.95	13.99	12.39	13.69	13.88	13.03	13.43	11.86	11.09	9.95	11.58	10.63	
Páncreas DN	13.6	17.9	23.3	18.6	13.2		14.6	13.5	12.8			20.62	19.79	19.80	13.92	14.95	14.18	18.37	16.70		16.26	16.95	13.01	18.37	
Corazón Ctról	10.93	10.97	11.68	7.85	8.61	14.06	7.38	9.22	10.27			10.95	10.95	10.19	10.36	10.08	9.25	8.84	9.51	9.34	9.34	10.00	9.77	10.03	
Corazón DN	11.78	11.59	10.94	7.94	9.85		10.26	10.61	10.13			11.71	10.68	10.98	10.75	10.12	10.84	9.05	9.15		10.49	11.03	10.55	11.16	
EDL Ctról	11.32	12.33	11.54	11.77	10.50	10.48	8.4	9.1	8.2	8.2	8.5	5.9	11.37	8.26	9.67	8.77	8.34	8.37	7.78	7.84	8.31	9.94	10.21	11.07	10.72
EDL DN	11.64	11.94	11.97	10.55	9.99		10.4	9.7	9.0	6.8	8.1	6.5	13.18	10.76	10.68	8.88	9.30	10.47	8.03	8.28		10.03	20.18	13.14	11.13
Gastrocnemio Ctról							8.0	8.2	8.3	8.1	7.9	7.8	10.12	10.38	8.78	7.60	7.56	8.11	7.75	7.63	7.95	10.89	10.62	9.54	11.35
Gastrocnemio DN							8.2	8.4	8.0	7.2	7.3		9.81	8.42	11.10	7.84	6.70	8.46	7.68	7.66		11.99	11.18	11.51	11.92
Soleo Ctról							15.3	6.6	8.5	6.6	7.8	7.2	9.50	8.34	10.14	7.02	6.98	6.89	6.23	5.57	6.87	10.43	9.08	8.51	7.71
Soleo DN							7.3	7.8		6.4	5.9	6.0	12.76	7.08	9.26	7.21	7.44	7.11	5.76	5.86		8.16	9.00	8.19	10.66
Cerebro Ctról	15.29	16.30	16.23	11.56	8.55	9.33	15.28	15.12	13.55			17.31	17.41	20.39	15.11	14.71	14.62	11.94	12.33	14.58	16.06	17.56	16.53	16.63	
Cerebro DN	15.90	16.68	17.33	12.93	15.00		14.01	16.60	15.73			18.40	17.15	18.01	16.31	16.21	16.06	13.82	14.52		15.72	15.30	16.17	16.02	
Médula ctról	23.3	18.5	23.8	18.2	21.4		13.9	16.7	15.1			21.79	34.86	21.95	15.78	14.23	12.00	16.75	15.45	17.15	22.93	17.19	19.37	18.17	
Médula DN	19.2	17.1	18.1	22.6	21.4		11.5	12.1	12.4			20.46	21.59	19.88	13.35	13.72	12.20	14.22	16.82		22.11	16.02	16.32	16.92	

ZINC		MACHOS										PERFUNDIDOS					HEMBRAS								
I. Delgado Ctrol	0.099	0.102	0.095	0.093	0.077	0.078	0.065	0.080	0.088				0.134	0.126	0.122	0.076	0.081	0.085	0.093	0.101	0.109	0.115	0.119	0.120	0.116
I. Delgado DN	0.119	0.115	0.097	0.094	0.093		0.091	0.097	0.089				0.163	0.150	0.149	0.091	0.092	0.104	0.112	0.103		0.091	0.120	0.120	0.118
I. Grueso Ctrol	0.110	0.107	0.094	0.173	0.127		0.136	0.153	0.113				0.163	0.148	0.115	0.117	0.100	0.145	0.132	0.099	0.137	0.143	0.151	0.140	0.140
I. Grueso DN	0.115	0.114	0.127	0.201	0.222		0.127	0.115	0.125				0.161	0.126	0.161	0.124	0.117	0.114	0.136	0.138		0.117	0.149	0.142	0.148
Higado Ctrol	0.107	0.102	0.113	0.071	0.072	0.075	0.083	0.065	0.059				0.114	0.104	0.108	0.060	0.056	0.058	0.074	0.079	0.084	0.119	0.122	0.116	0.122
Higado DN	0.095	0.090	0.143	0.087	0.094		0.081	0.075	0.075				0.103	0.110	0.121	0.078	0.088	0.102	0.105	0.133	0.136	0.114	0.169	0.174	
Pulmón Ctrol	0.071	0.089	0.071	0.117	0.121	0.115	0.064	0.059	0.059				0.104	0.093	0.084	0.056	0.054	0.060	0.077	0.086	0.085	0.101	0.085	0.096	0.103
Pulmón DN	0.087	0.071	0.070	0.116	0.123		0.061	0.052	0.081				0.103	0.104	0.131	0.052	0.062	0.055	0.065	0.088	0.125	0.144	0.143	0.132	
Riñón Ctrol	0.081	0.090	0.108	0.077	0.068	0.077	0.078	0.086	0.076				0.106	0.107	0.107	0.065	0.085	0.081	0.083	0.100	0.100	0.119	0.132	0.142	0.126
Riñón DN	0.105	0.079	0.102	0.076			0.086	0.084	0.096				0.110	0.102	0.107	0.062	0.068	0.097	0.109	0.105	0.126	0.129	0.134	0.130	
Bazo Ctrol	0.086	0.079	0.092	0.110	0.096	0.108	0.088	0.092	0.098				0.091	0.085	0.095	0.081	0.087	0.088	0.079	0.081	0.082	0.095	0.097	0.097	0.095
Bazo DN	0.083	0.086		0.113	0.125		0.080	0.094	0.089				0.092	0.096	0.093	0.090	0.084	0.085	0.074	0.068		0.100	0.087	0.098	0.121
Páncreas Ctrol	0.044	0.038	0.052	0.027	0.065	0.057	0.059	0.047	0.054				0.081	0.085	0.081	0.055	0.064	0.058	0.060	0.058	0.056	0.062	0.051	0.060	0.054
Páncreas DN	0.071	0.083		0.086	0.074		0.055	0.057	0.052				0.101	0.097	0.124	0.064	0.071	0.075	0.104	0.090		0.091	0.089	0.075	0.091
Corazón Ctrol	0.066	0.068	0.071	0.059	0.062	0.074	0.060	0.077	0.084				0.111	0.108	0.109	0.084	0.082	0.078	0.066	0.072	0.068	0.081	0.086	0.078	0.086
Corazón DN	0.076	0.073	0.070	0.057	0.074		0.079	0.083	0.091				0.149	0.114	0.117	0.080	0.082	0.092	0.067	0.071		0.085	0.103	0.088	0.092
EDL Ctrol	0.053	0.053	0.062	0.059	0.060	0.098	0.042	0.041	0.039	0.045	0.045	0.060	0.077	0.077	0.057	0.043	0.036	0.043	0.041	0.039	0.049	0.054	0.067	0.064	0.067
EDL DN	0.123	0.076	0.066	0.184	0.140		0.049	0.049	0.039	0.034	0.040	0.034	0.075	0.063	0.065	0.054	0.032	0.053	0.040	0.041	0.063	0.137	0.106	0.071	
Gastrocnemio Ctrol							0.045	0.040	0.041	0.067	0.054	0.048	0.075	0.071	0.069	0.043	0.038	0.059	0.039	0.052	0.047	0.056	0.080	0.051	0.072
Gastrocnemio DN							0.038	0.043	0.037	0.040	0.036		0.060	0.067	0.064	0.052	0.032	0.040	0.042	0.046		0.073	0.090	0.068	0.074
Soleo Ctrol							0.307	0.146	0.178	0.140	0.168	0.166	0.235	0.209	0.215	0.165	0.164	0.148	0.181	0.148	0.185	0.082	0.268	0.259	0.213
Soleo DN							0.173	0.175		0.186	0.139	0.161	0.096	0.176	0.228	0.146	0.205	0.164	0.151	0.149		0.174	0.096	0.226	0.088
Cerebro Ctrol	0.063	0.066	0.063	0.047	0.034	0.049	0.067	0.068	0.060				0.079	0.080	0.084	0.061	0.066	0.063	0.049	0.051	0.058	0.074	0.075	0.073	0.076
Cerebro DN	0.061	0.068	0.067	0.054	0.056		0.032	0.077	0.070				0.085	0.080	0.082	0.071	0.073	0.073	0.059	0.063		0.073	0.073	0.075	0.076
Médula ctrl	0.049	0.033	0.036	0.026	0.039		0.022	0.028	0.023				0.038	0.057	0.032	0.033	0.030	0.022	0.026	0.025	0.026	0.035	0.025	0.029	0.029
Médula DN	0.036	0.035	0.035	0.038	0.032		0.026	0.029	0.022				0.033	0.035	0.040	0.074	0.030	0.021	0.024	0.030		0.039	0.030	0.030	0.033

X. REFERENCIAS

1. Malnutrition, OMS, 2018. <http://www.who.int/nutrition/es/>
2. Gómez-Santos Federico. Desnutrición. (1946); *Bol Med Hosp Infant Mex.* 3:543-51 (Reimpresión: *Bol Med Hosp Infant Mex.* (2016); 73(5):297--301)
3. De Onis M, Onyango AW, Van den Broeck J, Chumlea WC, Martorell R, for the WHO Multicentre Growth Reference Study Group Measurement and standardization protocols for anthropometry used in the construction of a new international growth reference. (2004) *Food Nutr Bull*;25(1) (supl 1):S27
4. Curvas de Crecimiento. Organización Mundial de la Salud (OMS) www.who.int/childgrowth/standards/en/index.html
5. Cortés-Barberena, E.; González-Márquez, H.; Gómez-Olivares, J. L.; Ortiz-Muñiz, R. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. (2008) *Clinical and Experimental Immunology* 152, 585–592.
6. Keenan, K. P.; Laroque, P.; Ballam, G. C.; Soper, K. A.; Dixit, R.; Mattson, B. A.; Adams, S. P.; Coleman, J. B., The effects of diet, ad libitum overfeeding, and moderate dietary restriction on the rodent bioassay: the uncontrolled variable in safety assessment (1996) *Toxicologic Pathology* 24, 757–768.
7. Ruiz-Rosado A, Cabrera-Fuentes HA, González-Calixto C, González-López L, Cázares-Raga FE, Segura-Alegría B, Lochnit G, de la Cruz Hernández-Hernández F, Preissner KT, Jiménez-Estrada I. Influence of chronic food deprivation on structure-function relationship of juvenile rat fast muscles. (2013) *J Muscle Res Cell Motil.* 34(5-6):357-68
8. Ruiz-Rosado A, Fernández-Valverde F, Mariscal-Tovar S, Hinojosa-Rodríguez C, Hernández-Valencia J, Anzueto-Rios A, Guadarrama-Olmos JC, Segura-Alegría B, Jiménez-Estrada I. Histoenzymatic and Morphometric Analysis of Muscle Fiber Type Transformation during the

- Postnatal Development of the Chronically Food-Deprived Rat. (2013)
Journal of Histochemistry & Cytochemistry 61(5) 372–381
9. Rodríguez, et al (En preparación)
 10. Quiroz-González S, Segura-Alegría B, Olmos JC, Jiménez-Estrada I. (2012) The effect of chronic undernourishment on the synaptic depression of cutaneous pathways in the rat spinal cord. *Brain Res Bull.* 1;89(3-4):97-101
 11. Malnutrición relacionada con micronutrients. <https://www.who.int>
 12. Stephen J. Crozier, Louis G. D'Alecy, Stephen A. Ernst, Lauren E. Ginsburg, and John A. Williams. Molecular mechanisms of pancreatic dysfunction induced by protein malnutrition (2009) *Gastroenterology.* 137(3): 1093–1101
 13. Nielsen FH. The Importance of Diet Composition in Ultratrace Element Research. (1985) *J Nutr.* Octubre de 1985; 115 (10): 1239-47.
 14. Trace Elements in book, *Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk*, (1989)
 15. AG Szent-Gyorgyi. Calcium regulation of muscle contraction. (1975) *Biophysical Journal* Vol15 (7): 707–723.
 16. Thomas C. Südhof. Calcium Control of Neurotransmitter Release. (2012) *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(1)
 17. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. *Second Messengers. Neuroscience.* 2nd edition. (2001) Sunderland (MA): Sinauer Associates
 18. Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. (1988) *Development* 102. 639-655
 19. Martínez de Victoria. Calcium, essential for health. *Nutr. Hosp.* vol.33 supl.4
 20. Sáez A, Lozano E, Zaldívar-Riverón A. Evolutionary history of Na,K-ATPases and their osmoregulatory role. (2009) *Genetica.* Volume 136, Issue 3, pp 479–49
 21. Vandenheede J, Vanden Abeele C, Merlevede W. The ATP, Mg-dependent phosphatase: Role of Mg ions in the expression of the

- phosphorylase phosphatase activity. (1986). Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol 136 pp 16-21
22. Krishna S, Majumdar I, Grishin N. Structural classification of zinc fingers: survey and summary. (2003) Nucleic Acids Research, Volume 31, Pages 532–550
 23. Pauling Linus. The hemoglobin molecule in health and disease. (1951) American Philosophical Society, Volume 96, Number 5. 556-565
 24. Pereyra-Venegas J, Segura-Alegría B, Guadarrama-Olmos J.C, Mariscal-Tovar S, Quiróz-González S, Jiménez-Estrada I. Effects provoked by chronic undernourishment on the fibre type composition and contractility of fast muscles in male and female developing rats. (2014) Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition Volume 99, Issue 5
 25. Sincrotrón ALBA. ¿Qué es ALBA tecnología? <https://www.cells.es>
 26. Nutrient Requirements of Laboratory Animals Fourth Revised Edition, 1995
 27. Cole RL, Lechner SM, Williams ME, Prodanovich P, Bleicher L, Varney MA, Gu G. (2005) Differential distribution of voltage-gated calcium channel alpha-2 delta (alpha2delta) subunit mRNA-containing cells in the rat central nervous system and the dorsal root ganglia. J Comp Neurol. 24;491(3):246-69
 28. Zhang M, Moller M, Broman J, Sukiasyan N (2008) Expression of calcium channel CaV1.3 in cat spinal cord: Light and electron microscopic immunohistochemical study. The Journal of Comparative Neurology 507(1):1109-27
 29. Sukiasyan N, Hultborn H, Zhang M (2009) Distribution of calcium channel CaV1.3 immunoreactivity in the rat spinal cord and brain stem. Neuroscience. Volume 159, Issue 1, 3, Pages 217-235
 30. Segura B, Guadarrama JC, Pratz G, Mercado V, Merchant H, Cintra L, Jiménez I. (2004) Conduction failure of action potentials in sensory sural nerves of undernourished rats. Neuroscience Letters 354 (2004) 181–184

31. Baraban M, Koudelka S, Lyons DA (2018) Ca²⁺ activity signatures of myelin sheath formation and growth in vivo. *Nat Neurosci.* 21(1): 19–23.
32. Miller R (2018) Calcium control of myelin sheath growth. *Nature Neuroscience.* volume 21, pages 2–3
33. Sáez A, Lozano E, Zaldívar-Riverón A. Evolutionary history of Na,K-ATPases and their osmoregulatory role. (2009) *Genetica.* Volume 136, Issue 3, pp 479–49
34. L. Yu. AS (2015) Claudins and the kidney. *J Am Soc Nephrol*; 26(1): 11–19.
35. Breiderhoff T, Himmerkus N, Stuver M, Mutig K, Will C, Meij IC, Bachmann S, Bleich M, Willnow TE, Müller D (2012) Deletion of claudin-10 (Cldn10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis. *Proc Natl Acad Sci.* 109(35):14241-6
36. Sastre J, Sabater L, Aparisi L. Fisiología de la secreción pancreática (2005) *Gastroenterol Hepatol.* 28 (Supl 2):3-9
37. The Pancreas Center. Columbia University Irving Medical Center.
38. Ribet A, Vaysse N, Clemente F. Fisiología del páncreas exocrino. Fisiología humana. Barcelona: 1985. p. 273-308.
39. Stephen J. Crozier, Louis G. D'Alecy, Stephen A. Ernst, Lauren E. Ginsburg, and John A. Williams. Molecular mechanisms of pancreatic dysfunction induced by protein malnutrition (2009) *Gastroenterology.* 137(3): 1093–1101
40. Case RM, Harper A, Scratcherd. The secretion of electrolytes and enzymes by the pancreas of the anaesthetized cat (1969). *J Physiol*, 201, 335-348
41. Pandolf S.J The exocrine pancreas. Water and ion secretion from the pancreatic ductal system. (2010).
42. GO Barbezat, JDL Hansen. The exocrine pancreas and protein-calorie malnutrition (1968) *Pediatrics.* Volume 42 / Issue 1

43. Fu Z, Gilbert E.R. Liu D (2014). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 9(1): 25–53.
44. Hiriart M, Aguilar-Bryan L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic B-cell. (2008) *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1298–306
45. García-Delgado N, Velasco M, Sánchez-Soto C, Díaz-García CM, Hiriart M. Calcium Channels in Postnatal Development of Rat Pancreatic Beta Cells and Their Role in Insulin Secretion (2018) *Frontiers Endocrinology*
46. Honka MJ, Latva-Rasku A, Bucci M, Virtanen KA, Hannukainen JC, Kalliokoski K, Nuutila P (2018) Insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle, adipose tissue and liver: a positron emission tomography study. *European Journal of Endocrinology*, 178(5): 523–531
47. Rui L (2014) Energy Metabolism in the liver. *Compr Physiol.* 4(1): 177–197.
48. Winter W. E, Bazydlo L, Harris N. The Molecular Biology of Human Iron Metabolism (2014) *Laboratory Medicine*, Volume 45, Issue 2, Pages 92–102
49. Takami T, Sakaida I. Iron regulation by hepatocytes and free radicals (2011) *J Clin Biochem Nutr.*; 48(2): 103–106
50. Ghio A, Turi J, Yang F, Garrick L, Garrick M. D (2006) Iron homeostasis in the lung. *Biol. Res.* vol.39 no.1 Santiago
51. Ivan M, Grieve M (1976) Effects of Zinc, Copper, and Manganese Supplementation of High-Concentrate Ration on Gastrointestinal Absorption of Copper and Manganese in Holstein Calves. *Animal Research Institute, Agriculture Canada, Ottawa* Vol 59. No. 10 (1764-1768)
52. Wolff MS (1964) Renal Lesions in Wilson's Disease, *Lancet* 1:843
53. Winston Evering, Susan Haywood, Jim Trafford. Low Molecular Weight Proteins in the Kidney of Copper-Loaded Rats (1989) *Nephrotoxicity* P. H. Bach et al. (eds.), Springer Science+Business Media New York

54. S. Haywood, J. Trafford, and M. Loughran. Copper toxicosis and tolerance in the rat: IV. Renal tubular excretion of copper (1985) *Br J Exp Pathol.* 66(6): 699–707
55. Kurasaki M, Okabe M, Saito S, Suzuki-Kurasaki M. (1998) Copper metabolism in the kidney of rats administered copper and copper-metallothionein. *American Journal of Physiology. Renal Physiology.*
56. Soukup T, Zacharová G, Smerdu V. Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. (2002) *Acta Histochemica.* Vol 104(4) 399–405
57. Alice J. Crawford & Syamal K. Bhattacharya. Excessive Intracellular Zinc Accumulation in Cardiac and Skeletal Muscles of Dystrophic Hamsters (1987). *Experimental Neurology* 95,265-276
58. Gang Wang, Anup K. Biswas, Wanchao Ma, Manoj Kandpal, Courtney Coker, Paul M. Grandgenett, Michael A. Hollingsworth, Rinku Jain, Kurenai Tanji, Sara López-Pintado, Alain Borczuk, Doreen Hebert, Supak Jenkitkasemwong, Shintaro Hojyo, Ramana V. Davuluri, Mitchell D. Knutson, Toshiyuki Fukada & Swarnali Acharyya. Metastatic cancers promote cachexia through ZIP14 upregulation in skeletal muscle (2018) *Nature Medicine* volume 24, pages770–781
59. Paskavitz A, Quintana J, Cangussu D, Tavera Montañez C, Xiao Y, Ortiz-Miranda S, Navea JG, and Padilla Benavides T. (2018) Differential expression of zinc transporters accompanies the differentiation of C2C12 myoblasts. *J Trace Elem Med Biol*; 49: 27–34