



**Cinvestav**

**Centro de Investigación y Estudios Avanzados  
del Instituto Politécnico Nacional**  
Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

# **“Efecto de la quinurenina en la regulación del zinc en ratones”**

## **T E S I S**

Que presenta:

**Norma Orama Rojo**

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias**

En la especialidad de:

**Fisiología Celular y Molecular**

Director de tesis:

**Dr. Fanis Missirlis**

Ciudad de México

Mayo, 2023

## **Agradecimientos**

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero durante el tiempo de duración de la maestría, sin esta beca (No. CVU: 1148177) no hubiera sido posible la realización de la tesis.*

*A mi genial director de tesis el Dr. Fanis Missirlis y a mis estimados asesores, la Dra. Liora Shoshani y el Dr. Olivier C. Barbier por todo el apoyo y el conocimiento que me brindaron durante este tiempo. Les agradezco también por ser excelentes investigadores, profesores y seres humanos.*

*Le agradezco a la Dra. Beatriz Osorio Carranza por su buena disposición siempre a ayudar en todo lo necesario, por su trato amable y la valiosa ayuda brindada durante los experimentos.*

*A la Mtr. Ana Karen Pantaleón por todo el apoyo que me brindó para que esta tesis fuera posible.*

*A todos los profesores del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias y de otros departamentos del CINVESTAV que formaron parte del programa académico, por darme la oportunidad de ingresar en este posgrado y por todas sus enseñanzas con las cuales contribuyeron a mi formación.*

*Al coordinador académico, el Dr. Gerardo Contreras, por su amabilidad, por su comprensión y por su buena disposición siempre a escucharnos y a ayudarnos en todo lo necesario.*

*Finalmente, a todos mis compañeros del curso y del laboratorio, por su amabilidad, por su apoyo y por ser partes de esta etapa de mi vida.*

## INDICE

I.	Resumen .....	1
II.	Abstract.....	2
III.	Introducción.....	3
	Problema .....	7
IV.	Hipótesis.....	7
V.	Objetivos.....	7
VI.	Materiales y métodos .....	12
VII.	Resultados.....	15
	Efecto de la quinurenina en el nivel de zinc (Zn) en diferentes tejidos .....	15
	Efecto de la quinurenina en el nivel de hierro (Fe) en diferentes tejidos .....	16
	Efecto de la quinurenina en el nivel de potasio (K) en diferentes tejidos .....	17
	Efecto de la quinurenina en el nivel de magnesio (Mg) en diferentes tejidos .....	18
	Efecto de la quinurenina en el nivel de cobre (Cu) en diferentes tejidos.....	20
	Efecto de la quinurenina en el nivel de calcio (Ca) en diferentes tejidos.....	21
	Efecto de la quinurenina en la filtración renal.....	22
VIII.	Discusión .....	22
	Efecto de la quinurenina sobre los niveles de zinc en el organismo .....	22
	Efecto de la quinurenina sobre los otros metales evaluados .....	24
	Efecto de la quinurenina en la filtración renal.....	26
IX.	Conclusiones .....	26
X.	Perspectivas.....	27
XI.	Bibliografía citada .....	28

## I. Resumen

El zinc es el segundo ion metálico de transición más abundante en los seres vivos después del hierro. Se estima que el 10% de las proteínas codificadas por el genoma humano requieren la unión a uno o más iones de zinc para su plegamiento adecuado y/o para su función. A pesar de la reconocida importancia del zinc en la fisiología, se desconoce la regulación sistémica de dicho metal. Recientemente se reportó que la vía de la quinurenina, una vía de degradación del triptófano participa en la regulación sistémica del zinc en *Drosophila melanogaster*. Por tal razón, nos preguntamos en este trabajo, si la observación anterior en el caso de la mosca es válida en un modelo animal de mamíferos. El objetivo principal de este estudio fue determinar si un aumento de la quinurenina plasmática regula los niveles de zinc en el ratón. Para ello inyectamos ratones macho C57BL/6 con quinurenina o PBS por vía subcutánea, según el grupo experimental. Posteriormente, se sacrificaron y se obtuvo de ellos el plasma, los eritrocitos, el hígado, el páncreas, los riñones, el músculo gastrocnemio, el fémur y tejido adiposo blanco; a los cuales se les determinó la concentración de zinc y otros metales mediante Espectrometría de Emisión Óptica con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente. Observamos que la administración de quinurenina provocó una disminución del zinc circulante y favoreció su almacenamiento en el fémur y el hígado. Sin embargo, el efecto no parece ser exclusivo, debido a que, un efecto similar se observó en magnesio y hierro.

## II. Abstract

Zinc is the second most abundant transition metal ion in living organisms after iron. It is estimated that 10% of the proteins encoded by the human genome require binding to one or more zinc ions for proper folding and/or function. Despite the recognized importance of zinc in physiology, the systemic regulation of this metal is unknown. It was recently reported that the kynurenine pathway, a tryptophan degradation pathway, participates in the systemic regulation of zinc in *Drosophila melanogaster*. For this reason, in this work, we ask ourselves if the previous observation in the case of the fly is valid in an animal model of mammals. The main objective of this study was to determine if an increase in plasma kynurenine regulates zinc levels in the mouse. To do this, we injected male C57BL/6 mice with kynurenine or PBS subcutaneously, depending on the experimental group. Subsequently, plasma, erythrocytes, liver, pancreas, kidneys, gastrocnemius muscle, femur, and white adipose tissue were obtained at different time points and the concentration of zinc and other metals was determined by Optical Emission Spectrometry with an Inductively Coupled Plasma source. We observed that the administration of kynurenine caused a decrease in circulating zinc and favored its storage in the femur and liver. However, the effect does not appear to be exclusive, as a similar effect was observed for magnesium and iron.

## Introducción

Los iones metálicos y sus complejos biomoleculares son esenciales para la vida ya que participan en la mayoría de las funciones metabólicas y fisiológicas de los organismos (Bertini *et al.*, 1994; Da Silva & Williams, 2001). El zinc (Zn) es el segundo ion metálico de transición más abundante en los seres vivos después del hierro (Andreini *et al.*, 2006). El cuerpo humano contiene de 1,5 a 2,5 g de Zn los cuales se distribuyen entre miles de proteínas y le confiere a este metal una amplia diversidad de funciones bioquímicas y fisiológicas (Sloup *et al.*, 2017). Se estima que el 10% de las proteínas codificadas por el genoma humano requieren la unión a uno o más iones de zinc para su plegamiento adecuado y/o para activar la función catalítica en el caso de enzimas (Andreini *et al.*, 2006; Kambe *et al.*, 2015).

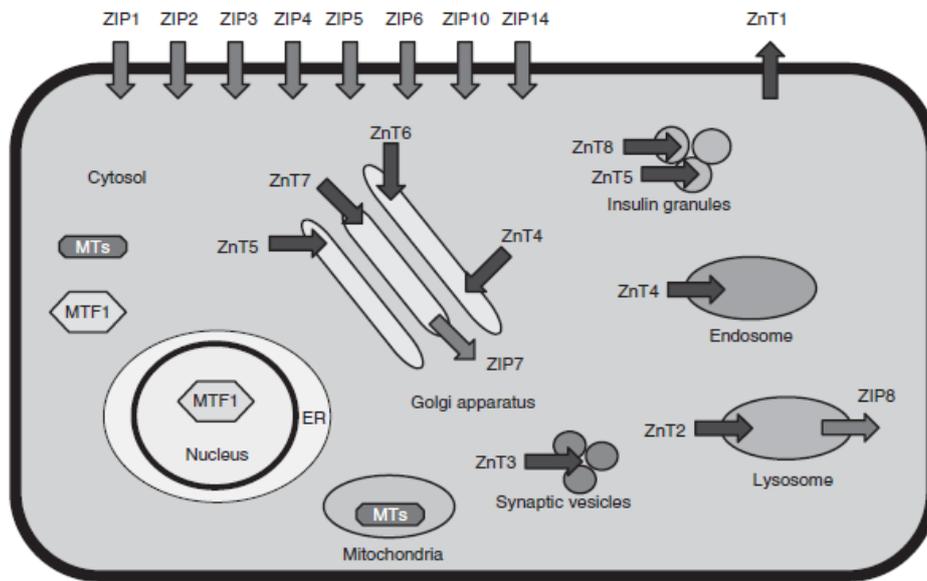
Las funciones del zinc se pueden clasificar en tres categorías principalmente: catalítica, estructural y reguladora (Tuerk & Fazel, 2009). En su función catalítica se estima que es cofactor enzimático para más de 300 enzimas (Mezzaroba *et al.*, 2019) entre las que se incluyen la anhidrasa carbónica, la carboxipeptidasa pancreática, la fosfatasa alcalina, las ARN polimerasas y la alcohol deshidrogenasa (Maret, 2013; Vallee & Falchuk, 1993). En su función estructural, el zinc se coordina con dominios de proteínas, facilitando su plegamiento y la formación de estructuras como los "dedos de zinc" las cuales se unen al ADN para la transcripción y expresión génica (Hall, 2005; Klug & Rhodes, 1987; Miller *et al.*, 1985). Los dedos de zinc se agrupan en más de 20 clases de módulos estructuralmente distintos y se conoce que son un motivo funcional que interactúa con una variedad de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Kambe *et al.*, 2015). Finalmente, los iones de zinc intracelulares cumplen una función reguladora activando o inhibiendo proteínas de señalización intracelular (Kambe *et al.*, 2015; Tuerk & Fazel, 2009). Por dar unos ejemplos, la señalización de zinc se ha relacionado con el factor de transcripción *Snail* en la migración celular y la transición epitelial-mesenquimatosa de las células de pez cebra (Hirano *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2004). También el ion metálico regula la expresión de proteínas citosólicas con sitios de unión a zinc, como la metalotioneína, esto por la unión del zinc al factor de transcripción del elemento de respuesta al metal 1 (MTF1) que activa la transcripción de la metalotioneína, así como muchos otros genes (Cousins, 1994; Dalton *et al.*, 1997; Grzywacz *et al.*, 2015). Además, la señalización de zinc intracelular se dirige a una serie de enzimas involucradas en la señalización celular, incluidas las proteínas tirosina

fosfatasas (Brautigam *et al.*, 1981; Wilson *et al.*, 2012), fosfodiesterasas (von Bülow *et al.*, 2005), caspasas (Miyai *et al.*, 2014; Velázquez-Delgado & Hardy, 2012) y varias quinasas como la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y la proteína quinasa C (PKC) (Csermely *et al.*, 1988; Hansson, 1996; Nimmanon *et al.*, 2017). Esta amplia implicación del zinc en los procesos metabólicos y fisiológicos hace que sea un elemento esencial para el correcto funcionamiento de muchos sistemas de órganos, por tanto, una pérdida de la homeostasis de este ion metálico puede traer consigo múltiples consecuencias para el organismo.

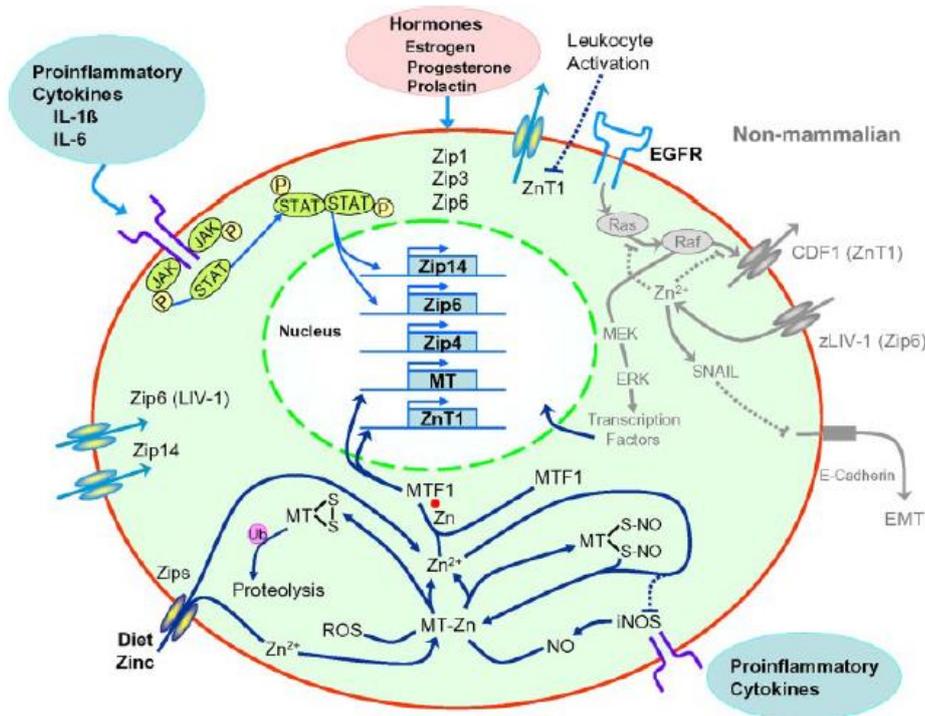
Por ejemplo, se sabe que la deficiencia de Zn afecta negativamente el crecimiento, la morfogénesis, la respuesta inmune, así como las funciones neurosensoriales y endocrinas (Baltaci *et al.*, 2019; Prasad, 2013; Tuerk & Fazel, 2009). Entre las manifestaciones clínicas por deficiencia de zinc se encuentran la alopecia, la pérdida de peso, diarreas, hipogonadismo, infecciones recurrentes, retraso en la cicatrización y enfermedades como la acrodermatitis enteropática (Prasad, 2013). En 2012 se estimó que aproximadamente al 17 % de la población mundial tiene un consumo inadecuado de zinc (Wessells & Brown, 2012), Recientemente se estimó en algunos países de bajos y medios ingresos, como México, la prevalencia de deficiencia de zinc es mayor al 20 % (Gupta *et al.*, 2020). Por otro lado un ingesta excesiva de zinc produce náuseas, mareos, dolores de cabeza, vómitos y dolor epigástrico entre otros síntomas (Fosmire, 1990). Por tanto, mantener la homeostasis del zinc en el organismo es muy importante para la salud.

La concentración intracelular de Zn está estrictamente regulada por los transportadores de zinc (Cousins *et al.*, 2006) y por proteínas de unión a Zn como las metalotioneínas (Vallee, 1995) (Fig.1). Existen dos familias de transportadores de zinc que se conservan filogenéticamente. La primera es la familia de transportadores ZnT/ SLC30 (*solute-linked carrier 30*), que actúan para disminuir los niveles de zinc intracelular al transportar zinc desde el citoplasma hasta la luz de los orgánulos o el espacio extracelular (Palmiter & Huang, 2004). La segunda es la familia ZIP (*Zrt-, Irt-like protein*), que lleva el nombre de la proteína Zrt1 de levadura y la proteína Irt1 de *Arabidopsis*. La firma de la familia ZIP es que, sin excepciones conocidas hasta el momento, estas proteínas transportan zinc y/u otros sustratos de iones metálicos desde el espacio extracelular o la luz del orgánulo hacia el citoplasma (Eide, 2004). Además, la expresión génica de estas proteínas está regulada por moléculas sensibles a Zn, como el factor de transcripción 1 de unión a elementos de

respuesta a metales (MTF-1, por sus siglas en inglés), que funciona como un sensor de zinc celular que coordina la expresión de genes implicados en la homeostasis del zinc, así como la protección contra la toxicidad de los metales y el estrés oxidativo (Andrews, 2001). Estas moléculas controladoras de Zn y controladas por Zn tienen mecanismos, funciones y ubicaciones celulares únicos (Cousins *et al.*, 2006; Eide, 2006) (Fig. 2).



**Figura 1: Localización celular de los transportadores de zinc y metalotioneínas.** Las flechas indican la dirección prevista de la movilización de Zn. MT, metalotioneína; RE, retículo endoplásmico; MTF-1, factor de transcripción de unión a elementos sensible a metales-1. Tomado de Hirano *et al.*, *Adv. Immunol.*, 2008.



**Figura 2:** Vías de señalización que regulan algunos genes ZnT y Zip e influyen en el tráfico intracelular de  $Zn^{2+}$ . Nota: estos eventos son específicos de la célula, pero los mecanismos no se conocen bien. No se muestran los cambios dependientes de zinc en la localización del transportador. Los cambios en el suministro de zinc en la dieta influyen en ZnT1, ZnT2, Zip4 y expresión Mt. MTF1 controla Mt y ZnT1. El estrés nitrosativo inducido (iNOS) por citoquinas proinflamatorias aumenta el NO y estimula la liberación de  $Zn^{2+}$  de MT, lo que activa MTF1. Los eventos que inducen iNOS y aumentan el NO conducen a la tionitrosación de MT, que puede revertirse con  $Zn^{2+}$  adicional. Por el contrario, la oxidación irreversible de MT por especies reactivas de oxígeno (ROS) conduce a la degradación, probablemente a través de la ubiquitinación. Las citoquinas proinflamatorias, incluidas IL1 $\beta$  e IL6, estimulan la señalización mediada por STAT, la regulación positiva de Zip14 y Zip6 y la entrada de zinc celular. La prolactina, el estrógeno y la testosterona regulan la expresión celular específica de algunos genes transportadores Zip. Modelos no mamíferos han demostrado la regulación mediada por  $Zn^{2+}$  de las principales vías de señalización por homólogos de ZnT1 de mamíferos, y Zip6 influye en componentes importantes necesarios para el desarrollo y la cicatrización de heridas (mostrado en gris). EMT puede ser un factor controlado en parte por  $Zn^{2+}$  a través de la regulación del transportador. Las líneas sólidas indican modos de acción positivos y las líneas discontinuas indican un proceso inhibitorio. EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico. Tomado de Cousins *et al.*, JBC, 2006.

A nivel sistémico se conoce que el zinc de la dieta se absorbe en el intestino delgado y luego se distribuye a los tejidos periféricos (Kambe *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 1991). Aproximadamente el 60 % del zinc se almacena en el músculo esquelético, el 30 % en los huesos, el 5 % en el hígado y la piel, y el 2–3 % restante en otros tejidos como el cerebro, el riñón y el páncreas (Jackson, 1989; Kambe *et al.*, 2015). Cuando el zinc en la dieta es limitado, la absorción de zinc en el intestino delgado aumenta hasta un 90 % (Taylor *et al.*,

1991). Cuando se ingiere demasiado zinc en la dieta, el exceso de este metal puede secretarse al tracto gastrointestinal y excretarse en las heces fecales y también se elimina en la excreción renal (Brugger & Windisch, 2019; King *et al.*, 2000). Una proporción importante del Zn endógeno que se excreta en el tracto gastrointestinal es de origen pancreático (Oberleas, 1996). Esto destaca el papel esencial del páncreas en el metabolismo del Zn.

Para contrarrestar los efectos negativos de una dieta deficiente en zinc el cuerpo debe tener reservas de este metal en algún órgano. En un estudio con ratas hembra adultas marcadas homogéneamente con <sup>65</sup> Zn y posteriormente alimentadas con una dieta baja en zinc se observó que los depósitos de Zn se localizan principalmente en el esqueleto, en el tejido muscular y en el graso (Wilhelm Windisch, 2003). El esqueleto, sin embargo, demostró ser el principal almacenamiento de Zn debido a su contribución dominante al Zn movilizable de todo el cuerpo y su flexibilidad para servir como almacenamiento de Zn tanto a corto como a largo plazo (Wilhelm Windisch, 2003). En otro estudio concluyeron que la movilización transitoria y la restauración del Zn esquelético (fémur) ocurre principalmente en el hueso trabecular (diáfisis y epífisis) y no implica cambios importantes en la masa ósea, el contenido de macrominerales o el recambio de tejido óseo en ratas adultas jóvenes (W. Windisch *et al.*, 2002). Sin embargo, los mediadores humorales, que indican el estado del zinc en una célula o tejido a otros órganos que importan y almacenan zinc, no se han identificado en el metabolismo del zinc. Esto contrasta con el metabolismo del hierro, donde una hormona peptídica, la hepcidina, desempeña un papel fundamental en la homeostasis sistémica del hierro (Nemeth *et al.*, 2004).

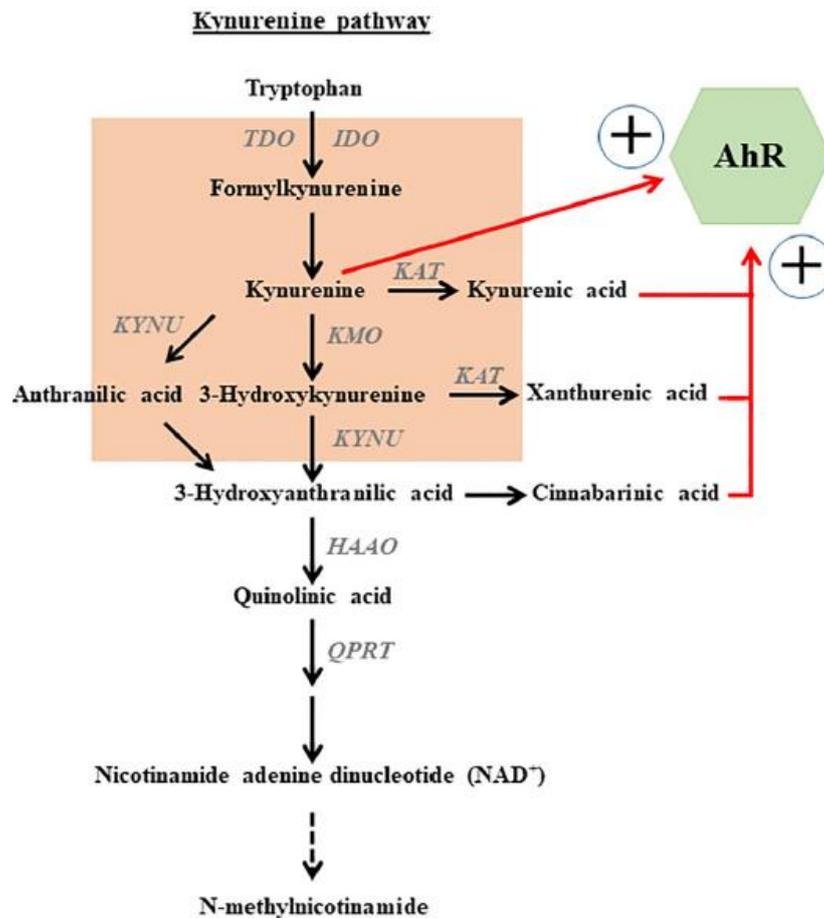
En 1980, Gary Evans trabajando en el laboratorio de nutrición humana del Departamento de Agricultura del Gobierno de Estados Unidos estableció que la presencia de triptófano en la dieta de roedores o humanos incrementa drásticamente la absorción de zinc (Evans, 1980). Sin embargo y a pesar del efecto dramático que documentó, no logró explicar la conexión fisiológica entre el aminoácido y el ion metálico. Recientemente se descubrió que la vía de la quinurenina, una vía de degradación del triptófano, participa en la regulación sistémica del zinc en *Drosophila melanogaster* (Garay *et al.*, 2022). Específicamente, observaron que la quinurenina que se libera de los cuerpos grasos de este insecto, induce la formación de gránulos de almacenamiento de zinc en los túbulos de *Malpighi* (órgano equivalente al riñón en mamíferos). Utilizando técnicas de absorción de rayos X de alta energía y de resonancia magnética nuclear entre otras, demostraron que el zinc se almacena en un complejo con la

3-hidroxiquinurenina y en menor medida con ácido xanturénico en depósitos intracelulares (Garay *et al.*, 2022).

La quinurenina ( *kynurenine*: KYN, por sus siglas del inglés) es un metabolito del triptófano y un precursor directo del ácido quinurénico, el ácido antranílico y la 3-hidroxiquinurenina, así como de otros metabolitos formados a lo largo de la vía de la quinurenina (Fig.3) (Marszalek-Grabska *et al.*, 2021). Esta vía se conserva en mamíferos y es responsable de más del 95 % de toda la degradación del triptófano en los mamíferos (Leklem, 1971). La principal fuente endógena de KYN es su producción en el hígado por la enzima triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO). La quinurenina también es sintetizada por las enzimas indolamina 2,3-dioxigenasas 1 (IDO-1) e indolamina 2,3-dioxigenasas 2 (IDO-2) que se producen en muchos tejidos en respuesta a la activación inmunitaria (Marszalek-Grabska *et al.*, 2021; Opitz *et al.*, 2011). Todas estas enzimas tienen al triptófano como sustrato para la síntesis de quinurenina, pero difieren en cuanto a tamaño, forma, distribución tisular, expresión y otros sustratos (Boros *et al.*, 2018).

La IDO-1 humana es una enzima extrahepática ubicada en el citosol, que se expresa predominantemente en el cerebro, los pulmones, los riñones, el bazo, el sistema intestinal, los ganglios linfáticos o la placenta (Takikawa, 2005; Yamazaki *et al.*, 1985). A diferencia de TDO, IDO1 es inducida en varios estados patológicos por citocinas proinflamatorias, como interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-13 y lipopolisacáridos (LPS) (Mándi & Vécsei, 2012). Por otro lado, la IDO-2 se expresa principalmente en el cerebro, el hígado, los riñones, el epidídimo y las células inmunitarias presentadoras de antígenos (Fukunaga *et al.*, 2012). Su expresión es estimulada por IFN- $\gamma$ , aunque de manera menos eficiente que la IDO-1 (Barreto *et al.*, 2018).

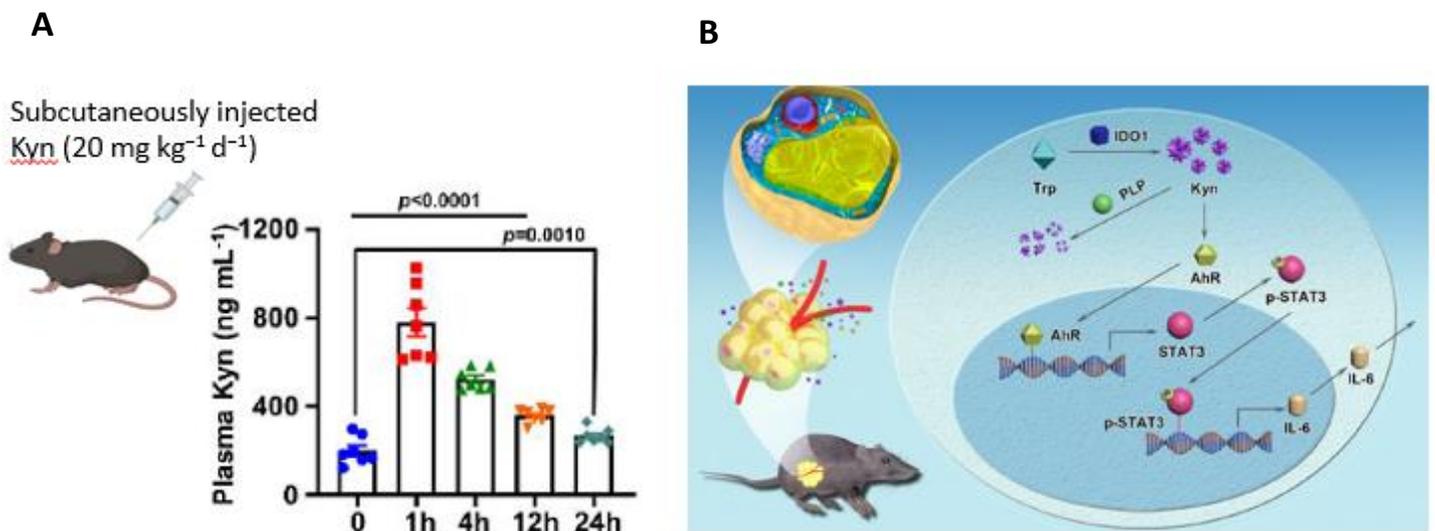
La quinurenina es un ligando endógeno del receptor de hidrocarburos de arilo ( AhR : *Aryl hydrocarbon receptor* ) (Huang *et al.*, 2022; Opitz *et al.*, 2011), este receptor se expresa de forma ubicua en tejidos humanos (Yamamoto *et al.*, 2004). AhR está involucrado en múltiples funciones fisiológicas, incluido el desarrollo de células madre embrionarias tempranas (Ko *et al.*, 2016), la regeneración de tejidos adultos (Gialitakis *et al.*, 2017), defensa química (Nebert *et al.*, 2004), y microbiana (Lawrence & Vorderstrasse, 2013), inmunidad e inflamación (Esser & Rannug, 2015; Gasiewicz *et al.*, 2014; Rothhammer & Quintana, 2019; Stockinger *et al.*, 2014), reproducción (Baba *et al.*, 2005) y metabolismo energético (Diani-Moore *et al.*, 2017).



**Figura 3: Vía de la quinurenina.** Receptor de hidrocarburo de arilo (AhR); triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO); indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO); 3 hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa (HAAO); quinurenina aminotransferasa (KAT); quinurenina 3-monooxigenasa (KMO); kynureninasa (KYNU); ácido quinolínico fosforribosiltransferasa (QPRT). Tomado de Marszalek-Grabska *et al.*, Pharmacology & Therapeutics, 2021.

Por otro lado, su activación juega un papel importante en varios procesos patológicos, incluyendo la inflamación y la carcinogénesis (Murray *et al.*, 2014). Por lo tanto, la quinurenina al actuar sobre AhR puede afectar numerosas condiciones fisiológicas y patológicas. De hecho, se observa un aumento de KYN en algunas patologías como la tuberculosis, obesidad, diabetes tipo 2, en la enfermedad de Crohn, en la enfermedad renal crónica y en el covid-19 (Marszalek-Grabska *et al.*, 2021). En el plasma de pacientes de lupus eritematoso sistémico la quinurenina también se encuentra incrementada (Åkesson *et al.*, 2018). Curiosamente, en otros estudios se ha observado una disminución en el zinc plasmático de pacientes con algunas de estas enfermedades como es el caso del covid-19 (Ekemen Keleş *et al.*, 2022; Verschelden *et al.*, 2021; Vogel-González *et al.*, 2021) y el lupus eritematoso sistémico (Wang *et al.*, 2022).

En un estudio reciente que investigó el papel de la quinurenina en la obesidad, se inyectaron ratones con quinurenina y se observó que la quinurenina se mantiene incrementada hasta 24 horas después de la inyección (Fig. 4A). Además, este estudio identificó que los adipocitos maduros del tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés) son fundamentales para el metabolismo de quinurenina y actúan como la fuente principal del aumento de quinurenina circulante en sujetos con obesidad; y que un exceso de quinurenina favorece a la inflamación y a la resistencia de insulina a través de la vía de señalización de AhR/Stat3/IL-6 en los adipocitos (Fig. 4B). Nosotros pensamos que este metabolito también pudiera estar involucrado con la regulación de los niveles de zinc en mamíferos.



**Figura 4:** (A) La quinurenina permanece aumentada en el plasma de ratones hasta 24 horas después de la inyección de esta. (B) Esquema de la señalización de la quinurenina derivada de adipocitos que promueve la obesidad y la resistencia a la insulina. La sobrealimentación induce la sobreexpresión de IDO1 en los adipocitos, que luego producen una gran cantidad de Kyn, lo que exacerba la resistencia a la insulina y la obesidad a través del eje AhR/STAT3/IL-6, mientras que el 5'-fosfato de piridoxal (PLP) cataliza el catabolismo de Kyn para prevenir de manera eficiente la resistencia a la insulina y la obesidad. Tomado de Teng Huang *et al.*, *Nature Communications*, 2022.

## **Problema**

A pesar de la reconocida importancia del zinc en la fisiología, se desconoce cómo el organismo detecta la disponibilidad sistémica del zinc para regular su absorción, su almacenamiento y su excreción. En otras palabras, se desconoce la regulación sistémica de dicho metal.

### **III. Hipótesis**

Un aumento de la quinurenina plasmática provoca una disminución del zinc en la circulación sanguínea y favorece su almacenamiento en los tejidos del ratón.

### **IV. Objetivos**

- Determinar si la inyección de quinurenina regula los niveles de **Zn** en el plasma y en varios órganos del ratón.
- Cuantificar los niveles de otros metales (Fe, Cu, Mg, Na, Ca, K, y P) en el plasma y en varios órganos del ratón después de la inyección de quinurenina.
- Evaluar si la inyección de quinurenina afecta la función renal.

## V. Materiales y métodos

### Animales y condiciones experimentales

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6 de 8 semanas de edad que se alojaron en jaulas de acrílico con acceso al agua y comida *ad libitum*. Estos animales fueron mantenidos en condiciones de temperatura y humedad controladas (23 °C, 50 % respectivamente) y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

### Grupos experimentales

Los animales que conforman cada grupo son animales sanos, obtenidos en el bioterio del CINVESTAV. Los cuales se pesaron el día del experimento para la determinación del volumen de inyección que se les debía administrar de la solución de quinurenina.

Según el grupo, se les administró 100 µL de tampón fosfato salino (por sus siglas en inglés, PBS, de *phosphate buffered saline*) o quinurenina (20 mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, vehículo PBS) por vía subcutánea. Utilizamos un PBS comercial de la marca Sigma y la L-quinurenina (K-826) de Sigma. La solución se preparó el mismo día del experimento y posteriormente se esterilizó por filtración.

- C (*naive*): grupo control experimental que no recibió ninguna inyección (n = 6).
- C-1h: grupo experimental que se inyectó con PBS y se sacrificó 1 hora después de la inyección (n = 4).
- C-4h: grupo experimental que se inyectó con PBS y se sacrificó 4 horas después de la inyección (n = 4).
- C-24h: grupo experimental que se inyectó con PBS y se sacrificó 24 horas después de la inyección (n = 4).
- K-1h: grupo experimental que se inyectó con quinurenina y se sacrificó 1 hora después de la inyección (n = 6).
- K-4h: grupo experimental que se inyectó con quinurenina y se sacrificó 4 horas después de la inyección (n = 6).
- K-24h: grupo experimental que se inyectó con quinurenina y se sacrificó 24 horas después de la inyección (n = 6).

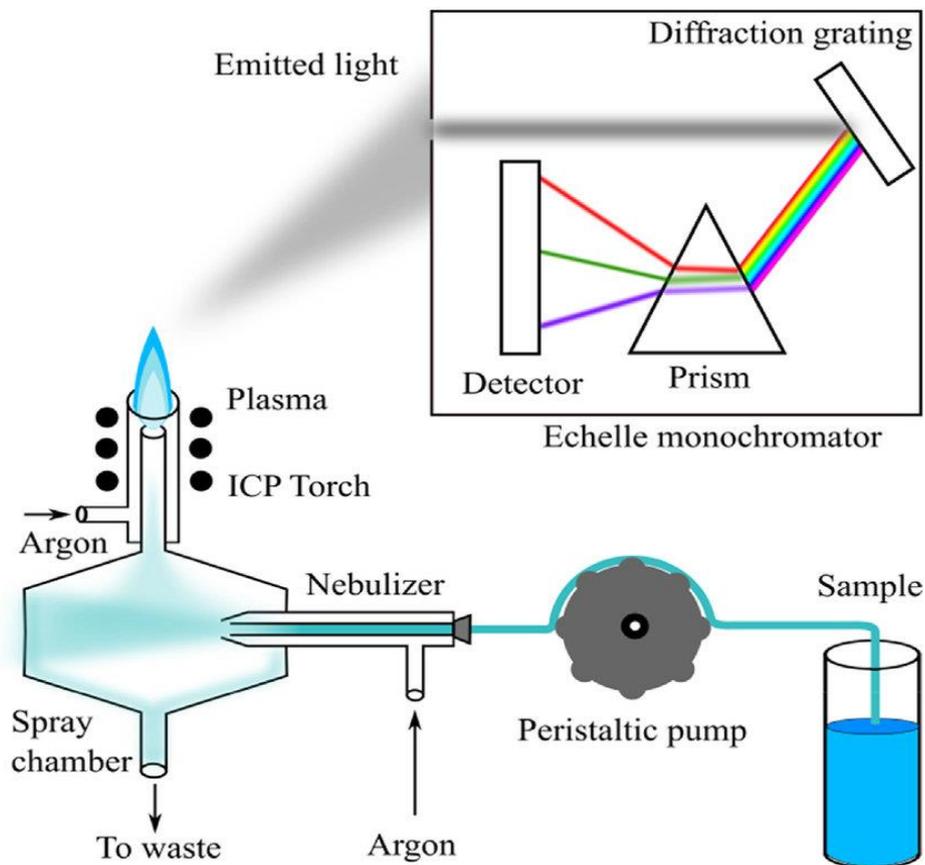
## Cuantificación de los niveles de metales

Los animales de cada grupo experimental después de su respectivo tratamiento fueron anestesiados con isoflurano (nivel de oxígeno = 2 unidades, nivel de isoflurano para inducción = 3 unidades y 1.5 unidades para mantenimiento) y sacrificados por punción cardiaca. A cada animal se les extrajo diferentes tejidos/órganos (sangre, hígado, páncreas, riñón, fémur, músculo gastrocnemio, grasa). La sangre se centrifugó (2000 gs, 4°C, 15 min) y se tomó el plasma y los eritrocitos por separado.

Los eritrocitos, el hígado, páncreas, riñón, fémur, músculo gastrocnemio y el tejido adiposo blanco se liofilizaron por 48 horas. Una vez secos, de cada tejido de cada animal se tomaron tres muestras, las cuales se pesaron y se clasificaron para su posterior digestión. Para la digestión a cada muestra se le añadió 1 mL de ácido nítrico Fluka Trace al 65% y se realizó en el sistema de digestión de microondas MARS 6 CEMa 200 °C por 15 minutos. Las muestras digeridas se aforaron a 5 mL con agua miliQ.

En el caso del plasma para cada animal de cada grupo se tomaron tres alícuotas y se les adicionó 200 µL de ácido nítrico Fluka Trace al 65%. La digestión se realizó en un horno a 66 °C durante 24 horas. A las muestras digeridas se les adicionó 800 µL de agua miliQ.

Aunque el metal de interés principal es el zinc, se analizaron otros elementos para en caso de encontrar algún un efecto en zinc poder saber si es específico o no. Es decir, son controles. Por tanto, a cada muestra se le determinó la concentración de los metales alcalinos y alcalinotérreos (K, Ca y Mg) y de los metales de transición (Fe, Cu y Zn) por espectroscopía de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES por sus siglas del inglés) con el equipo *Optima 8300 (PerkinElmer)*. Cada muestra obtenida se cuantificó por triplicado y se obtuvo el promedio y la desviación estándar.



**Figura 5:** El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que junto a un espectrofotómetro de emisión óptica (OES) constituye el equipo de ICP-OES. En esta técnica, la introducción continua de la muestra líquida y un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el argón a la antorcha del plasma. En el plasma, debido las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados e ionizados generándose los espectros de emisión atómicos. Los espectros son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz se encarga de medir las intensidades de las líneas. La información es procesada por el sistema informático.

### Análisis estadístico

Para comparar los niveles de metales de cada tejido entre los diferentes grupos de animales se comprobó la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk. Para los datos que cumplieron con una distribución normal se les realizó un ANOVA de una vía y como prueba a posteriori, la prueba de Tukey. Para los datos que no cumplieron con una distribución normal se les realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y como prueba a posteriori, la prueba de Dunn. Para graficar y para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software GraphPad Prism 8.0.2. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ .

## **Determinación de niveles plasmáticos de creatinina**

La cuantificación de los niveles plasmáticos de creatinina se realizó por el método de Jaffé (Hervey, 1953) y se utilizó el kit de Randox Laboratories. Se empleó 50 µL del estándar de referencia del kit de Randox y se le agregó 500 µL de la solución de trabajo (250 µL de la solución A + 250 µL de la solución B), se agitó por 15 segundos y se tomó lectura en el equipo Microlab 300; este procedimiento se realizó de la misma manera con las muestras de plasma. Cada muestra se trabajó por duplicado. Los controles de calidad utilizados fueron: la precisión con una variación de  $\pm 0.005$  y el uso del control de Randox.

Para comparar los niveles plasmáticos de creatinina entre los diferentes grupos de animales se realizó un ANOVA de una vía y como prueba a posteriori, la prueba de Tukey. Para graficar y para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software GraphPad Prism 8.0.2. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ .

## **VI. Resultados**

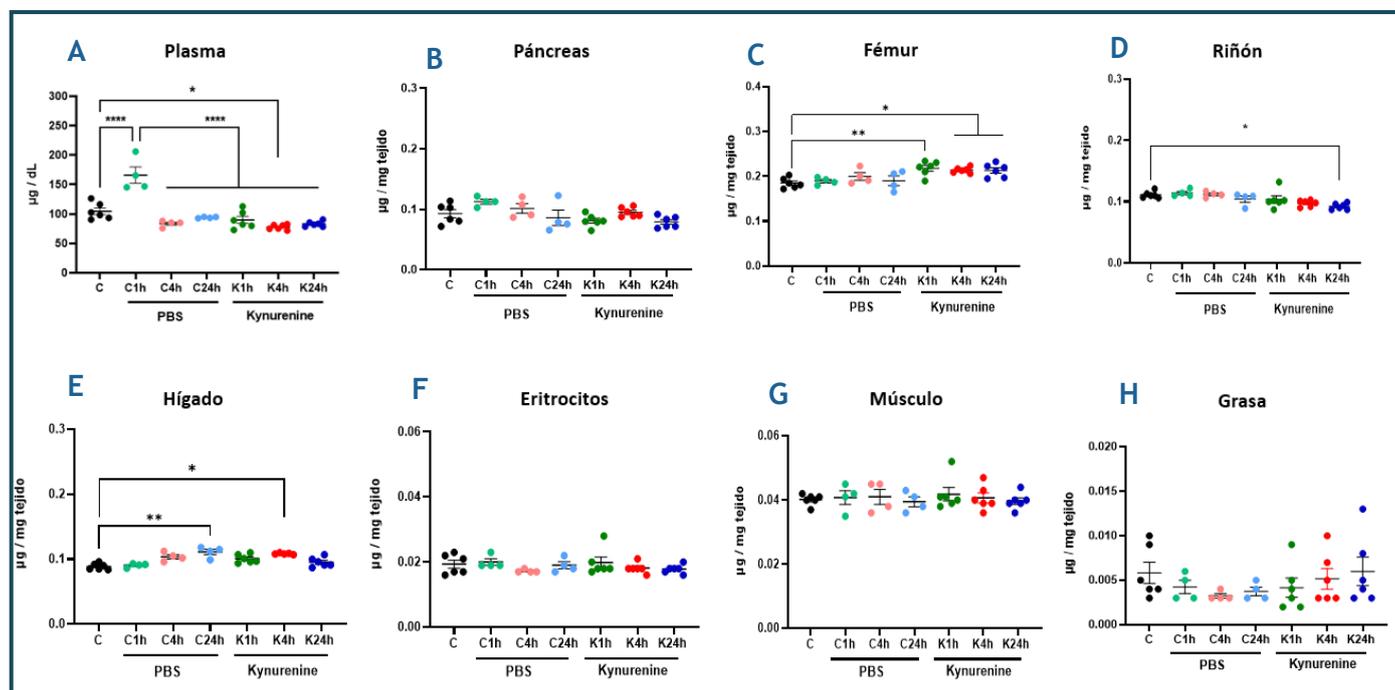
### **Efecto de la quinurenina en el nivel de zinc (Zn) en diferentes tejidos**

En la figura 6A podemos observar que la inyección de quinurenina provocó una disminución de la concentración plasmática de Zn a las 4 horas, de manera estadísticamente significativa. Por otro lado, una hora después de la inyección de PBS se observa un aumento considerable de los niveles de Zn, este aumento fue mucho mayor que el provocado a las 4 horas por la inyección de quinurenina.

La inyección de quinurenina no afectó la concentración de zinc de manera significativa en el páncreas (fig. 6B), los eritrocitos (fig. 6F), el músculo (fig. 6G) y la grasa (fig. 6H) en ninguno de los tiempos evaluados. En el caso del fémur (fig. 6C) podemos observar que la inyección de quinurenina a la una hora provocó un aumento significativo en la concentración de zinc en este hueso, que se mantuvo 24 horas después de dicha inyección. Por otro lado, en el riñón (fig. 6D) se aprecia que a las 24 horas la inyección de quinurenina provoca una disminución en los niveles de este metal, en este órgano. En el caso del hígado (fig. 6E) tenemos que la quinurenina provocó un aumento a las 4 horas en la concentración de Zn, en este grupo tenemos un animal que respondió mucho más fuerte que los otros a la inyección de quinurenina, siendo un *outlier* dentro de su grupo, por tanto, lo sacamos del

análisis estadístico. En este órgano también se observa un aumento de la concentración de Zn, 24 horas después de la inyección de PBS.

## Zn



**Figura 6:** Concentración de Zn en los diferentes tejidos analizados.

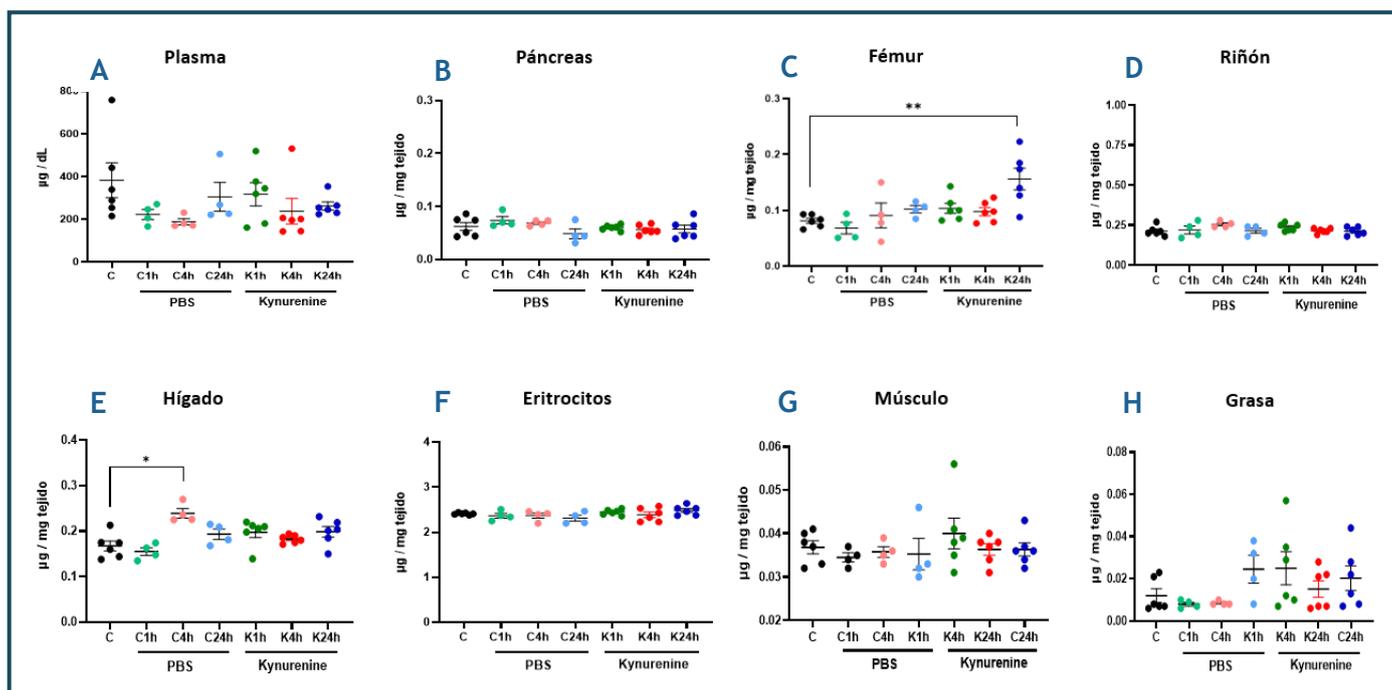
**C:** grupo control sin inyección; **C1h, C4h y C24h:** grupos inyectados con PBS y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente; **K1h, K4h, K24h:** grupos inyectados con quinurenina y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente.

### Efecto de la quinurenina en el nivel de hierro (Fe) en diferentes tejidos

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos que recibieron alguna inyección en los tiempos evaluados en el caso del plasma (fig. 7A), el páncreas (fig. 7B), el riñón (fig. 7D), los eritrocitos (fig. 7F), el músculo (fig. 7G), y la grasa (fig. 7H); por tanto, la quinurenina no afecta la concentración de este metal en estos tejidos. En el caso del plasma, hay una alta variabilidad en las concentraciones de Fe, esto puede ser debido a que los plasmas presentaban diferentes niveles de hemólisis, coincidiendo los valores más altos con los plasmas que tenían la coloración más roja. En el caso del fémur (fig. 7C) el grupo inyectado con quinurenina y evaluado a las 24 horas presenta un aumento estadísticamente significativo con respecto al grupo control no inyectado. Por otro lado, en el hígado (fig. 7E) se observa un aumento en la concentración

del hierro a las 4 horas después de la inyección con PBS que fue estadísticamente significativo.

## Fe



**Figura 7:** Concentración de Fe en los diferentes tejidos analizados.

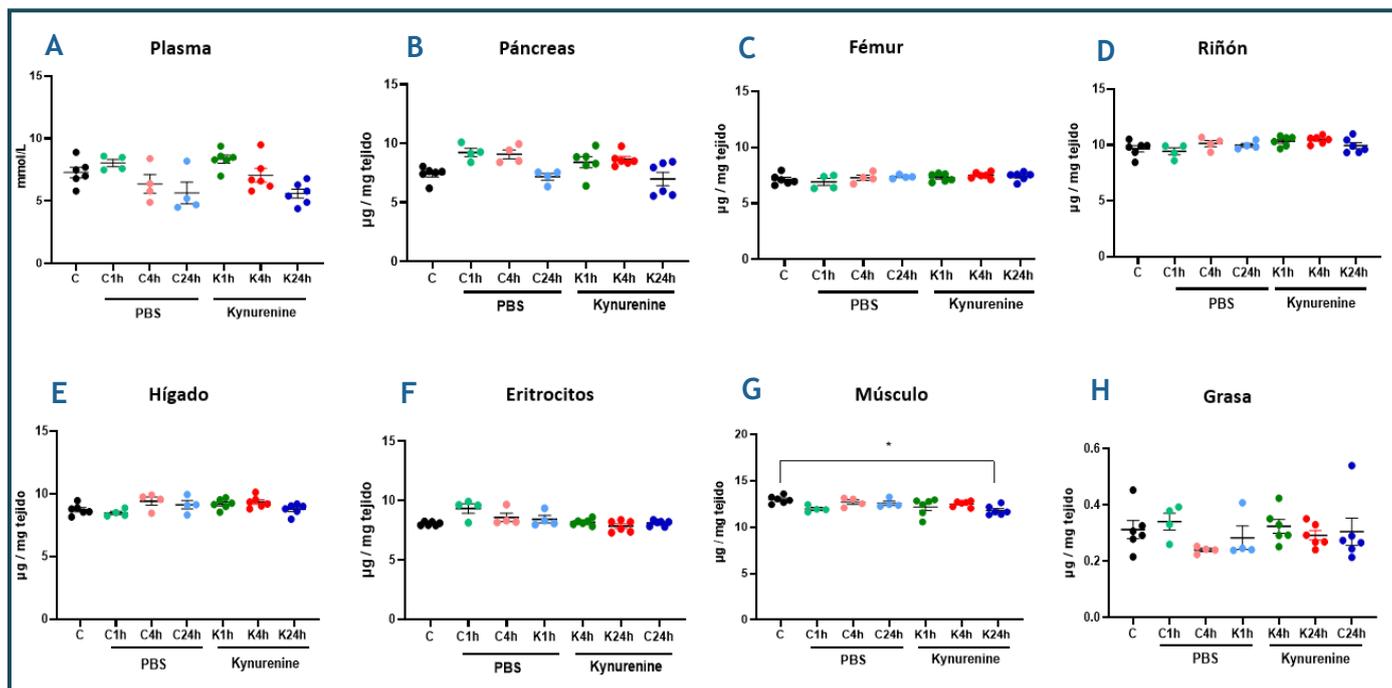
**C:** grupo control sin inyección; **C1h, C4h y C24h:** grupos inyectados con PBS y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente; **K1h, K4h, K24h:** grupos inyectados con quinurenina y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente.

### Efecto de la quinurenina en el nivel de potasio (K) en diferentes tejidos

En el caso del plasma (fig. 8A) podemos observar que los grupos inyectados con PBS y quinurenina, y evaluados a las 4 y 24 horas después de la inyección, presentan una disminución en la concentración del K que no fue estadísticamente significativa.

Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos que recibieron alguna inyección en ninguno de los tiempos evaluados en el caso del páncreas (fig. 8B), el fémur (fig. 8C), el riñón (fig. 8D), el hígado (fig. 8E), los eritrocitos (fig. 8F), y la grasa (fig. 8H). Sin embargo, en el caso del músculo (fig. 8G), 24 horas después de la inyección de quinurenina hay una disminución en la concentración de este metal con respecto al grupo control que, aunque es pequeña, llega a ser estadísticamente significativa.

## K



**Figura 8:** Concentración de K en los diferentes tejidos analizados.

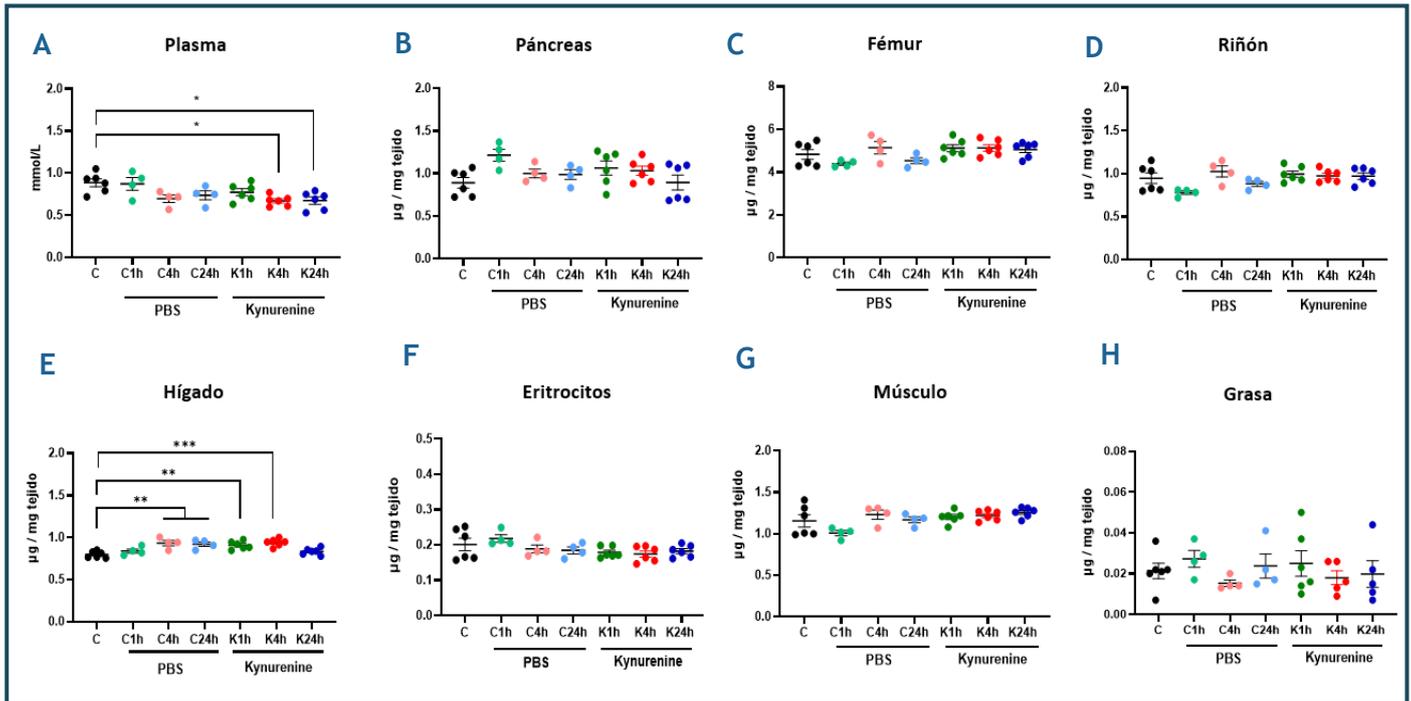
**C:** grupo control sin inyección; **C1h, C4h y C24h:** grupos inyectados con PBS y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente; **K1h, K4h, K24h:** grupos inyectados con quinurenina y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente.

### Efecto de la quinurenina en el nivel de magnesio (Mg) en diferentes tejidos

La inyección de quinurenina provocó una disminución en la concentración plasmática de Mg, a las 4 y 24 horas, de manera significativa.

Por otro lado, en el páncreas (9B), el fémur (fig. 9C), el riñón (fig. 9D), los eritrocitos (fig. 9F), el músculo (fig. 9G) y la grasa (fig. 9H), la inyección de quinurenina no provocó un cambio significativo en la concentración de este metal con respecto al grupo control que no se inyectó. Sin embargo, en el hígado (fig. 9E) los grupos inyectados con quinurenina presentan un aumento significativo en la concentración de Mg a las 1 y 4 horas después de la inyección pero este efecto no se mantuvo hasta las 24 horas. Curiosamente la inyección de sólo el vehículo, PBS, provocó un aumento significativo en la concentración de Mg a las 4 y 24 horas después de la inyección (fig. 9E).

## Mg



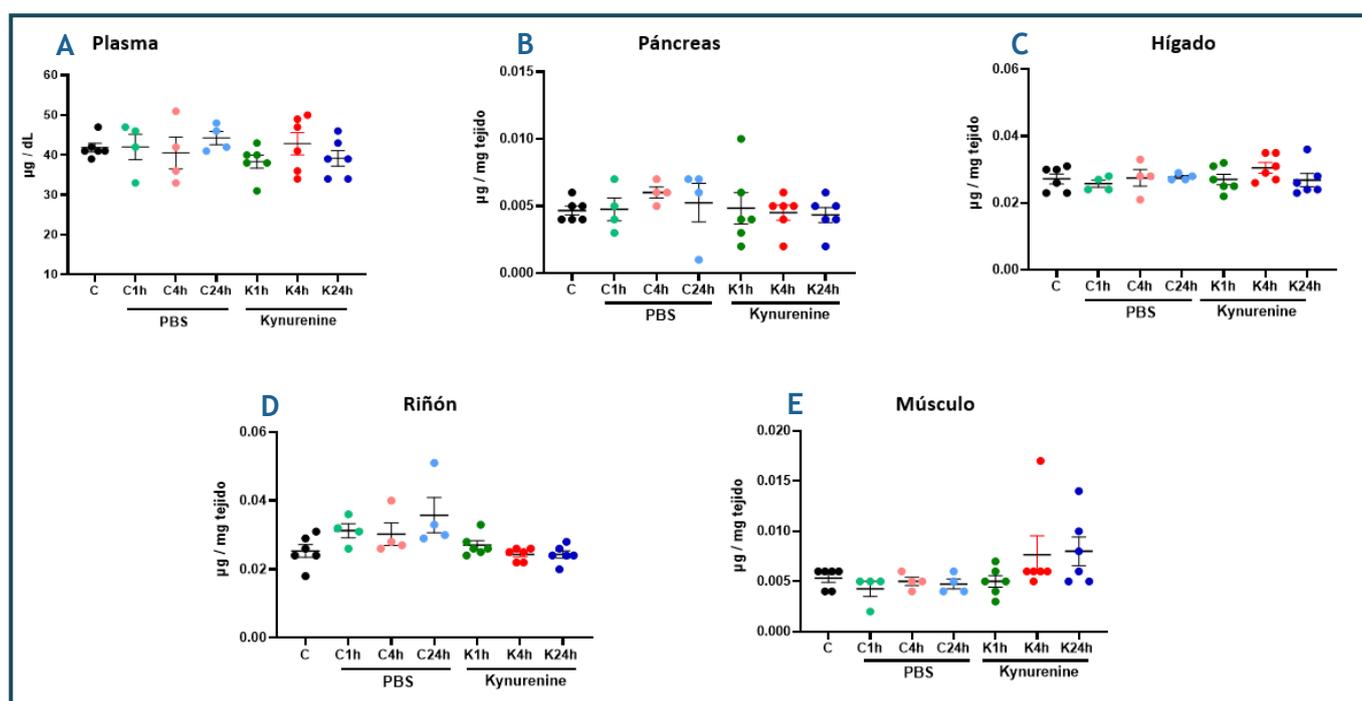
**Figura 9:** Concentración de Mg en los diferentes tejidos analizados.

**C:** grupo control sin inyección; **C1h, C4h y C24h:** grupos inyectados con PBS y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente; **K1h, K4h, K24h:** grupos inyectados con quinurenina y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente.

## Efecto de la quinurenina en el nivel de cobre (Cu) en diferentes tejidos

Como se puede observar en la figura 10, los niveles de Cu son bastante bajos en todos los tejidos. En el caso de los eritrocitos, el fémur y la grasa, las mediciones de Cu estuvieron por debajo del límite de detección por eso no se muestran. Por otro lado, en el plasma (fig. 10A), el páncreas (fig. 10B), el hígado (fig. 10C), el riñón (fig. 10D) y el músculo (fig. 10E), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos que recibieron alguna inyección en ninguno de los tiempos evaluados.

### Cu



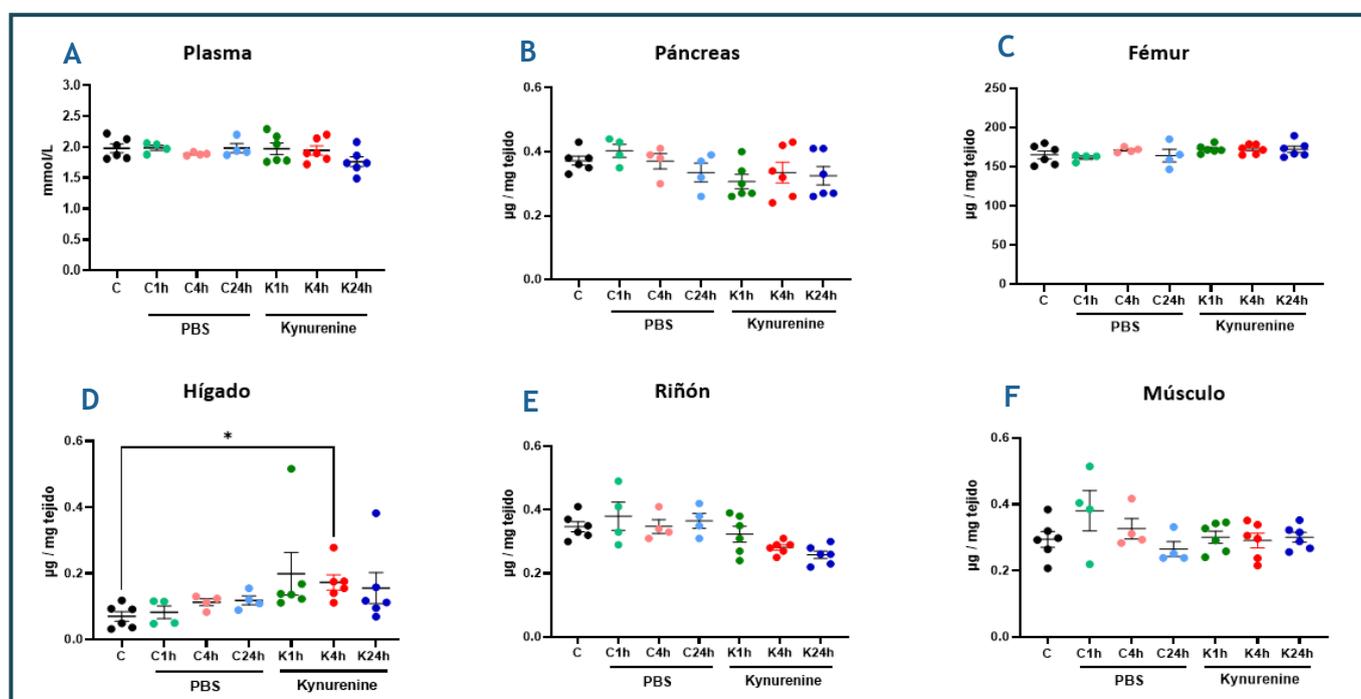
**Figura 10:** Concentración de Cu en los diferentes tejidos analizados.

**C:** grupo control sin inyección; **C1h, C4h y C24h:** grupos inyectados con PBS y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente; **K1h, K4h, K24h:** grupos inyectados con quinurenina y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente.

## Efecto de la quinurenina en el nivel de calcio (Ca) en diferentes tejidos

Los niveles de Ca fueron bastante bajos en la mayoría de los tejidos, en el caso de los eritrocitos y la grasa estuvieron por debajo del límite de detección, razón por la cual no se muestran. Por otro lado, en el plasma (fig. 11A), el páncreas (fig. 11B), el fémur (fig. 11C), el riñón (fig. 11E) y el músculo (fig. 11F) no se observaron diferencias estadísticas entre el grupo control y los grupos que recibieron alguna inyección en ninguno de los tiempos evaluados. Particularmente, en el hígado (fig. 11D) se observó un aumento en la concentración del Ca en el grupo inyectado con quinurenina y evaluado a las 4 horas después de la inyección, que es estadísticamente significativo con respecto al grupo control *naive*.

### Ca

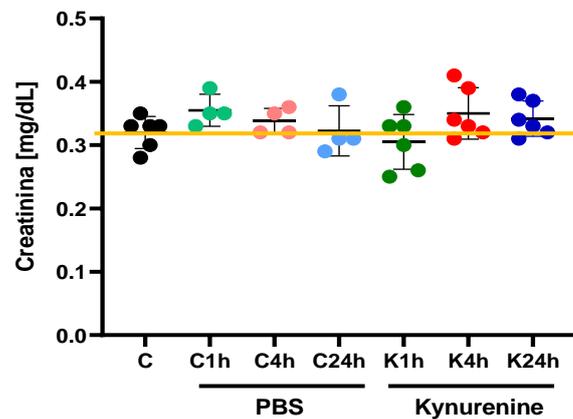


**Figura 11:** Concentración de Ca en los diferentes tejidos analizados.

**C:** grupo control sin inyección; **C1h, C4h y C24h:** grupos inyectados con PBS y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente; **K1h, K4h, K24h:** grupos inyectados con quinurenina y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente.

## Efecto de la quinurenina en la filtración renal

En la figura 12 se muestran las concentraciones de creatinina plasmática de los animales de cada grupo experimental. Como se puede observar, los niveles de creatinina plasmática no variaron de manera significativa después de la administración de quinurenina, en ninguno de los tiempos evaluados, con respecto a los grupos controles.



**Figura 12:** Niveles de creatinina en el plasma de los animales estudiados.

**C:** grupo control sin inyección; **C1h, C4h y C24h:** grupos inyectados con PBS y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente; **K1h, K4h, K24h:** grupos inyectados con quinurenina y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente.

## VII. Discusión

### Efecto de la quinurenina sobre los niveles de zinc en el organismo

Sobre la regulación sistémica del hierro, se conoce que el hígado secreta la hormona peptídica hepcidina cuando hay una sobrecarga de hierro o estímulos inflamatorios (Nemeth *et al.*, 2004). La hepcidina induce la degradación del exportador de hierro, la ferroportina, favoreciendo el almacenamiento celular de este metal (Nemeth *et al.*, 2004). La disminución del hierro en circulación da lugar a una reducción en la síntesis de hemoglobina, la cual es detectada por el riñón y en respuesta secreta la hormona eritropoyetina. Las células eritroides responden a la eritropoyetina secretando eritroferrona, que luego actúa sobre el hígado para inhibir la síntesis de hepcidina y así

restablecer la entrada de hierro en la circulación sanguínea (Muckenthaler *et al.*, 2017). En contraste con esto, se desconoce cómo el organismo detecta la disponibilidad sistémica del zinc para regular su absorción, su almacenamiento y su excreción. Recientemente se descubrió que la vía de la quinurenina participa en la regulación sistémica del zinc en *Drosophila melanogaster* (Garay *et al.*, 2022). Debido a esto investigamos si la quinurenina en mamíferos está implicada en la regulación sistémica del Zn, promoviendo el almacén de este metal. Para ello inyectamos ratones con quinurenina ( $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , vehículo PBS) por vía subcutánea. Como se puede observar en la figura 6A, la quinurenina provocó una disminución significativa de la concentración plasmática de zinc en los ratones que recibieron la inyección y fueron evaluados 4 horas después de la misma. Curiosamente, el grupo control que recibió la inyección de PBS y se evaluó 1 hora después presenta un incremento muy significativo en la concentración de Zn plasmática, lo cual fue inesperado (fig. 6A). Es bastante frecuente en estudios donde administran algún fármaco, que el PBS sea utilizado como vehículo. Hasta donde revisamos no encontramos reportes de efectos producidos por el PBS sobre los metales o algún proceso fisiológico, puesto que al ser una solución tampón no debe modificar el perfil de expresión y el funcionamiento celular normal. Por tanto, es algo que debemos repetir, ya que un aparente efecto del PBS se observó más de una vez en plasma e hígado en diferentes grupos experimentales en varios metales (fig. 6A, fig. 6E, fig. 7E, fig. 9E).

De acuerdo también con nuestra hipótesis, observamos un aumento significativo en la concentración de Zn en el fémur (fig. 6C) y el hígado (fig. 6E), ambos órganos han sido relacionados con el almacén de este metal. En el caso del fémur (fig. 6C) vimos que el incremento ocurrió una hora después de la inyección y se mantuvo hasta 24 horas después de la misma. En el caso del hígado (fig. 6E) el aumento ocurrió a las 4 horas y no se mantuvo 24 horas después de la administración. Se ha reportado, que algunos tejidos blandos como el hígado pueden acumular Zn, pero estos sumideros son limitados y, por lo tanto, se agotan con bastante rapidez (Brugger & Windisch, 2019; Wilhelm Windisch, 2003). Sin embargo, el hueso sirve como almacenamiento de Zn tanto a corto como a largo plazo (Wilhelm Windisch, 2003). En el caso del riñón se observa una disminución de la concentración de Zn a las 24 horas quizás como mecanismo compensatorio por la disminución plasmática de este metal y el hecho de que parece estar almacenándose en el fémur.

## **Efecto de la quinurenina sobre los otros metales evaluados**

Medimos otros metales a modo de control, para que, en el caso de observar algún efecto de la quinurenina en la concentración del zinc, saber si era un efecto específico o no. En el caso del plasma podemos observar que hay una disminución en el hierro (fig. 7A), aunque no es significativa, y que los datos presentan una alta variabilidad la cual puede deberse a que los plasmas presentaban distinto grado de hemólisis, coincidiendo los valores más altos de concentración de hierro con los plasmas que tenían la coloración más roja, lo cual ciertamente afecta la estadística y la interpretación de los resultados. En el caso del fémur el hierro subió de manera estadísticamente significativa a las 24 horas después de la inyección (fig. 7C), sin embargo, no sabemos de dónde pudo venir ese hierro, ya que en ningún tejido se produce una disminución estadísticamente significativa que lo pueda explicar, aunque no podemos descartar que provenga de la circulación sanguínea.

En la concentración plasmática de magnesio vemos una disminución significativa a las 4 y 24 horas después de la administración de quinurenina (fig. 9A); y que aumentó en el hígado en los grupos administrados con PBS a las 4 y 24 horas (fig. 9E), así como también en los grupos administrados con quinurenina y evaluados a las 1 y 4 horas después de la inyección, sin embargo, es válido destacar que el mayor efecto se produce por la quinurenina a las 4 horas (fig. 9E). No encontramos en la literatura antecedentes sobre estas observaciones. Lo que sí se ha visto es que una deficiencia de magnesio provoca un aumento en la concentración plasmática de quinurenina (García-López *et al.*, 2009; Grimaldi, 2002). Debido a que la enzima quinureninasa, que descompone la quinurenina a ácido antranílico (fig. 3), requiere magnesio y fosfato de piridoxal, y su actividad disminuye en la deficiencia de magnesio (Shibata *et al.*, 1991). Además, la quinureninasa tiene una alta expresión en los hepatocitos (según el Human Protein Atlas: [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)), quizás por eso al aumentar la quinurenina plasmática favoreció al aumento en la concentración de magnesio en el hígado, para garantizar el correcto funcionamiento de esta enzima. Sin embargo, al verse un efecto también después de la inyección de PBS, los resultados se vuelven dudosos.

Por otro lado, en el potasio se observó una ligera disminución, aunque significativa estadísticamente, en el músculo, a las 24 horas después de la administración de quinurenina. Y el Ca aumentó en el hígado en el grupo experimental inyectado con quinurenina y evaluado a las 4 horas.

Resumiendo, tenemos que, en el plasma se observó una disminución estadísticamente significativa como resultado de la administración por vía subcutánea de quinurenina en los metales zinc y magnesio. En el caso del zinc el efecto fue a las 4 horas y en el caso del magnesio el efecto comenzó a las 4 horas y se mantuvo 24 horas después de la inyección. Por tanto, parece que un aumento de la quinurenina plasmática no afecta de manera exclusiva al zinc. Pudiera ser que la quinurenina esté provocando una activación del sistema inmunológico a través del receptor AhR y como consecuencia se esté afectando más de un metal, principalmente Zn y Mg, ambos muy importantes en la respuesta inmunitaria (Keen & Gershwin, 1990; Nielsen, 2018; Trapani *et al.*, 2022; Verschelden *et al.*, 2021; Vogel-González *et al.*, 2021).

En el caso de los tejidos, el hígado fue el órgano con más cambios, donde aumentó zinc, hierro, magnesio y calcio. Sin embargo, para hierro el único incremento significativo, fue el grupo inyectado con PBS a las 4 horas, por tanto, no podemos hablar de un efecto de la quinurenina en este órgano para este metal. Y en el caso del magnesio en hígado el aumento se observó con la administración de PBS y quinurenina, lo cual no nos permite saber si es un efecto real o no.

En el fémur los resultados son más claros, se observó un aumento en hierro a las 24 horas y un aumento en zinc a la una hora tras la inyección de quinurenina. El aumento de zinc se mantuvo hasta 24 horas después de la administración.

En el músculo sólo cambió el potasio.

En el resto de los tejidos no se observaron cambios significativos tras la inyección de la quinurenina.

Y en el cobre no se observaron cambios en ningún tejido.

### **Efecto de la quinurenina en la filtración renal**

Aunque la mayoría de los procesos metabólicos de la quinurenina ocurren en el hígado, la eliminación ocurre principalmente en los riñones a través de la orina (Marszalek-Grabska *et al.*, 2021). Por tanto, para comprobar la bioseguridad de la dosis administrada de quinurenina, medimos la concentración de creatinina plasmática. Ya que la concentración de creatinina plasmática es inversamente proporcional a la tasa de filtración glomerular. Como se observa en la figura 12, los niveles de creatinina plasmática no variaron de manera significativa tras la administración de quinurenina, en ninguno de los tiempos evaluados, con respecto a los grupos controles. Por tanto, podemos decir que la quinurenina no afectó la filtración renal de los animales, lo cual es indicativo de un funcionamiento renal adecuado y que la dosis de quinurenina empleada es segura para los riñones.

### **VIII. Conclusiones**

La administración de quinurenina afectó la concentración de zinc en el organismo, provocando una disminución del zinc circulante y favoreciendo su almacenamiento en el fémur y el hígado. Sin embargo, el efecto no parece ser exclusivo, debido a que, un efecto similar se observó en magnesio y hierro.

## **IX. Perspectivas**

Para continuar dilucidando el efecto de la quinurenina en la regulación del zinc, proponemos: cuantificar los niveles de interleucina-6 en el plasma de los ratones para ver si la inyección de quinurenina provoca la activación del sistema inmunológico, debido a que la activación del sistema inmunológico puede influir en los niveles plasmáticos del zinc y de otros metales; aumentar la dosis de quinurenina para ver si se hace más evidente su efecto sobre la concentración de algunos de los metales estudiados; repetir los experimentos utilizando un vehículo diferente (solución salina) para la inyección de quinurenina y ver si se mantiene el efecto sin el “ruido” causado por el PBS. Todo lo anterior será de ayuda para esclarecer si la quinurenina funciona como un modulador de la homeostasis sistémica del zinc como nuestros datos sugieren.

## X. Bibliografía citada

- Åkesson, K., Pettersson, S., Ståhl, S., Surowiec, I., Hedenström, M., Eketjäll, S., . . . Svenungsson, E. (2018). Kynurenine pathway is altered in patients with SLE and associated with severe fatigue. *Lupus Science & Medicine*, 5(1), e000254.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., & Rosato, A. (2006). Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of proteome research*, 5(1), 196-201.
- Andrews, G. K. (2001). Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. *Zinc biochemistry, physiology, and homeostasis*, 37-51.
- Baba, T., Mimura, J., Nakamura, N., Harada, N., Yamamoto, M., Morohashi, K.-i., & Fujii-Kuriyama, Y. (2005). Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Molecular and cellular biology*, 25(22), 10040-10051.
- Baltaci, A. K., Mogulkoc, R., & Baltaci, S. B. (2019). The role of zinc in the endocrine system. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 32(1).
- Barreto, F. S., Chaves Filho, A. J., de Araújo, M. C., de Moraes, M. O., de Moraes, M. E., Maes, M., . . . Macedo, D. S. (2018). Tryptophan catabolites along the indoleamine 2, 3-dioxygenase pathway as a biological link between depression and cancer. *Behavioural Pharmacology*, 29(2), 165-180.
- Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J., & Valentine, J. S. (1994). *Bioinorganic chemistry*: University science books.
- Boros, F. A., Bohár, Z., & Vécsei, L. (2018). Genetic alterations affecting the genes encoding the enzymes of the kynurenine pathway and their association with human diseases. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 776, 32-45.
- Brautigan, D., Bornstein, P., & Gallis, B. (1981). Phosphotyrosyl-protein phosphatase. Specific inhibition by Zn. *Journal of Biological Chemistry*, 256(13), 6519-6522.
- Brugger, D., & Windisch, W. M. (2019). Zn metabolism of monogastric species and consequences for the definition of feeding requirements and the estimation of feed Zn bioavailability. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 20(8), 617-627.
- Cousins, R. J. (1994). Metal elements and gene expression. *Annual review of nutrition*, 14(1), 449-469.
- Cousins, R. J., Liuzzi, J. P., & Lichten, L. A. (2006). Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24085-24089.
- Csermely, P., Szamel, M., Resch, K., & Somogyi, J. (1988). Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 263(14), 6487-6490.
- Da Silva, J. F., & Williams, R. J. P. (2001). *The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life*: Oxford University Press.
- Dalton, T. P., Bittel, D., & Andrews, G. K. (1997). Reversible activation of mouse metal response element-binding transcription factor 1 DNA binding involves zinc interaction with the zinc finger domain. *Molecular and cellular biology*, 17(5), 2781-2789.
- Diani-Moore, S., Shoots, J., Singh, R., Zuk, J. B., & Rifkind, A. B. (2017). NAD<sup>+</sup> loss, a new player in AhR biology: prevention of thymus atrophy and hepatosteatosis by NAD<sup>+</sup> repletion. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Eide, D. J. (2004). The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflügers Archiv*, 447(5), 796-800.
- Eide, D. J. (2006). Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7), 711-722.
- Ekemen Keleş, Y., Yılmaz Çiftdoğan, D., Çolak, A., Kara Aksay, A., Üstündag, G., Şahin, A., & Yılmaz, N. (2022). Serum zinc levels in pediatric patients with COVID-19. *European Journal of Pediatrics*, 181(4), 1575-1584.
- Esser, C., & Rannug, A. (2015). The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology. *Pharmacological reviews*, 67(2), 259-279.
- Evans, G. (1980). Normal and abnormal zinc absorption in man and animals: the tryptophan connection.
- Fosmire, G. J. (1990). Zinc toxicity. *The American journal of clinical nutrition*, 51(2), 225-227.
- Fukunaga, M., Yamamoto, Y., Kawasoe, M., Arioka, Y., Murakami, Y., Hoshi, M., & Saito, K. (2012). Studies on tissue and cellular distribution of indoleamine 2, 3-dioxygenase 2: the absence of IDO1 upregulates IDO2 expression in the epididymis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 60(11), 854-860.
- Garay, E., Schuth, N., Barbanente, A., Tejeda-Guzmán, C., Vitone, D., Osorio, B., . . . Dau, H. (2022). Tryptophan regulates Drosophila zinc stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(16), e2117807119.

- Garcia-Lopez, R., Perea-Milla, E., Garcia, C. R., Rivas-Ruiz, F., Romero-Gonzalez, J., Moreno, J. L., . . . Diaz, J. C. R. (2009). New therapeutic approach to Tourette Syndrome in children based on a randomized placebo-controlled double-blind phase IV study of the effectiveness and safety of magnesium and vitamin B6. *Trials*, *10*(1), 1-12.
- Gasiewicz, T. A., Singh, K. P., & Bennett, J. A. (2014). The Ah receptor in stem cell cycling, regulation, and quiescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1310*(1), 44-50.
- Gialitakis, M., Tolaini, M., Li, Y., Pardo, M., Yu, L., Toribio, A., . . . Stockinger, B. (2017). Activation of the aryl hydrocarbon receptor interferes with early embryonic development. *Stem Cell Reports*, *9*(5), 1377-1386.
- Grimaldi, B. (2002). The central role of magnesium deficiency in Tourette's syndrome: causal relationships between magnesium deficiency, altered biochemical pathways and symptoms relating to Tourette's syndrome and several reported comorbid conditions. *Medical hypotheses*, *58*(1), 47-60.
- Grzywacz, A., Gdula-Argasińska, J., Muszyńska, B., Tyszka-Czochara, M., Librowski, T., & Opoka, W. (2015). Metal responsive transcription factor 1 (MTF-1) regulates zinc dependent cellular processes at the molecular level.
- Gupta, S., Brazier, A., & Lowe, N. (2020). Zinc deficiency in low-and middle-income countries: prevalence and approaches for mitigation. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, *33*(5), 624-643.
- Hall, T. M. T. (2005). Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Current opinion in structural biology*, *15*(3), 367-373.
- Hansson, A. (1996). Extracellular zinc ions induces mitogen-activated protein kinase activity and protein tyrosine phosphorylation in bombesin-sensitive Swiss 3T3 fibroblasts. *Archives of biochemistry and biophysics*, *328*(2), 233-238.
- Hervey, G. (1953). Determination of creatinine by the Jaffe reaction. *Nature*, *171*(4364), 1125-1125.
- Hirano, T., Murakami, M., Fukada, T., Nishida, K., Yamasaki, S., & Suzuki, T. (2008). Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule. *Advances in immunology*, *97*, 149-176.
- Huang, T., Song, J., Gao, J., Cheng, J., Xie, H., Zhang, L., . . . Wang, X. (2022). Adipocyte-derived kynurenine promotes obesity and insulin resistance by activating the AhR/STAT3/IL-6 signaling. *Nature Communications*, *13*(1), 1-16.
- Jackson, M. (1989). Physiology of zinc: general aspects. In *Zinc in human biology* (pp. 1-14): Springer.
- Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., & Itsumura, N. (2015). The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiological reviews*.
- Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (1990). Zinc deficiency and immune function. *Annual review of nutrition*, *10*(1), 415-431.
- King, J. C., Shames, D. M., & Woodhouse, L. R. (2000). Zinc homeostasis in humans. *The Journal of nutrition*, *130*(5), 1360S-1366S.
- Klug, A., & Rhodes, D. (1987). *Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition*. Paper presented at the Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.
- Ko, C.-l., Fan, Y., de Gannes, M., Wang, Q., Xia, Y., & Puga, A. (2016). Repression of the aryl hydrocarbon receptor is required to maintain mitotic progression and prevent loss of pluripotency of embryonic stem cells. *Stem Cells*, *34*(12), 2825-2839.
- Lawrence, B. P., & Vorderstrasse, B. A. (2013). *New insights into the aryl hydrocarbon receptor as a modulator of host responses to infection*. Paper presented at the Seminars in immunopathology.
- Leklem, J. E. (1971). Quantitative aspects of tryptophan metabolism in humans and other species: a review. *The American journal of clinical nutrition*, *24*(6), 659-672.
- Mándi, Y., & Vécsei, L. (2012). The kynurenine system and immunoregulation. *Journal of neural transmission*, *119*(2), 197-209.
- Maret, W. (2013). Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Advances in nutrition*, *4*(1), 82-91.
- Marszalek-Grabska, M., Walczak, K., Gawel, K., Wicha-Komsta, K., Wnorowska, S., Wnorowski, A., & Turski, W. A. (2021). Kynurenine emerges from the shadows-Current knowledge on its fate and function. *Pharmacology & Therapeutics*, *225*, 107845.
- Mezzaroba, L., Alfieri, D. F., Simão, A. N. C., & Reiche, E. M. V. (2019). The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology*, *74*, 230-241.

- Miller, J., McLachlan, A., & Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *The EMBO journal*, 4(6), 1609-1614.
- Miyai, T., Hojyo, S., Ikawa, T., Kawamura, M., Irié, T., Ogura, H., . . . Kitamura, H. (2014). Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 facilitates antiapoptotic signaling during early B-cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(32), 11780-11785.
- Muckenthaler, M. U., Rivella, S., Hentze, M. W., & Galy, B. (2017). A red carpet for iron metabolism. *Cell*, 168(3), 344-361.
- Murray, I. A., Patterson, A. D., & Perdew, G. H. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature Reviews Cancer*, 14(12), 801-814.
- Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B., & Gonzalez, F. J. (2004). Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 23847-23850.
- Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., . . . Kaplan, J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *science*, 306(5704), 2090-2093.
- Nielsen, F. H. (2018). Magnesium deficiency and increased inflammation: current perspectives. *Journal of inflammation research*, 25-34.
- Nimmanon, T., Ziliotto, S., Morris, S., Flanagan, L., & Taylor, K. (2017). Phosphorylation of zinc channel ZIP7 drives MAPK, PI3K and mTOR growth and proliferation signalling. *Metallomics*, 9(5), 471-481.
- Oberleas, D. (1996). Mechanism of zinc homeostasis. *Journal of inorganic biochemistry*, 62(4), 231-241.
- Opitz, C. A., Litzenburger, U. M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., . . . Weller, M. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478(7368), 197-203.
- Palmiter, R. D., & Huang, L. (2004). Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflügers Archiv*, 447(5), 744-751.
- Prasad, A. S. (2013). Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease. *Advances in nutrition*, 4(2), 176-190.
- Rothhammer, V., & Quintana, F. J. (2019). The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 19(3), 184-197.
- Shibata, Y., Takeuchi, F., Tsubouchi, R., Haneda, M., Ohta, T., Nakatsuka, M., . . . Fujimoto, H. (1991). On kynureninase activity. *Kynurenine and Serotonin Pathways: Progress in Tryptophan Research*, 523-526.
- Sloup, V., Jankovská, I., Nechybová, S., Peřínková, P., & Langrová, I. (2017). Zinc in the animal organism: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 48(1), 13-21.
- Stockinger, B., Meglio, P. D., Gialitakis, M., & Duarte, J. H. (2014). The Aryl Hydrocarbon Receptor: Multitasking in the Immune System. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 403-432. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120245
- Takikawa, O. (2005). Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2, 3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 12-19.
- Taylor, C. M., Bacon, J. R., Aggett, P. J., & Bremner, I. (1991). Homeostatic regulation of zinc absorption and endogenous losses in zinc-deprived men. *The American journal of clinical nutrition*, 53(3), 755-763.
- Trapani, V., Rosanoff, A., Baniyadi, S., Barbagallo, M., Castiglioni, S., Guerrero-Romero, F., . . . Pourdowlat, G. (2022). The relevance of magnesium homeostasis in COVID-19. *European journal of nutrition*, 1-12.
- Tuerk, M. J., & Fazel, N. (2009). Zinc deficiency. *Current opinion in gastroenterology*, 25(2), 136-143.
- Vallee, B. L. (1995). The function of metallothionein. *Neurochemistry international*, 27(1), 23-33.
- Vallee, B. L., & Falchuk, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological reviews*, 73(1), 79-118.
- Velázquez-Delgado, E. M., & Hardy, J. A. (2012). Zinc-mediated allosteric inhibition of caspase-6. *Journal of Biological Chemistry*, 287(43), 36000-36011.
- Verschelden, G., Noeparast, M., Noparast, M., Goossens, M. C., Lauwers, M., Cotton, F., . . . Hites, M. (2021). Plasma zinc status and hyperinflammatory syndrome in hospitalized COVID-19 patients: An observational study. *International Immunopharmacology*, 100, 108163.

- Vogel-González, M., Talló-Parra, M., Herrera-Fernández, V., Pérez-Vilaró, G., Chillón, M., Nogués, X., . . . Sorli-Redó, M. L. (2021). Low zinc levels at admission associates with poor clinical outcomes in SARS-CoV-2 infection. *Nutrients*, *13*(2), 562.
- von Bülow, V., Rink, L., & Haase, H. (2005). Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production in monocytes by elevation of guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate. *The Journal of Immunology*, *175*(7), 4697-4705.
- Wang, H., Li, X.-B., Huang, R.-G., Cao, N.-W., Wu, H., Li, K.-D., . . . Li, B.-Z. (2022). Essential trace element status in systemic lupus erythematosus: a meta-analysis based on case-control studies. *Biological Trace Element Research*, 1-13.
- Wessells, K. R., & Brown, K. H. (2012). Estimating the global prevalence of zinc deficiency: results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. *PLoS one*, *7*(11), e50568.
- Wilson, M., Hogstrand, C., & Maret, W. (2012). Picomolar concentrations of free zinc (II) ions regulate receptor protein-tyrosine phosphatase B activity. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(12), 9322-9326.
- Windisch, W. (2003). Development of zinc deficiency in <sup>65</sup>Zn labeled, fully grown rats as a model for adult individuals. *Journal of trace elements in medicine and biology*, *17*(2), 91-96.
- Windisch, W., Wher, U., Rambeck, W., & Erben, R. (2002). Effect of Zn deficiency and subsequent Zn repletion on bone mineral composition and markers of bone tissue metabolism in <sup>65</sup>Zn-labelled, young-adult rats. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, *86*(7-8), 214-221.
- Yamamoto, J., Ihara, K., Nakayama, H., Hikino, S., Satoh, K., Kubo, N., . . . Hara, T. (2004). Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life sciences*, *74*(8), 1039-1049.
- Yamashita, S., Miyagi, C., Fukada, T., Kagara, N., Che, Y.-S., & Hirano, T. (2004). Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature*, *429*(6989), 298-302.
- Yamazaki, F., Kuroiwa, T., Takikawa, O., & Kido, R. (1985). Human indolylamine 2, 3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. *Biochemical Journal*, *230*(3), 635-638.