



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:

Lic. Raúl Jorge Marrero

Para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias

En la especialidad de:

Fisiología Celular y Molecular

Directores de tesis:

Dr. Fanis Missirlis

Dr. Yair Cruz Narváez

Ciudad de México

Agosto, 2024

Índice:

Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
Relación entre la vía de las quinureninas y el zinc	9
Vía de las quinureninas	9
Modulación de la vía de las quinureninas	10
Cuantificación de la quinurenina.....	11
Espectrometría de masas de ultra alta resolución con resonancia en el ciclotrón FT ICR MS	12
Antecedentes directos:.....	12
Efecto del estrés en los animales de laboratorio.....	13
Problema:.....	14
Hipótesis:	14
Objetivo general:	14
Objetivos específicos:	14
Materiales y Métodos.....	14
Animales y condiciones experimentales	14
Grupos experimentales	15
Cuantificación de los metales ICP-OES	16
Protocolo de ELISA para la determinación de Quinurenina en plasma de ratones	16
Resultados.....	17
Cuantificación de quinurenina por espectrometría de masas FTICR MS	17
Cuantificación de zinc en plasma e hígado.....	22
Cuantificación de quinurenina por ELISA	26
Discusión	27
Estandarización del método de cuantificación de quinurenina por FTICR MS	27
Efecto de la quinurenina en el contenido de zinc en plasma e hígado	27
Conclusiones	29
Referencias:.....	30

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: 1239895) no hubiera sido posible la realización de la tesis.

A mi director de tesis el Dr. Fanis Missirlis por su genialidad, conocimiento y una extraordinaria capacidad de hacer de mi paso por su laboratorio no solo un lugar de trabajo, sino un ambiente extremadamente ameno.

A mi director de tesis Dr. Yair Cruz Narváez por su elevado conocimiento, sus extraordinarias capacidades como educador, científico y por su inagotable empeño en la búsqueda de soluciones ante los problemas científicos.

A mis estimados asesores, la Dra. Liora Shoshani y el Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño por el apoyo y el conocimiento que me brindaron durante este tiempo, así como sus importantes aportes a mi formación.

A Lic. Beatriz Osorio Carranza por su valiosa ayuda brindada durante los experimentos, por enseñarme muchas de las técnicas que se muestran en este trabajo y por ser una persona extraordinariamente amable y dispuesta siempre a ayudar.

A la Mtr Ana Karen Pantaleón por todo el apoyo que me brindó para que esta tesis fuera posible y por enseñarme cómo trabajar con los animales.

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 que contribuyeron a mi formación.

A mis compañeros de curso y del laboratorio, por su amabilidad y por su apoyo. Gracias a Karen, Jahir, Carlos, Oscar y Cynthia.

A mis compañeros cubanos que comparten esta aventura conmigo en especial a Mayre, Daniel, Lázaro, Normita, Anaisa entre otros; por ser mis amigos y por hacer de mi vida un mejor camino.

A Elito, porque hemos compartido momentos algunos difíciles y otros buenos, en los que nuestra amistad se ha convertido en hermandad.

A mi pareja, María Karla por su capacidad emocional cuando este proyecto ha exigido lo máximo de mi fortaleza y estar ahí para no dejarme caer. Y sobre todas las cosas, por poseer una extraordinaria inteligencia y una luz propia tan brillante que arroja sobre todo aquel que a su lado se encuentre. Por ende, agradecerles a sus padres, en especial a su mamá Dra. Mayra Muné, con quien he tenido largas charlas entre risas, ciencia, virus y zinc.

A mis abuelos, tíos, primos y familiares en general. Porque la persona que actualmente soy es en gran parte gracias a ellos. En especial a mi abuela Alla, porque no existe en este mundo persona más cariñosa.

A mi madre por enseñarme a ser fuerte y a exigirme lo máximo cada día, pero sobre todo porque el amor que me ha dado carece de límites.

A mi padre por enseñarme que nada en la vida merece la pena si no eres buena persona, por ser un hombre con una sensibilidad extraordinaria, por siempre tener una sonrisa que lo acompaña y por darme tanto cariño.

Y finalmente, a mi hermana Laura por tener la fe de que estoy en este mundo por ella y porque siempre ha cuidado de mis pasos, toda buena obra que haga siempre va a ir en su memoria.

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 correcto plegamiento y/o función. A pesar de la reconocida importancia del zinc en la fisiología, la regulación sistémica de este metal sigue siendo desconocida. Recientemente, se informó que la vía de la quinurenina, una ruta de degradación del triptófano participa en la regulación sistémica del zinc en *Drosophila melanogaster*. Por ello, en este estudio se explora si esta observación en la mosca es aplicable a un modelo animal de mamíferos. El objetivo principal de este estudio fue evaluar el papel de la quinurenina (tanto exógena, como endógena) en la regulación de los niveles sistémicos de zinc en el ratón. Para ello, inyectamos ratones macho C57BL/6 con quinurenina, PBS o simplemente realizamos el pinchazo subcutáneo, según el grupo experimental. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de plasma e hígado, en las cuales se determinó la concentración de zinc mediante ICP-OES. Se avanzó en la estandarización de la cuantificación de quinurenina por FT ICR-MS y se cuantificó quinurenina mediante un ensayo de ELISA. Se observó que el estrés del pinchazo producido por la inyección provoca un aumento del zinc plasmático, aumento que no se produce cuando se administra una dosis de quinurenina de 20 mg/kg. Además, cuando la quinurenina está elevada en plasma, se favorece un almacenamiento proporcional de zinc en el hígado.

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 the binding of 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 remains unknown. Recently, it was reported that the kynurenine pathway, a tryptophan degradation route, participates in the systemic regulation of zinc in *Drosophila melanogaster*. Therefore, in this study, we questioned whether this observation in the fly is applicable to a mammalian animal model. The main objective of this study was to evaluate the role of kynurenine (both exogenous and endogenous) in regulating systemic zinc levels in mice. For this purpose, we injected male C57BL/6 mice with kynurenine, PBS, or simply performed the subcutaneous prick, depending on the experimental group. Subsequently, the mice were sacrificed, and plasma and liver samples were collected, in which zinc concentration was determined by ICP-OES. Progress was made in the standardization of kynurenine quantification by FT ICR-MS, and kynurenine was quantified using an ELISA assay. It was observed that the stress of the prick caused by the injection induces an increase in plasma zinc, an increase that does not occur when a dose of 20 mg/kg of kynurenine is administered. Furthermore, when kynurenine is elevated in plasma, it promotes a proportional storage of zinc in the liver.

Introducción

Los metales traza o micronutrientes inorgánicos desempeñan un papel crucial en la biología, siendo el hierro (metal de transición) un ejemplo destacado al formar parte esencial de la hemoglobina. El segundo metal de transición más abundante, encontrado en alrededor del 10 % de las proteínas, es el zinc. La asociación del ión metálico con diversas proteínas es fundamental para sus funciones estructurales, catalíticas. Además, el zinc funciona como mediador de señales, en la regulación y ejecución de procesos biológicos, lo que subraya la importancia del zinc en el marco de la fisiología celular y molecular (Kambe *et al.*, 2015).

El zinc desempeña un papel crucial en el ciclo celular, contribuyendo a la regulación precisa de las fases celulares. Es conocido que inhibe a enzimas como la caspasa 9, regulando de esta manera la apoptosis (Huber y Hardy, 2012). Además, 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), para dar algunos ejemplos de sus múltiples funciones en sistemas biológicos.

A nivel genético, el zinc es un regulador clave, participando en la modulación de la expresión génica y, por ende, influyendo en la respuesta celular a estímulos internos y externos. Un ejemplo son los dedos de zinc que son extremadamente abundantes en eucariotas superiores. Antes considerados exclusivamente como motivos de unión específica al ADN, se sabe ahora que los dedos de zinc tienen actividades adicionales, como el reconocimiento de ARN y otras proteínas (Gamsjaeger *et al.*, 2007; Krishna *et al.*, 2003).

Asimismo, se ha establecido la contribución esencial del zinc en el metabolismo de nutrientes, facilitando procesos metabólicos cruciales para la obtención de energía y la síntesis de biomoléculas. Tal es el caso de la carboxipeptidasa pancreática (Maret, 2013). Reconocer y mantener niveles óptimos de zinc durante las fases tempranas del desarrollo embrionario es crucial para garantizar la formación adecuada de estructuras y la viabilidad del organismo en desarrollo. Por ejemplo, la “*zinc spark*”; esta consiste en una expulsión de zinc de los ovocitos, necesario para

la transición de huevo a embrión (Kim et al., 2011). La acumulación de zinc en compartimentos subcelulares se encuentra en procesos específicos; por ejemplo, se importan grandes cantidades de zinc y se localizan en los gránulos corticales de los ovocitos durante la maduración meiótica desde la profase I hasta la metafase (Kim et al., 2011; Kong et al., 2011; Que et al., 2015), lo cual es necesario para la detención del crecimiento después de la primera división meiótica (Kim et al., 2011).

Se ha destacado el papel del zinc en el desarrollo del sistema nervioso, subrayando su influencia en la neurogénesis y la función neuronal. Se conoce que el zinc se almacena selectivamente en las vesículas presinápticas de un tipo específico de neurona, que se encuentra principalmente en la corteza cerebral de mamíferos y en las llamadas fibras muzzosas del giro dentado del hipocampo. Estas neuronas liberadoras de zinc también liberan glutamato y, por lo tanto, se ha propuesto el término 'gluzinérgico' para describirlas (Frederickson, 1989; Frederickson y Bush, 2001). La mayoría de las neuronas liberadoras de glutamato y zinc tienen sus cuerpos celulares en la corteza cerebral o en las estructuras límbicas (amígdala y septo) del prosencéfalo (Slomianka et al., 1990). Por lo tanto, el sistema neuronal liberador de glutamato y zinc comprende una vasta red asociativa cortical-límbica que une funciones límbicas y cerebrocorticales. El zinc parece modular la excitabilidad general del cerebro a través de sus efectos en los receptores de glutamato y probablemente de ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Smart et al., 1994), y también se cree que es importante en la plasticidad sináptica (Li et al., 2001; Brown et al., 2002). También en la literatura hay evidencias que implican señales de zinc en la fisiopatología del daño cerebral agudo y enfermedades degenerativas del cerebro (Frederickson et al., 2005).

Por último, se ha documentado su impacto en el desarrollo del sistema inmunológico, siendo un factor determinante en la maduración y función efectiva de las células del sistema inmune. Numerosos resultados de modelos animales han confirmado que la deficiencia de zinc induce atrofia tímica y linfopenia, compromete las respuestas celular y mediada por anticuerpos, y resulta en tasas de duración de

infección aumentadas (Fraker y King, 2004). Los niveles y la distribución intracelular de zinc han sido investigados utilizando sondas para visualizar el zinc lábil, que permiten la visualización de distintos depósitos de zinc en células relacionadas con alergias. Por ejemplo, los gránulos de las células de mastocitos fluorescen intensamente con zinquin (Ho et al., 2004). Las células epiteliales de las vías respiratorias también son ricas en zinc (Truong-Tran et al., 2000). Además, el zinc se encuentra en la matriz intracelular y extracelular y se acumula en los tejidos cutáneos después de una lesión (Lansdown et al., 2007). Además, el zinc acelera la cicatrización de heridas y el proceso de reepitelización (Lansdown, 1996).

Por lo anteriormente expuesto, es importante regular la homeostasis fisiológica del zinc. En el organismo adulto humano alberga en su interior aproximadamente de 2 a 3 gramos de zinc. La mayor parte de este zinc, alrededor del 60%, se almacena en el músculo esquelético, mientras que aproximadamente el 30% se encuentra en los huesos. En menor proporción, alrededor del 5%, se distribuye entre el hígado y la piel, y el restante 2-3% se localiza en otros tejidos (Jackson et al., 1989) (Figura 1). En cuanto al zinc en el suero, representa solo cerca del 0.1% del total de zinc en el cuerpo. De este porcentaje, aproximadamente el 80% está débilmente ligado a la albúmina, mientras que el restante 20% está fuertemente ligado a la α 2-macroglobulina (Barnett et al., 2013; Reyes, 1996) Respecto al aporte diario, alrededor del 0.1% del zinc corporal se repone mediante la dieta. La absorción de zinc en el duodeno y el yeyuno está meticulosamente regulada, incrementándose hasta un 90% en situaciones de deficiencia dietética de zinc (Taylor et al., 1991). En contraste, la liberación de zinc en caso de exceso se facilita a través de la secreción gastrointestinal, la descamación de células mucosas e integumento, y la excreción renal (Hambidge y Krebs, 2001; Krebs, 2013). Se destaca la notable capacidad de los seres humanos para regular el contenido total de zinc en el cuerpo, incluso ante cambios en la ingesta de hasta diez veces (King et al., 2000). Sin embargo, cómo se logra tal regulación homeostática no está descrito hasta la fecha.

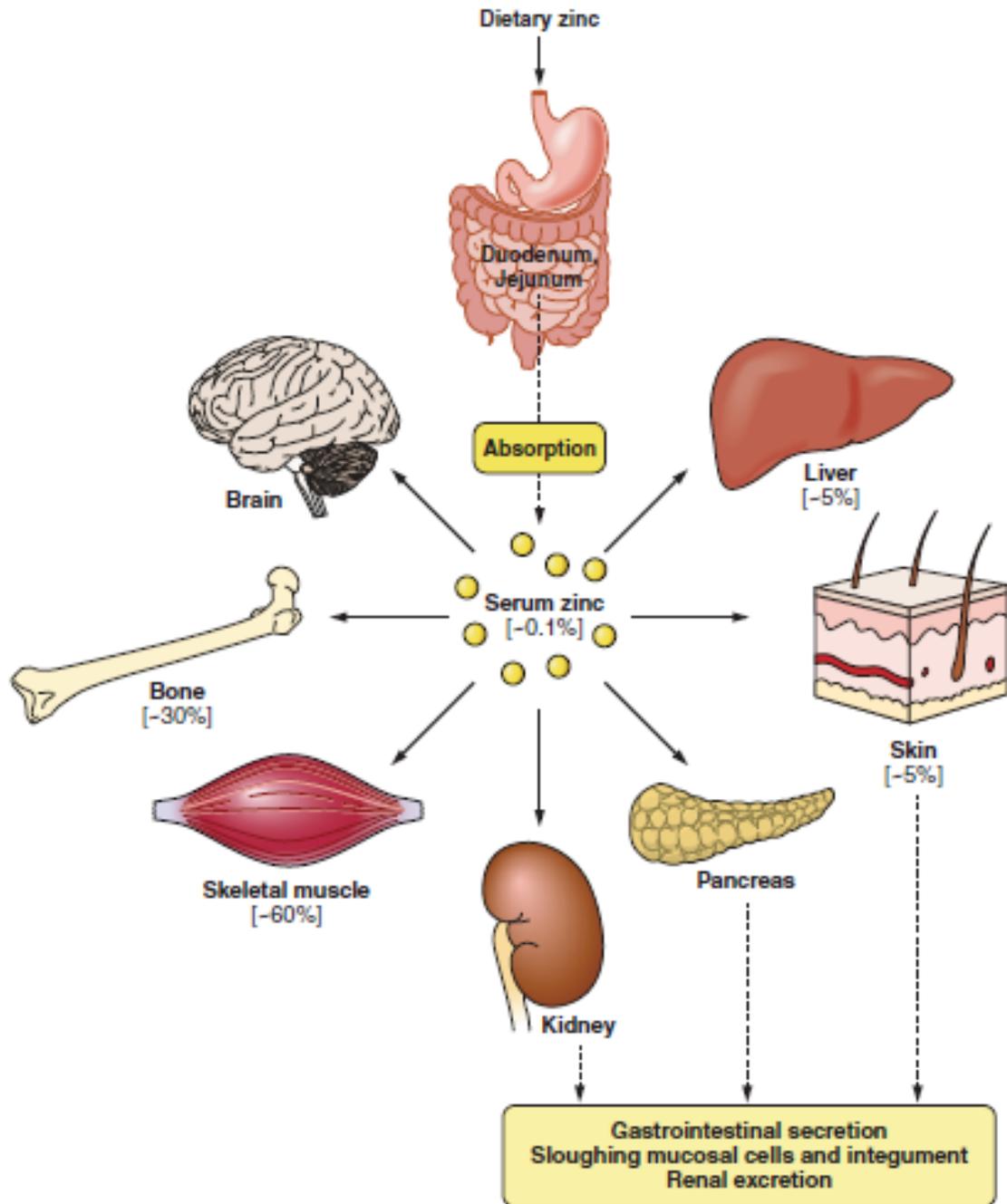


Figura 1. Esquema de la distribución de zinc en el cuerpo. El zinc de la dieta se absorbe en el intestino delgado (duodeno y yeyuno) y luego se distribuye a los tejidos periféricos. Aproximadamente el 60% del zinc se almacena en el músculo esquelético, un 30% en los huesos, y un 5% se almacena en el hígado y la piel. El porcentaje restante se distribuye en otros tejidos como el cerebro, el riñón y el páncreas. El exceso de zinc se elimina a través de la secreción gastrointestinal, la descamación de las células mucosas y la piel. La distribución

de zinc en el cuerpo está controlada de manera elaborada mediante la regulación coordinada de transportadores ZnT y ZIP. Tomado de Kambe et al., 2015 *Physiological Reviews*.

Relación entre la vía de las quinureninas y el zinc

Cabe destacar que, en la década de 1980 Gary Evans, estableció que la presencia de triptófano en la dieta de roedores o seres humanos ocasiona un aumento significativo en la retención por parte del intestino de zinc (Evans, 1980). A pesar del efecto que documentó, Evans no logró elucidar la conexión fisiológica entre el aminoácido y el ion metálico. Recientemente, se ha descubierto que la vía de la quinurenina (Figura 3), una ruta de degradación del triptófano desempeña un papel crucial en la regulación sistémica del zinc en *Drosophila melanogaster* (Garay et al., 2022). En particular, se observó que la quinurenina liberada de los cuerpos grasos de estos insectos induce la formación de gránulos de almacenamiento de zinc en los túbulos de Malpighi (equivalentes a los riñones en mamíferos). Mediante técnicas como la absorción de rayos X de alta energía y resonancia magnética nuclear, entre otras, se demostró que el zinc se almacena en complejo con 3-hidroxiquinurenina y en menor medida con ácido xanturénico en depósitos intracelulares (Garay et al., 2022).

Vía de las quinureninas

La vía de kynurenina (KP, por sus siglas en inglés) existe principalmente en el hígado, que contiene todas las enzimas necesarias para la síntesis de NAD⁺ a partir de Trp y es responsable de aproximadamente el 90% de la degradación total de Trp bajo condiciones fisiológicas normales. La KP también existe fuera del hígado, pero su contribución a la degradación de Trp es normalmente menor (5%-10%), aunque se vuelve más significativa cuantitativamente bajo condiciones de activación inmunológica. La KP extrahepática no incluye todas las enzimas de la vía, lo que determina qué intermediarios se producen y, por ende, el tipo de modulación funcional que resulta. Un esquema de la KP se presenta en la Figura 3. De manera general, el triptófano se convierte en N'-formilquinurenina (NFK) por la acción de la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) principalmente en el hígado, o de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO; EC 1.13.11.17) extrahepáticamente. La N'-formilquinurenina es luego hidrolizada a quinurenina (Kyn) por la NFK formamidasa (FAM). La

quinurenina se metaboliza principalmente por hidroxilación a 3-HK por la K hidroxilasa (K monooxigenasa [KMO]), seguida de la hidrólisis de 3-HK a 3-HAA por la quinureninasa. Esta última enzima también puede hidrolizar la K a ácido antranílico (AA). Tanto la K como el 3-HK también pueden ser transaminados a KA y ácido xanturénico (XA) por la K aminotransferasa (KAT) (Xue et al. 2023).

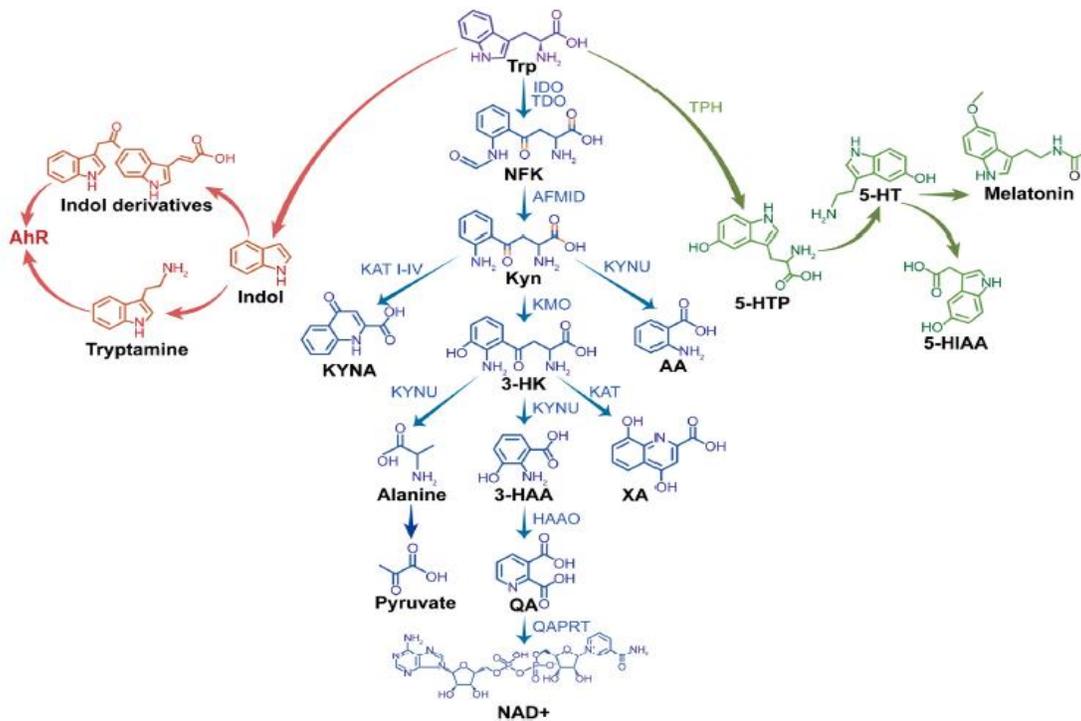


Figura 2: Vías de degradación del triptófano, en centro y de color azul la vía de las quinureninas, que ocurre en varios órganos del cuerpo humano. La vía de la izquierda es de bacterias entéricas y la de la derecha está relacionada a la producción en mamíferos de neurotransmisores. Tomado de Xue et al., 2023, Cell Metabolism.

Modulación de la vía de las quinureninas

En 1987 Nakamura y colaboradores reportaron que la inducción de TDO por glucocorticoides en cultivos primarios de hepatocitos adultos de rata se ve potenciada por el glucagón, pero inhibida por la insulina y la adrenalina, todos los cuales actúan a nivel transcripcional. Sin embargo, en hepatocitos cultivados, el glucagón incrementa la actividad de TDO en la etapa de traducción siempre que haya Trp presente para restaurar la actividad disminuida a los niveles observados en células recién aisladas, y este aumento parece ser sinérgico con el de los

glucocorticoides, sugiriendo así diferentes mecanismos de acción. Por lo tanto, el glucagón parece ejercer un efecto permisivo en la inducción de TDO por glucocorticoides y actuar adicionalmente en presencia de Trp (Badawy, 2017).

Cuantificación de la quinurenina

El estudio de los metabolitos del triptófano, como la quinurenina, en muestras biológicas requiere de métodos analíticos sofisticados y precisos. En este contexto, el método utilizado fundamentalmente es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Uno de los desafíos iniciales en el análisis de quinurenina es la eliminación eficiente de proteínas de la muestra biológica. Esto se logra de diversas maneras puede ser mediante el uso de ácidos como el ácido perclórico (PCA), el ácido tricloroacético (TCA) o bien sea mediante precipitaciones con metanol o acetonitrilo. Estos compuestos desnaturalizan las proteínas, lo que provoca su precipitación cuando se mezclan con la muestra. Posteriormente, la mezcla se somete a centrifugación para separar las proteínas precipitadas de los metabolitos solubles en el sobrenadante, como la quinurenina y el triptófano.

Después de la preparación de la muestra, los metabolitos de interés, incluida la quinurenina, se separan y cuantifican utilizando HPLC. Para la detección, se emplean diversos sistemas, incluyendo detección por absorbancia UV, fluorescencia, métodos electroquímicos o espectrometría de masas (MS). Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y desventajas en términos de sensibilidad, selectividad y complejidad analítica. Por ejemplo, mientras que la HPLC-UV es atractiva para aplicaciones clínicas por su simplicidad y accesibilidad, su selectividad puede verse comprometida por la presencia de compuestos endógenos en las muestras biológicas; a pesar de ello es el más ampliamente utilizado. En contraste, la MS ofrece una alta sensibilidad y selectividad, permitiendo la identificación precisa de la quinurenina basada en sus masas moleculares únicas. Sin embargo, su implementación puede requerir equipo más especializado y experiencia técnica; además que los métodos reportados hasta el momento requieren de un paso previo de simplificación de las mezclas por HPLC. Evidenciando de esta manera, la necesidad de seguir trabajando en la

estandarización y la inclusión de nuevos métodos para la detección y cuantificación de quinurenina y los metabolitos de esta vía (Sadok et al., 2017).

Espectrometría de masas de ultra alta resolución con resonancia en el ciclotrón FT ICR MS

El espectrómetro de masas por resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR MS) es una técnica avanzada que permite analizar la masa de iones con alta precisión y resolución. Su funcionamiento se basa en la manipulación de iones en un campo magnético uniforme. Cuando los iones cargados se introducen en este campo, se mueven en trayectorias circulares debido a la fuerza de Lorentz. La frecuencia de esta trayectoria, conocida como frecuencia ciclotrónica, depende de la masa y la carga del ion, así como de la intensidad del campo magnético. Para detectar esta frecuencia, los iones son excitados mediante un campo eléctrico de radiofrecuencia resonante, lo que hace que todos los iones de una masa específica se muevan de manera coherente. Esta coherencia espacial permite que la señal de los iones sea detectada como una corriente inducida en electrodos opuestos. La señal detectada en el dominio del tiempo se convierte en un espectro de masas mediante la transformada de Fourier, permitiendo la identificación de los iones presentes en la muestra. La técnica FT-ICR MS destaca por su alta resolución y precisión en la medición de masas, lo que la hace especialmente útil en la identificación de compuestos complejos. Además, la posibilidad de resolver mezclas sin la necesidad de un paso previo de separación del analito de interés (Marshall et al., 1998)

Antecedentes directos:

Según los resultados obtenidos por Orama en el 2023: la administración única de 20 mg/kg 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 observó un aumento considerable de los niveles de Zn. Este aumento no se esperaba y no se encontró algo al respecto en la literatura.

La inyección de quinurenina no afectó la concentración de zinc de manera significativa en el páncreas (fig. 3B), los eritrocitos (fig. 3F), el músculo (fig. 3G) y la grasa (fig. 3H) en ninguno de los tiempos evaluados. En el caso del fémur (fig. 3C) 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. 3D) 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. 3E) tenemos que la quinurenina provocó un aumento a las 4 horas en la concentración de Zn, en este órgano también se observa un aumento de la concentración de Zn, 24 horas después de la inyección de PBS (Orama, 2023).

Zn

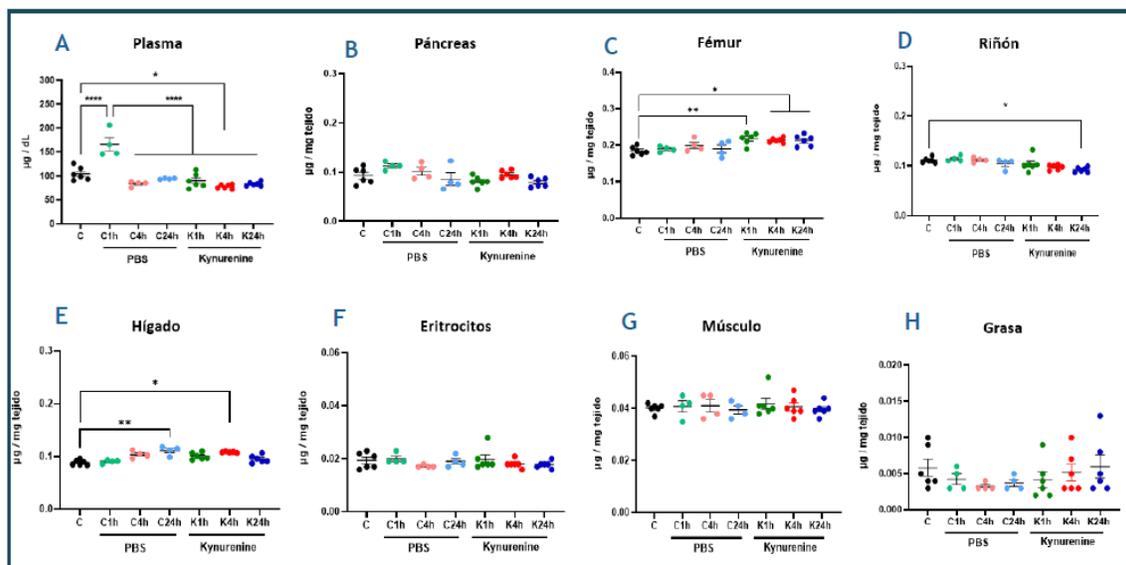


Figura 3. Concentración de Zn en los diferentes tejidos analizados. C: grupo control sin inyección; C1h, C4h y C24h: grupos inyectados con PBS y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente; K1h, K4h, K24h: grupos inyectados con quinurenina y sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección, respectivamente. Tomado de Orama, 2023.

Efecto del estrés en los animales de laboratorio

Dado los novedosos resultados obtenidos por Orama, 2023, en el cual reporta que una inyección del vehículo PBS provoca un aumento en los niveles de zinc

plasmáticos. A raíz, se propuso revisar la literatura acerca de los efectos que tienen los procedimientos utilizados frecuentemente en investigación con ratones de laboratorio. Un estudio comparó prácticas comunes, evaluando su impacto en el bienestar animal mediante parámetros de estrés fisiológico y conductual, incluyendo niveles de corticosterona, como parámetro indicador de estrés. Se encontró que el muestreo de la vena facial y el seno retrobulbar causaba mayores incrementos en los niveles de corticosterona plasmática y fecal, estos hallazgos contribuyen a la hipótesis de que en tratamientos en los que el animal es punzado por una aguja, este estímulo aversivo provoca un aumento en sus niveles de estrés (Meyer et al. 2020).

Problema: Se desconoce cómo el organismo detecta la disponibilidad sistémica del zinc para regular su absorción, su almacenamiento y su excreción.

Hipótesis: Un aumento de la quinurenina plasmática (exógena o endógena) provoca una disminución del zinc en la circulación sanguínea y favorece su almacenamiento en los tejidos del ratón.

Objetivo general: Evaluar el papel de la quinurenina (tanto exógena, como endógena) en la regulación de los niveles sistémicos de zinc en el ratón.

Objetivos específicos:

- Establecer el método de cuantificación de quinurenina mediante FTICR MS.
- Evaluar si la inyección de quinurenina regula los niveles de Zn sistémico en el ratón.
- Medir quinurenina en el plasma mediante ELISA.

Materiales y Métodos

Animales y condiciones experimentales

Se emplearon ratones macho de la cepa C57BL/6, de 8 semanas, alojados en jaulas de acrílico y con acceso libre al agua y al alimento. Estos animales se mantuvieron

en un entorno con condiciones controladas de temperatura (23 °C) y humedad (50 %), con ciclos regulares 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⁻¹, 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. Los grupos experimentales son:

- C (*naive*): grupo control experimental que no recibió ninguna inyección (n = 5).
- C inyección-1h: grupo que solo se inyectó, sin vehículo y se sacrificó una hora después, para distinguir entre el proceso de inyección y cualquier actividad del vehículo inyectado (n = 5).
- PBS-1h: grupo experimental que se inyectó con PBS y se sacrificó 1 hora después de la inyección (n = 4).
- PBS-4h: grupo experimental que se inyectó con PBS y se sacrificó 4 horas después de la inyección (n = 4).
- PBS-24h: grupo experimental que se inyectó con PBS y se sacrificó 24 horas después de la inyección (n = 3).
- Kyn-1h: grupo experimental que se inyectó con quinurenina y se sacrificó 1 hora después de la inyección (n = 3).
- Kyn-4h: grupo experimental que se inyectó con quinurenina y se sacrificó 4 horas después de la inyección (n = 4).
- Kyn-24h: grupo experimental que se inyectó con quinurenina y se sacrificó 24 horas después de la inyección (n = 3).

Cuantificación de los metales ICP-OES

La cuantificación de los niveles de metales se realizó en los animales de cada grupo experimental después de su respectivo tratamiento. Para ello, los animales fueron anestesiados con isoflurano (nivel de oxígeno = 2 unidades, nivel de isoflurano para inducción = 3 unidades y 1.5 unidades para mantenimiento) y sacrificados mediante punción cardíaca. Se extrajeron diferentes tejidos/órganos de cada animal, incluyendo hígado, riñón, fémur y músculo. La sangre fue centrifugada (2000 gs, 40°C, 15 min) para obtener plasma y eritrocitos por separado.

El hígado, riñón, fémur y músculo se liofilizaron durante 48 horas. Posteriormente, se tomaron tres muestras de cada tejido de cada animal, las cuales se pesaron y 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 llevó a cabo en el sistema de digestión de microondas MARS 6 CEM a 200 °C durante 15 minutos. Las muestras digeridas se aforaron a 5 mL con agua miliQ.

En el caso del plasma, se tomaron tres alícuotas de 20 µL de cada animal de cada grupo, a las cuales se les añadió 200 µL de ácido nítrico Fluka Trace al 65%. La digestión se realizó en un horno a 66 °C durante 24 horas, y luego se les adicionó 800 µL de agua miliQ a las muestras digeridas.

Aunque el zinc fue el metal de interés principal, se analizaron otros elementos (K, Ca, Mg, Fe, Cu y Zn) para evaluar la especificidad de cualquier efecto en el zinc. La concentración de estos metales se determinó por triplicado en cada muestra utilizando espectroscopía de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) con el equipo Optima 8300 (PerkinElmer). Se calcularon promedios y desviaciones estándar para cada muestra obtenida.

Protocolo de ELISA para la determinación de Quinurenina en plasma de ratones

Para la recolección de plasma, se utilizó Heparina como anticoagulante. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 2000xg a una temperatura de 4°C dentro de los 30 minutos posteriores a la recolección. Se recolectó el sobrenadante y se realizó el ensayo inmediatamente, evitando hemólisis y muestras con alto

contenido de colesterol. Todos los reactivos, muestras y estándares se prepararon según las instrucciones indicadas. El protocolo del ensayo comenzó con el lavado de la placa dos veces con Solución de Lavado 1X antes de agregar los estándares, muestras y controles en los pocillos correspondientes. Se añadieron 50 µl de cada estándar o muestra en los pocillos apropiados y, de inmediato, se agregaron 50 µl de la Solución de Trabajo de Anticuerpo Biotinilado en cada pocillo. La placa se cubrió con el sellador proporcionado y se golpeó suavemente para asegurar una mezcla completa, incubando durante 45 minutos a 37°C. Después de esto, se descartó la solución y se lavó tres veces con Solución de Lavado 1X, llenando cada pocillo con 350 µl de Buffer de Lavado utilizando una pipeta multicanal o lavador automático. Se dejó en remojo durante 1-2 minutos, retirando luego todo el líquido residual de los pocillos por aspiración. Tras el último lavado, se retiró cualquier Buffer de Lavado restante por aspiración o decantación, golpeando la placa sobre papel absorbente u otros materiales absorbentes. Luego, se añadieron 0.1 ml de la solución de trabajo SABC (HRP-Streptavidin Conjugate dilution buffer) en cada pocillo, se cubrió la placa e incubó a 37°C durante 30 minutos. Se descartó la solución y se lavó cinco veces con Solución de Lavado 1X como en el paso anterior. Posteriormente, se añadieron 90 µl de sustrato TMB en cada pocillo, se cubrió la placa e incubó a 37°C en la oscuridad durante 15-30 minutos, observando tonalidades de azul en los primeros 3-4 pocillos al final de la incubación. Finalmente, se añadieron 50 µl de Solución de Parada a cada pocillo y se leyó el resultado a 450 nm dentro de los 20 minutos siguientes.

Resultados

Cuantificación de quinurenina por espectrometría de masas FTICR MS

Para cuantificar la quinurenina, se evaluó la sensibilidad del equipo para detectar la molécula de interés. Las muestras se analizaron mediante espectrometría de masas en un FT ICR-MS Solarix Bruker. Los resultados de la cuantificación fueron procesados con el software MetaboScape de Bruker. Primero, se realizaron diluciones seriadas de quinurenina en metanol para identificar el límite de detección,

la cual determinó que el nivel de detección más bajo sin realizar ningún tratamiento a la muestra es de 0.125 ppm, equivalente a 0.6 μM (Figura 4). Este nivel de detección es similar a lo que normalmente se encuentra en el plasma, en el orden de los μM (de Jong et al., 2009). Por ello, se propone realizar una curva en una matriz similar -en este caso SFB- a la matriz de interés (plasma).

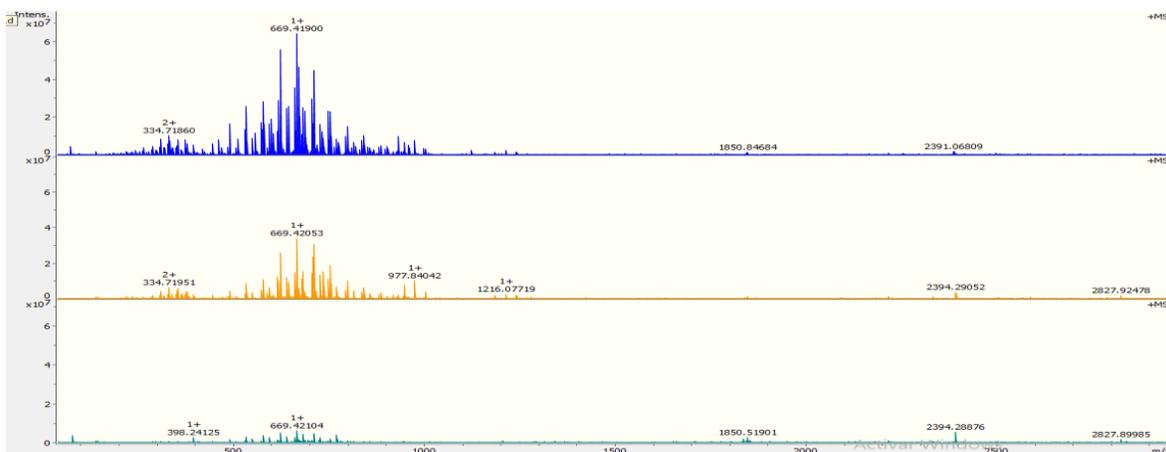


Figura 4: Espectros utilizados para determinar el límite de detección de quinurenina en metanol. En el eje x se muestran la m/z y en el eje y la intensidad del espectro en unidades arbitrarias.

Esta curva en SFB, al cual se le añadieron concentraciones conocidas de quinurenina, mostró que el nivel de detección más bajo sin realizar ningún tratamiento a la muestra es de 1 ppm, equivalente a 4.8 μM (Figura 5). Este nivel de detección no es lo suficientemente sensible para la detección y cuantificación de la quinurenina, que normalmente se encuentra en el plasma en el orden de los 2 μM (de Jong et al., 2009). Por ello, se propone una precipitación proteica para aumentar

el límite de detección de la molécula (Gowda y Raftery, 2014).

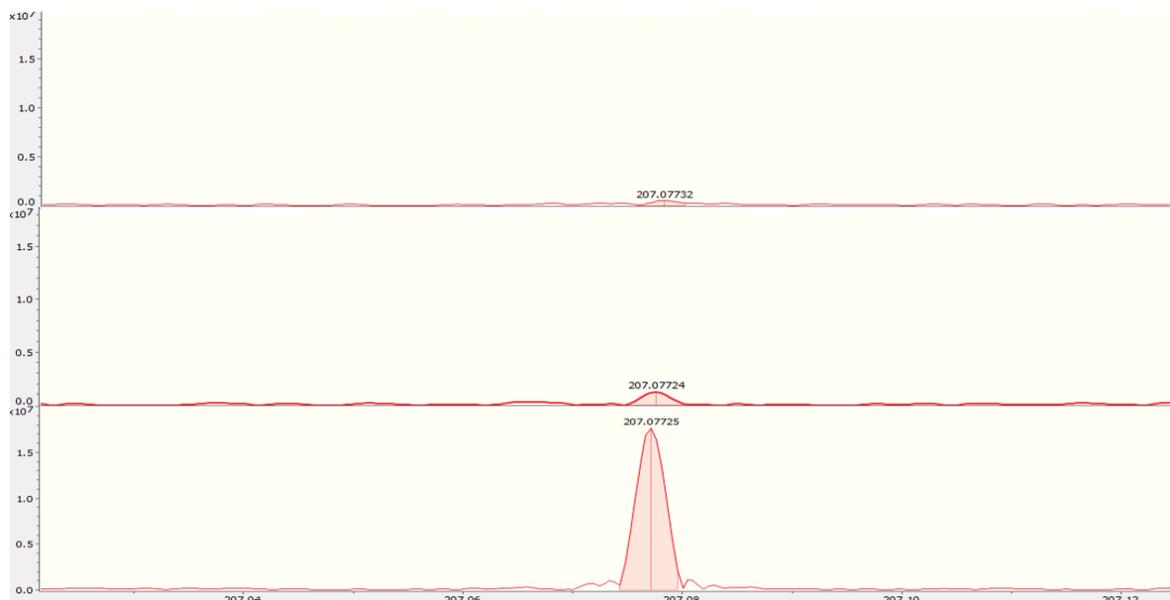


Figura 5: Espectros de SFB donde se observa el aducto M-H. De arriba hacia abajo 1ppm, 10 ppm y 100 ppm. En el eje x se muestran la m/z y en el eje y la intensidad del espectro en unidades arbitrarias.

Con ese propósito, se inicia el proceso realizando una precipitación proteica en una alícuota de 50 μ L de SFB (con concentración de quinurenina añadida conocida) o de plasma (de ratón) añadiendo metanol grado HPLC de Sigma en una proporción de 1:2 al volumen de la muestra de interés. La siguiente etapa consiste en incubar la mezcla a una temperatura de -20 $^{\circ}$ C durante 20 minutos. Posteriormente, se procede a la centrifugación a 11,000 rpm a una temperatura de 4 $^{\circ}$ C durante 30 minutos. Con precaución, se recoge el sobrenadante, evitando la capa de proteínas precipitadas en el fondo del tubo. Al sobrenadante se le añadió 10 μ L de ácido fórmico al 88 % para favorecer el aducto M+H, luego se analizó por espectrometría de masas en un FT ICR-MS Solarix Bruker. Los resultados de la cuantificación fueron procesados con el software MetaboScape de Bruker. En la figura 6 se muestran los espectros que se utilizaron para realizar la curva de quinurenina en SFB, mientras que en la figura 7 se muestra la curva. Como se aprecia, con este protocolo bajó considerablemente el nivel de detección de la quinurenina en SFB (0.1 ppm, equivalente a 0.48 μ M). Sin embargo, con este protocolo no se detectó la quinurenina en los plasmas experimentales, lo que parece indicar que el rango de

concentraciones en los plasmas experimentales está por debajo del límite de detección del instrumento bajo estas condiciones (Figura 8).

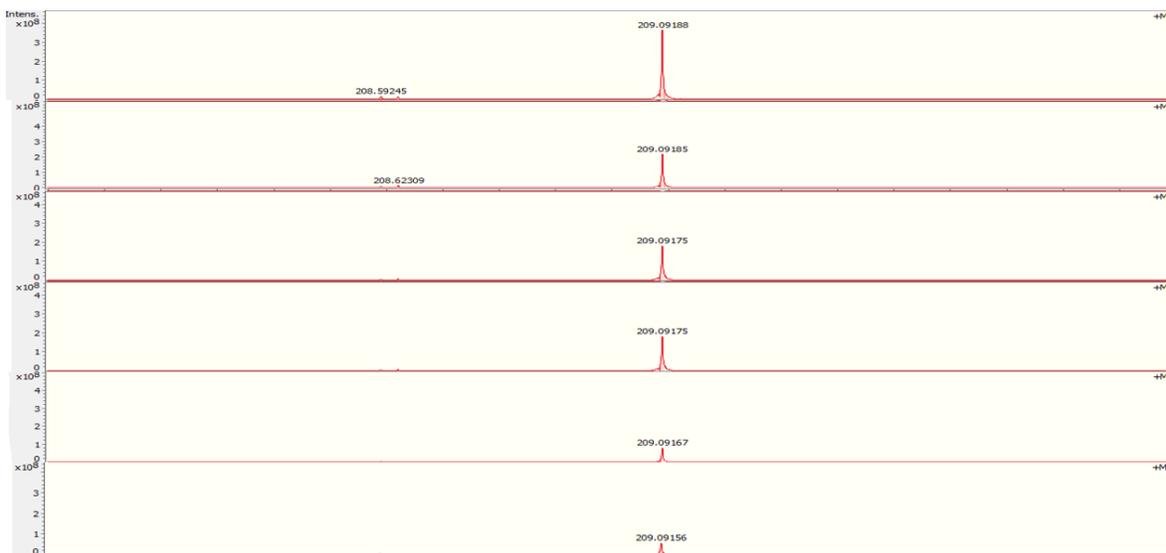


Figura 6: Espectros utilizados para realizar la curva de quinurenicina en SFB precipitado con metanol, se resalta el pico de $m/z= 209.09$, correspondiente al aducto $M+H$. Las concentraciones son de arriba hacia abajo 1ppm, 0.75ppm, 0.6ppm, 0.4ppm, 0.25ppm, 0.1ppm. En el eje x se muestran la m/z y en el eje y la intensidad del espectro en unidades arbitrarias.

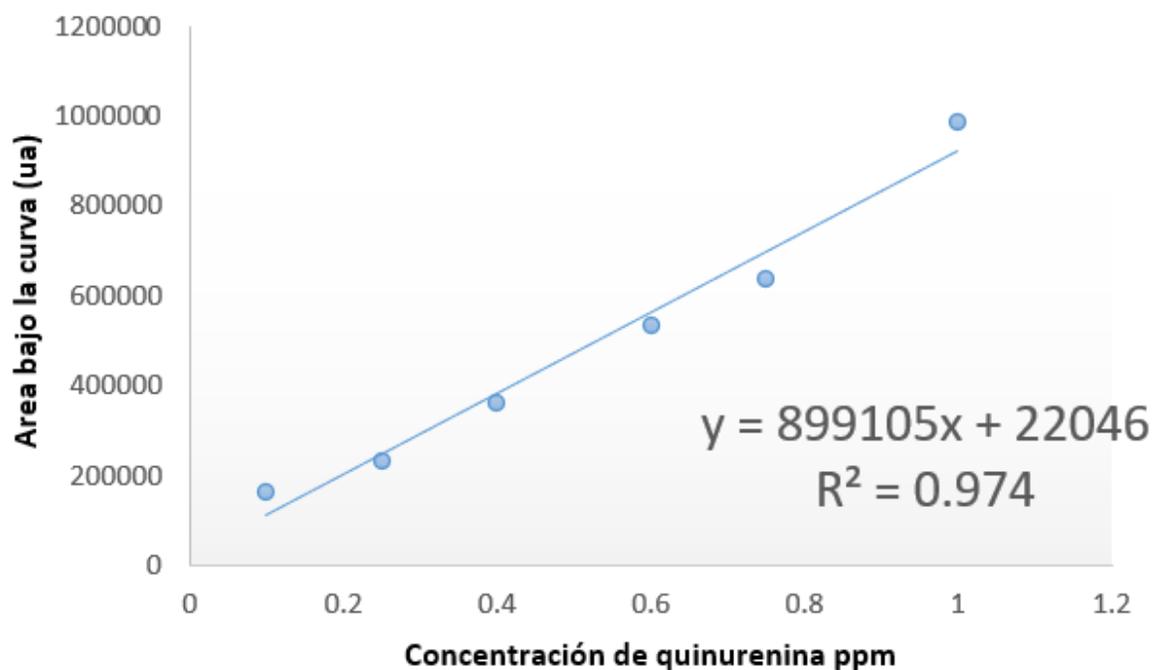


Figura 7: Curva de quinurenicina en SFB precipitado con metanol.

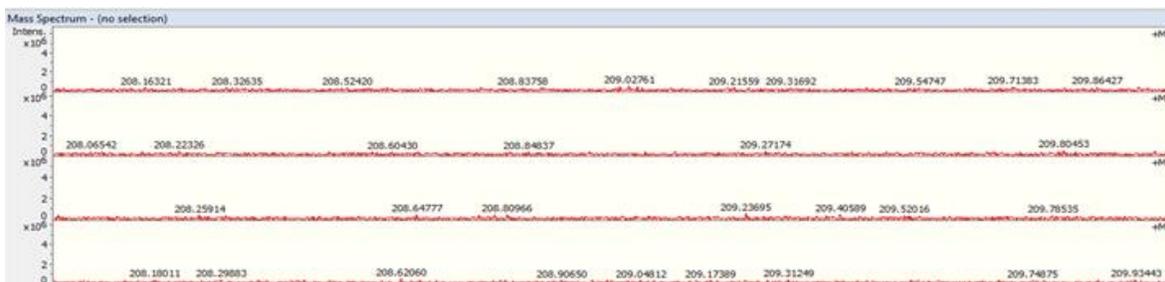


Figura 8: Espectros de plasmas de ratón donde no se puede distinguir a la quinurenina, en el pico M+H $m/z= 209.09$. En el eje x se muestran la m/z y en el eje y la intensidad del espectro en unidades arbitrarias.

Por ello, para 3 muestras de plasmas experimentales se realizó la precipitación proteica y se tomó el sobrenadante, tal y como se describe anteriormente. Luego ese sobrenadante se concentró en atmósfera de nitrógeno a sequedad y se reconstituyó el sólido remanente con 50 μ L de metanol, a este volumen se le añadió una alícuota de 2.5 μ L de ácido fórmico al 88% y se observó que si bien en 1 de los 2 espectros se puede identificar un pico correspondiente al aducto M+H; la intensidad de este no es suficiente como para cuantificar la quinurenina (Figura 9). Cabe destacar que en el pico en el cual no se observó ninguna señal de quinurenina proviene de un plasma control, mientras que en los que se observa señal provienen de plasmas de ratones a los que les fue administrada quinurenina. Esto establece la pauta de que parece estar muy cerca del objetivo propuesto con esta técnica, y que quizás en lugar de partir de un volumen de 50 μ L de plasma, sería más conveniente partir de un volumen mayor de plasma 100 μ L realizando el mismo procedimiento descrito, al partir de un volumen mayor y luego de todo el proceso concentrar de igual manera a 50 μ L, probablemente esto potencie que la señal de la quinurenina sea al menos el doble de intensa, ya que se partiría del doble del volumen inicial del plasma.

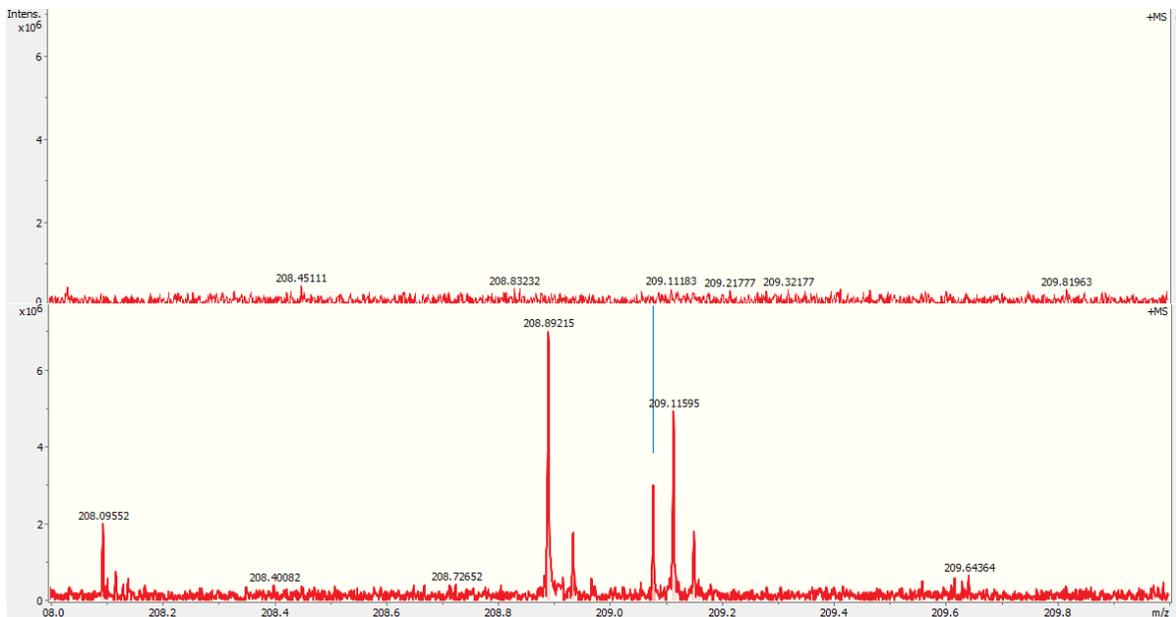


Figura 9: Plasmas experimentales de ratón, precipitados con metanol; posteriormente concentrados en atmósfera de nitrógeno y reconstituidos con 50 uL de metanol y 2.5 uL de ácido fórmico al 88%. La línea azul señala la masa donde se encuentra en el espectro el pico correspondiente al aducto M+H. En el eje x se muestran la m/z y en el eje y la intensidad del espectro en unidades arbitrarias.

Cuantificación de zinc en plasma e hígado

Luego de los distintos tratamientos se obtuvo la siguiente gráfica donde se ven que los niveles de zinc en plasma aumentan significativamente (ANOVA de una vía) para aquellos animales que fueron punzados con una aguja, pero que no les fue administrado ni PBS, ni quinurenina 20 mg/kg. Esto evidencia que la propia punción provocada por la aguja eleva los niveles de zinc plasmáticos, pero no es así cuando el tratamiento incluye la dosis de quinurenina. De esto último se desprende que quizás estos datos respalden la primera hipótesis, dado que según esta; un aumento de la quinurenina plasmática provocaría una remoción de los niveles de zinc y favorecería el almacenamiento en los órganos (Figura 10).

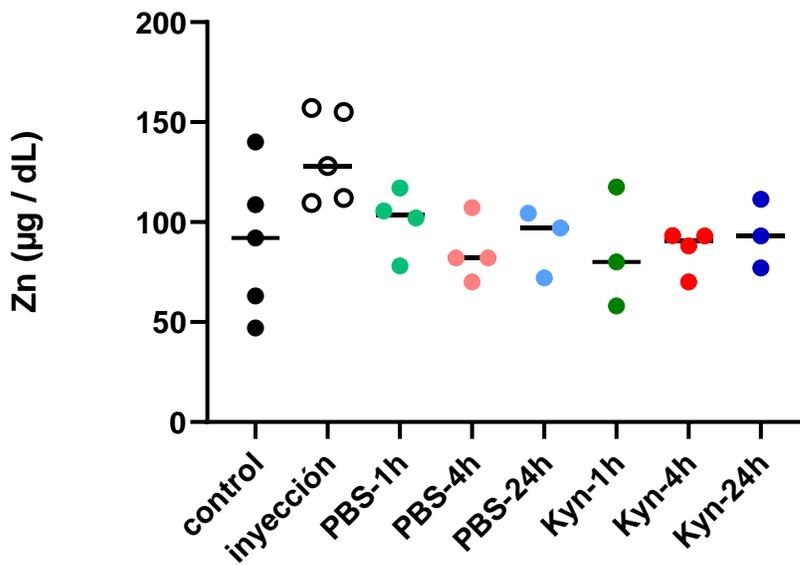


Figura 10: Comparación del contenido de zinc del plasma de ratones ante el tratamiento de quinurenina, vehículo (PBS), inyección (pinchazo).

Por lo anteriormente expuesto y dado que los resultados reportados por Orama, 2023 fueron obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales que los que aquí se reportan; a continuación, se muestra la unión de ambos resultados experimentales (Figura 11). Dado los resultados se reporta que existe diferencia significativa entre el control y la inyección 1h y el PBS 1h. Es importante destacar que no existe diferencia significativa entre el tratamiento inyección 1h y el tratamiento PBS 1h; evidenciando a su vez que los niveles de zinc en estos tratamientos son muy similares. Es importante destacar que este aumento en los grupos inyección 1h y PBS 1h, probablemente producido por el estrés al que se somete el animal ya fue reportado por Orama, 2023; pero en su caso no incluyó el grupo inyección 1h por lo tanto no existía control sobre la administración del tratamiento. También es relevante que el grupo Kyn 1h (ni el resto de los grupos) tuvo una diferencia significativa con respecto al grupo control, en cambio sí con respecto al grupo inyección 1h.

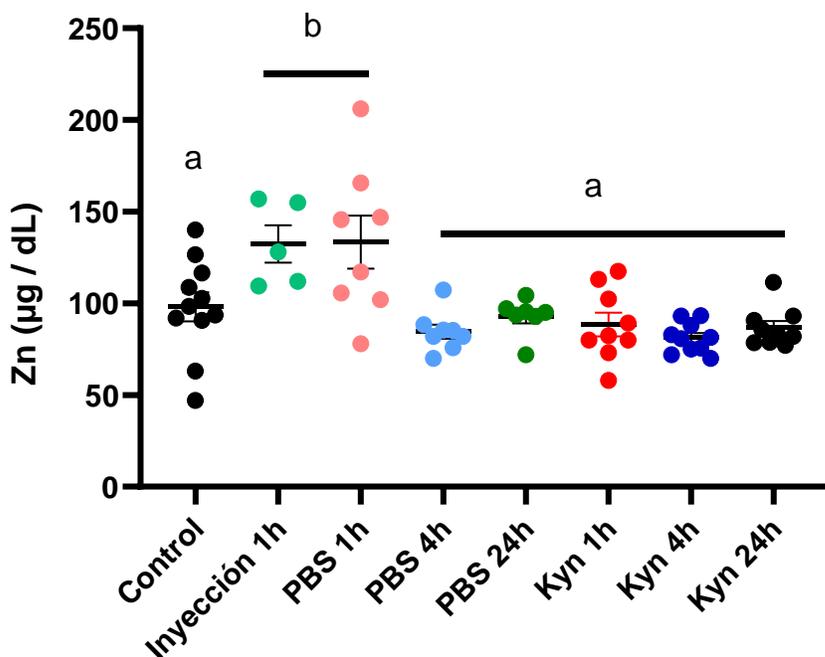


Figura 11: Comparación del contenido de zinc del plasma de ratones ante el tratamiento de quinurenina, vehículo (PBS), inyección (pinchazo). Resultados conjuntos con Orama, 2023. La letra a significa que entre estos grupos no hay diferencias estadísticamente significativa, para un ANOVA de una vía, mientras que la letra b significa que si las hay.

Por otra parte, Orama, 2023 reportó que el hígado pudiera ser el órgano donde ocurre este almacenamiento, se cuantificaron niveles de zinc en hígado. Sin embargo, en este órgano no se evidencia diferencias con respecto al control (estadísticamente significativo) ante ninguno de los tratamientos (Figura 12).

Asimismo, como los resultados reportados por Orama, 2023 fueron obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales que los que aquí se reportan; a continuación, se muestra la unión de ambos resultados experimentales (Figura 13). Según estos datos hay un aumento significativo de los niveles de zinc para los grupos inyección 1h, PBS 24h y quinurenina 1h y 4h.

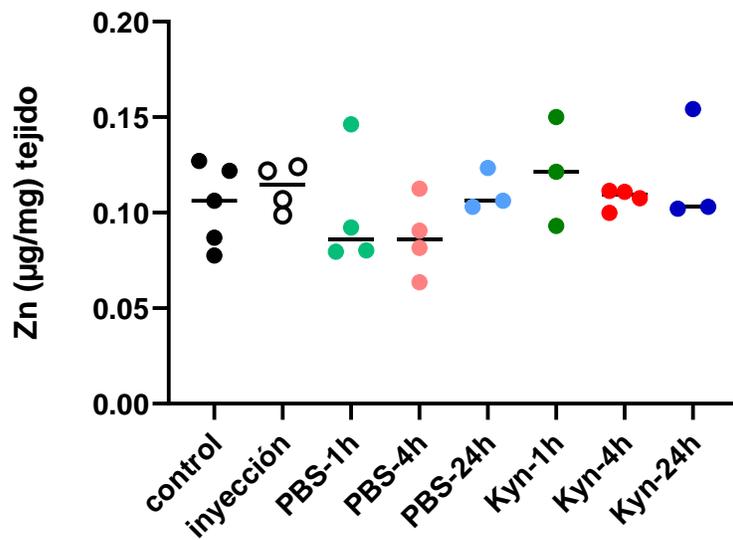


Figura 12: Comparación del contenido de zinc del hígado de ratones ante el tratamiento de quinurenina, vehículo (PBS), inyección (pinchazo).

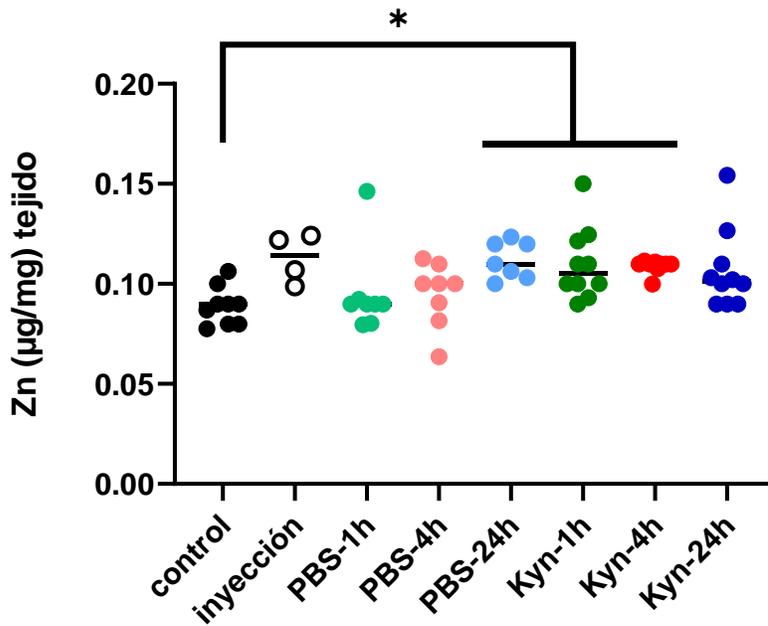


Figura 13: Comparación del contenido de zinc del hígado de ratones ante el tratamiento de quinurenina, vehículo (PBS), inyección (pinchazo). Resultados conjuntos con Orama, 2023.

Cuantificación de quinurenina por ELISA

Por otra parte, para saber si existe una correlación entre los niveles de este metabolito con los niveles de zinc plasmático, resulta importante la cuantificación de quinurenina. Con ese objetivo se obtuvo la siguiente gráfica a partir de un ELISA. Sin embargo, en este experimento no se reporta evidencia significativa (Figura 14).

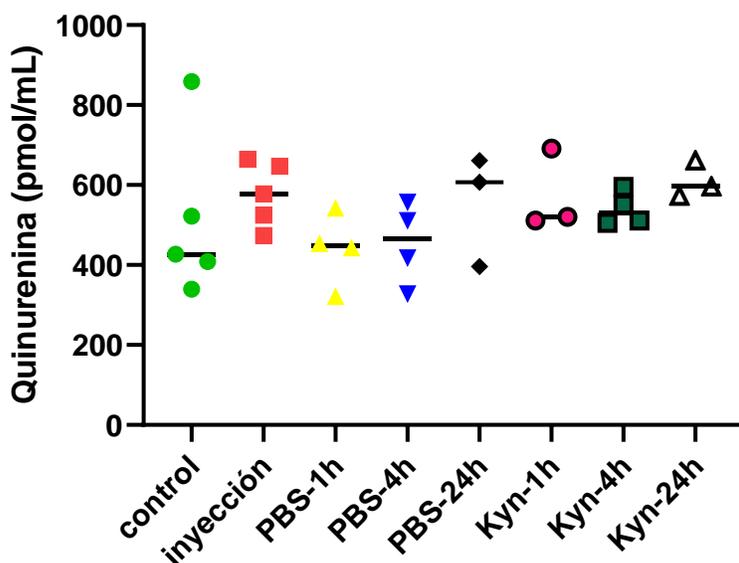


Figura 14: Contenido de quinurenina en plasma de ratones evaluado por ELISA.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se muestra la necesidad de estandarizar la técnica para la detección de quinurenina por FTICR MS. Además, resulta interesante la posibilidad de evaluar los mecanismos endógenos que favorecen la producción de quinurenina y aquellos que están asociados al estrés. Entre ellos resulta interesante evaluar la corticosterona, no solo por ser un marcador de estrés, sino también por estar involucrado como un activador de la enzima TDO, reguladora principal de la vía de las quinureninas (Meyer et al. 2020)(Nakamura et al., 1987).

Discusión

Estandarización del método de cuantificación de quinurenina por FTICR MS

Los resultados obtenidos en la estandarización de la cuantificación de quinurenina por FTICR MS muestran la complejidad de estas técnicas. Además, es notable que existen numerosos trabajos que proponen que el método a seguir debe ser HPLC, sin embargo, en la literatura también se encuentran distintas recomendaciones en cuanto los protocolos a seguir en el tratamiento de las muestras (Badawy y Morgan, 2010)(Atsumi et al, 2016)(Wilhelmina et al.,2009) . Por otra parte, para aumentar la precisión del método, muchos recomiendan la utilización de la espectrometría de masas luego del HPLC. Por ello, un método como el que se propone en el presente trabajo que no precise de un paso previo que involucre HPLC, haría el método más eficiente en cuanto a tiempo y materiales gastados. Si bien no se obtuvieron los resultados deseados por cuestiones de tiempo, el resultado presentado en la Figura 9 establece las pautas para que se considere que la meta de cuantificación de quinurenina en plasma de ratón no está lejos. Finalmente, otra herramienta que ofrece el FTICR MS que es la evaluación del perfil metabolómico de las muestras. Esto se presenta como una herramienta valiosa, que puede contribuir a conocer qué metabolitos se pueden estar afectando ante los distintos tratamientos experimentales y para la cual no se presentaron resultados porque es necesario primero establecer bien el método para luego inyectar plasmas experimentales, dado lo valioso que resulta la obtención de las muestras.

Efecto de la quinurenina en el contenido de zinc en plasma e hígado

Tras los resultados reportados en el plasma tanto en el presente trabajo como los datos conjuntos con Orama, 2023; se evidencia que el estrés del pinchazo tanto para los grupos PBS 1h e inyección 1h provoca un aumento en los niveles de zinc plasmático. Este resultado novedoso para la ciencia implica conocer quizás de dónde proviene este zinc excedente. Al respecto se conoce que ante un estrés intenso (como al que se someten los ratones que son inyectados) la adrenalina y la noradrenalina son las primeras hormonas en liberarse, éstas están involucradas en

los mecanismos de lucha o huida; además los gránulos que contienen estas hormonas se ven electrodensos en microscopía electrónica de transmisión esto puede implicar la presencia de metales como el zinc (Kobashi y Coupland, 1993). Esta idea puede estar respaldada debido a que se ha reportado que el zinc se almacena en vesículas subcelulares junto con hormonas como la insulina en tejido pancreático y en vesículas sinápticas glutamatérgicas en el cerebro (Nicolson et al, 2009)(Frederickson et al, 2005). Sin embargo, los experimentos para evaluar esta teoría quedan como perspectivas a trabajos futuros. Asimismo, también queda pendiente evaluar el estrés al que se someten estos animales cuantificando corticosterona tal y como se plantea en el trabajo de Meyer y colaboradores, 2020. Por otra parte, resulta interesante explorar si la corticosterona es un activador endógeno de la producción de quinurenina, como se sugiere en el trabajo de Nakamura y colaboradores 1967, en el cual se plantea que la dexametasona (una droga esteroidea muy similar a la corticosterona) incrementa la actividad transcripcional de la TDO, enzima principal reguladora de la vía. Pero lo que resulta más interesante es como en el grupo quinurenina 1h no hubo un aumento significativo en los niveles de zinc, es decir que la propia inyección de quinurenina en una dosis de 20 mg/kg es capaz de mantener los niveles de zinc en sus valores normales a pesar del aumento que provoca aquellos tratamientos que se evalúan a la hora que conllevan pinchazo del animal.

También resulta interesante los resultados obtenidos en el contenido de zinc en hígado. Como se aprecia en la figura 13 (datos combinados con los de Orama, 2023) hay un aumento significativo de los niveles de zinc para los grupos PBS 24h y quinurenina 1h y 4h. De estos es importante destacar que los grupos quinurenina 1h y 4h al parecer se favorece el almacenamiento del zinc que se eleva en plasma de manera rápida, mientras que en el caso del PBS se eleva el contenido de zinc a las 24h; evidenciando de esta manera que quizás se favorecen los mecanismos endógenos de producción de quinurenina; por ende, más tardados. Por otra parte, en el grupo inyección 1h también se ve cómo se favorece un almacenamiento temprano de zinc en el hígado; sin embargo, se desconocen qué mecanismos pudieran estar implicados en esta temprana captura del zinc por parte del hígado.

No obstante, resulta muy interesante cómo a pesar de no presentarse diferencias significativas en el ELISA de quinurenina, si se observa que el perfil de comportamiento de esta es directamente proporcional al almacenamiento en hígado; quizás esto ayuda a entender mucho mejor cómo el zinc se comporta fisiológicamente.

Conclusiones

Se requiere más volumen de muestra (plasma) inicial para concluir con la estandarización del método para la cuantificación de quinurenina por FT ICR-MS, además se pudiera usando esta misma herramienta comprobar que otros metabolitos se ven afectados ante los distintos tratamientos. Por otra parte, el estrés del pinchazo producido en la inyección provoca un aumento del zinc plasmático, tal aumento no se produce cuando se administra una dosis de quinurenina de 20 mg/kg. Además, cuando la quinurenina está elevada en plasma se favorece un almacenamiento del zinc en hígado directamente proporcional.

Referencias:

1. Atsumi, M., Mawatari, K., Morooka, A., et al. (2019). Simultaneous determination of kynurenine and kynurenic acid by high-performance liquid chromatography photoirradiation system using a mobile phase containing 18-crown-6. *International Journal of Tryptophan Research*, 12 . 10.1177/1178646919834551.
2. Badawy, A. A-B. (2017). Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. *International Journal of Tryptophan Research*, 10 . 10.1177/1178646917691938.
3. Badawy, A. A-B., & Morgan, C. J. (2010). Rapid isocratic liquid chromatographic separation and quantification of tryptophan and six kynurenine metabolites in biological samples with ultraviolet and fluorimetric detection. *International Journal of Tryptophan Research*, 3 . 10.4137/IJTR.S6225.
4. Barnett, J. P., Blindauer, C. A., Kassar, O., Khazaipoul, S., Martin, E. M., Sadler, P. J., & Stewart, A. J. (2013). Allosteric modulation of zinc speciation by fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(12), 5456-5464.
5. Brown, C. E., & Dyck, R. H. (2002). Rapid, experience-dependent changes in levels of synaptic zinc in primary somatosensory cortex of the adult mouse. *Journal of Neuroscience*, 22(7), 2617-2625.
6. Cousins, R. J., Liuzzi, J. P., & Lichten, L. A. (2006). Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24085-24089.
7. Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., & Rofe, A. M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59, 627-647.
8. de Jong, W. H., Smit, R., Bakker, S. J., de Vries, E. G., & Kema, I. P. (2009). Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877(7), 603-609.
9. Evans, G. (1980). Normal and abnormal zinc absorption in man and animals: the tryptophan connection.
10. de Jong, W. H. A., Smit, R., Bakker, S. J. L., de Vries, E. G. E., & Kema, I. P. (2009). Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line

solid-phase extraction HPLC–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877 (7), 603-609. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.015>.

11. Fraker, P. J., & King, L. E. (2004). Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annu. Rev. Nutr.*, 24, 277-298.
12. Frederickson, C. J. (1989). Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *International review of neurobiology*, 31, 145-238.
13. Frederickson, C. J., & Bush, A. I. (2001). Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects. *Biometals*, 14, 353-366.
14. Frederickson, C. J., Koh, J. Y., & Bush, A. I. (2005). The neurobiology of zinc in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(6), 449-462.
15. Fukada, T., Yamasaki, S., Nishida, K., Murakami, M., & Hirano, T. (2011). Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16, 1123-1134.
16. Gamache, P. H., Meyer, D. F., Granger, M. C., & Acworth, I. N. (2004). Metabolomic applications of electrochemistry/mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(12), 1717-1726.
17. Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M, Mackay JP. Sticky fingers: zinc fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem Sci* 32: 63–70, 2007.
18. Garay, E., Schuth, N., Barbanente, A., Tejada-Guzmán, C., Vitone, D., Osorio, B., ... & Missirlis, F. (2022). Tryptophan regulates Drosophila zinc stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(16), e2117807119.
19. Hambidge, M., & Krebs, N. F. (2001). Interrelationships of key variables of human zinc homeostasis: relevance to dietary zinc requirements. *Annual review of nutrition*, 21(1), 429-452.
20. Han, J., Danell, R. M., Patel, J. R., Gumerov, D. R., Scarlett, C. O., Speir, J. P., ... & Borchers, C. H. (2008). Towards high-throughput metabolomics using ultrahigh-field Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Metabolomics*, 4, 128-140.
21. 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.
22. Huang, T., Song, J., Gao, J., Cheng, J., Xie, H., Zhang, L., ... & Wang, C. Y. (2022). Adipocyte-derived kynurenine promotes obesity and insulin resistance by activating the AhR/STAT3/IL-6 signaling. *Nature Communications*, 13(1), 3489.

23. Huang, L., & Tepasamorndech, S. (2013). The SLC30 family of zinc transporters—a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 548-560.
24. Huber, K. L., & Hardy, J. A. (2012). Mechanism of zinc-mediated inhibition of caspase-9. *Protein Science*, 21(7), 1056-1065.
25. Issell, B. F., Macfadyen, B. V., Gum, E. T., Valdivieso, M., Dudrick, S. J., & Bodey, G. P. (1981). Serum zinc levels in lung cancer patients. *Cancer*, 47(7), 1845-1848.
26. Jackson, M. J. (1989). Physiology of zinc: general aspects. In *Zinc in human biology* (pp. 1-14). London: Springer London.
27. Jeong, J., & Eide, D. J. (2013). The SLC39 family of zinc transporters. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 612-619.
28. Kambe, T. (2012). Molecular architecture and function of ZnT transporters. *Current topics in membranes*, 69, 199-220.
29. 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*.
30. Karanikas, V., Zamanakou, M., Kerenidi, T., Dahabreh, J., Hevas, A., Nakou, M., ... & Germentis, A. E. (2007). Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) expression in lung cancer. *Cancer biology & therapy*, 6(8), 1269-1268.
31. Kim, A. M., Bernhardt, M. L., Kong, B. Y., Ahn, R. W., Vogt, S., Woodruff, T. K., & O'Halloran, T. V. (2011). Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in mammalian eggs. *ACS chemical biology*, 6(7), 716-723.
32. King, J. C., Shames, D. M., & Woodhouse, L. R. (2000). Zinc homeostasis in humans. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1360S-1366S.
33. Krishna, S. S., Majumdar, I., & Grishin, N. V. (2003). Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic acids research*, 31(2), 532-550.
34. Kobayashi, S., & Coupland, R. (1993). Morphological aspects of chromaffin tissue: The differential fixation of adrenaline and noradrenaline. *Journal of Anatomy*, 183 (Pt 2), 223.
35. Kong, B. Y., Duncan, F. E., Que, E. L., Kim, A. M., O'halloran, T. V., & Woodruff, T. (2014). Maternally-derived zinc transporters ZIP6 and ZIP10 drive the mammalian oocyte-to-egg transition. *Molecular human reproduction*, 20(11), 1077-1089.
36. Krebs, N. F. (2013). Update on zinc deficiency and excess in clinical pediatric practice. *Annals of nutrition and metabolism*, 62(Suppl. 1), 19-29.

37. Lansdown, A. B., Mirastschijski, U., Stubbs, N., Scanlon, E., & Ågren, M. S. (2007). Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound repair and regeneration*, *15*(1), 2-16.
38. Li, Y., Hough, C. J., Frederickson, C. J., & Sarvey, J. M. (2001). Induction of mossy fiber→Ca³ long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn²⁺. *Journal of neuroscience*, *21*(20), 8015-8025.
39. Lichten, L. A., & Cousins, R. J. (2009). Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annual review of nutrition*, *29*, 153-176.
40. Maret, W. (2013). Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Advances in nutrition*, *4*(1), 82-91.
41. Marshall, A. G., Hendrickson, C. L., & Jackson, G. S. (1998). Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews*, *17*(1), 1-35.
42. Meyer, N., Kröger, M., Thümmeler, J., Tietze, L., & Palme, R. (2020). Impact of three commonly used blood sampling techniques on the welfare of laboratory mice: Taking the animal's perspective. *PLOS ONE*, *15* (9), e0238895.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238895>.
43. Nagana Gowda, G. A., Gowda, Y. N., & Raftery, D. (2015). Expanding the limits of human blood metabolite quantitation using NMR spectroscopy. *Analytical chemistry*, *87*(1), 706-715.
44. Nakamura, T., Niimi, S., Nawa, K., et al. (n.d.). Multihormonal regulation of transcription of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene in primary cultures of adult rat hepatocytes with special reference to the presence of a transcriptional.
45. Nicolson, T. J., Bellomo, E. A., Wijesekara, N., Loder, M. K., Baldwin, J. M., Gyulkhandanyan, A. V., ... & Rutter, G. A. (2009). Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants. *Diabetes*, *58* (9), 2070-2083.
46. Orama, N. (2023). Efecto de la quinurenina en la regulación del zinc en ratones. Tesis de maestría. CINVESTAV-IPN, Mexico
47. Palmiter, R. D., & Huang, L. (2004). Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflügers Archiv*, *447*, 744-751.
48. Plumb, R., Castro-Perez, J., Granger, J., Beattie, I., Joncour, K., & Wright, A. (2004). Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *18*(19), 2331-2337.
49. Que, E. L., Bleher, R., Duncan, F. E., Kong, B. Y., Gleber, S. C., Vogt, S., ... & O'halloran, T. V. (2015). Quantitative mapping of zinc fluxes in the mammalian egg reveals the origin of fertilization-induced zinc sparks. *Nature chemistry*, *7*(2), 130-139.

50. Reyes, J. G. (1996). Zinc transport in mammalian cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 270(2), C401-C410.
51. Sadok, I., Gamian, A., & Staniszevska, M. M. (2017). Chromatographic analysis of tryptophan metabolites. *Journal of Separation Science*, 40 , 3020-3045. 10.1002/jssc.201700321.
52. Slomianka, L., Danscher, G., & Frederickson, C. J. (1990). Labeling of the neurons of origin of zinc-containing pathways by intraperitoneal injections of sodium selenite. *Neuroscience*, 38(3), 843-854.
53. Smart, T. G., Xie, X., & Krishek, B. J. (1994). Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Progress in neurobiology*, 42(3), 393-441.
54. Suzuki, Y., Suda, T., Furuhashi, K., Suzuki, M., Fujie, M., Hahimoto, D., ... & Chida, K. (2010). Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. *Lung cancer*, 67(3), 361-365.
55. 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.
56. Truong-Tran, A. Q., Ruffin, R. E., & Zalewski, P. D. (2000). Visualization of labile zinc and its role in apoptosis of primary airway epithelial cells and cell lines. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1172-L1183.
57. Vallee, B. L. (1995). The function of metallothionein. *Neurochemistry international*, 27(1), 23-33.
58. Wikoff, W. R., Gangoiti, J. A., Barshop, B. A., & SluzDAK, G. A. R. Y. (2007). Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism. *Clinical chemistry*, 53(12), 2169-2176.
59. Xue, Chen, Ganglei Li, Qiuxian Zheng, Xinyu Gu, Qingmiao Shi, Yuanshuai Su, Qingfei Chu et al. "Tryptophan metabolism in health and disease." *Cell Metabolism* 35, no. 8 (2023): 1304-1326.
60. 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.

