

00524  
140

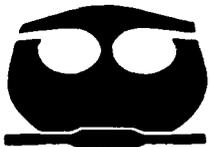


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"EFECTO DEL ZINC EN LA VIABILIDAD Y DIFERENCIACION  
DE CELULAS HUMANAS Y MURINAS"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLÓGICA  
P R E S E N T A :  
ARITZAI POLO JIMENEZ



MEXICO D.F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2003

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**Jurado asignado:**

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| Presidente    | Prof. JOSÉ LUIS DOMÍNGUEZ TORIX.      |
| Vocal         | Prof. SATURNINO DE LEON CHAPA.        |
| Secretario    | Prof. GLORIA VEGA ROBLEDO.            |
| 1er. Suplente | Prof. JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE. |
| 2do. Suplente | Prof. AMALIA GUADALUPE BRAVO LINDORO. |

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Laboratorio de Inmuno-Infectología de la Unidad de Medicina Experimental  
Facultad de Medicina-UNAM.  
Hospital General de México

**Asesor del tema:**

DRA. GLORIA VEGA ROBLEDO

Gloria B Vega

**Supervisor técnico:**

DRA. GUADALUPE RICO ROSILLO

Guadalupe Rico Rosillo

**Sustentante:**

ARITZAI POLO JIMÉNEZ

Aritzai Polo Jiménez

Recepción General de Bibliotecas de la  
Unidad de Medicina Experimental  
de la Facultad de Medicina-UNAM.  
Trabajo recepcional.

Aritzai Polo Jiménez  
10 - Mayo - 2003

Aritzai Polo Jiménez

Recepción General de Bibliotecas de la  
Unidad de Medicina Experimental.  
Trabajo recepcional.

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

B

---

**“Yo le pedí a Dios fuerzas para triunfar;  
y El me dio debilidad, para que aprenda a obedecer con  
humildad.**

**Le pedí la salud para realizar grandes empresas;  
me dio la enfermedad, para que haga cosas mejores.**

**Anhelaba cosas que pudieran alegrar mi vida;  
me dio la vida, para que pudiera gozar de todas las  
cosas.**

**No tengo nada de lo que pedí;  
pero he recibido todo lo que había esperado.**

**Porque sin darme cuenta, mis plegarias han sido  
escuchadas.**

**Yo soy , de entre los hombres, el más rico”.**

**Henry Viscardí**

2

---

*Dios mío, gracias por haberme dado la  
oportunidad de cumplir una de mis más grandes  
metas y la fuerza necesaria para no desfallecer en  
los momentos oscuros de mi vida.*

*"Viviré siempre alegre, para que quien  
me vea no pueda decir nunca, oh Jesús,  
que tu amor no me hizo feliz"*

---

*A mis abuelitos Alberta Correa, Telesforo Jiménez,  
Encarnación de Jesús y Donato Martínez, porque  
se que estarían orgullosos de mí.  
Los AMO.*

- ★ *A mi MAMI porque sin tu eterna dedicación, no hubiera logrado llegar hasta esta etapa. MAMI eres la mujer más grande que he conocido en mi vida. Gracias por ser mi amiga.  
"El amor de una madre es un manantial que jamás se agota".*
  
- ★ *A mi PAPI quien siempre me ha inculcado la lucha constante, la humildad y el respeto a los demás. Chaparrito gracias por tus sabios consejos, "eres la persona que más admiro en este mundo".  
"Papis, los Amo y que Dios siempre los bendiga"*
  
- ★ *A mis hermanas (Eunise y Magda), porque ustedes son parte de este logro. Gracias por estar siempre junto a mí en los momentos más difíciles de mi vida y recuerden que las quiero mucho y que son lo más importante para mí.*
  
- ★ *A mi hermanito Israel, que aunque ya no está aquí siempre lo llevo en mi corazón.*

*A mi angelito, porque tu sacrificio hizo  
posible el que saliera adelante y la  
culminación de este proyecto.  
TE AMO*

---

## **TESTIMONIOS DE GRATITUD**

- \* A mi querida Universidad, por haberme brindado la oportunidad de mi desarrollo profesional y crearme uno de los valores más importantes que un egresado jamás debe olvidar: "Actuar siempre con profesionalismo".
- \* A la doctora Gloria, por hacerme partícipe de este proyecto y haberme dado las herramientas necesarias para el logro del mismo. Gracias por escucharme y por su amistad, siempre podrá contar conmigo.
- \* Al Profesor Raúl Garza, por el apoyo brindado durante mi estancia en la Facultad.
- \* A la Profesora Anita y el Doctor José Luis Domínguez Torix, por haberme despertado a un mundo maravilloso (la Inmunología y Hematología).
- \* A Juan Manuel de la Rosa, Augusto y Alejandro Rosas, porque sin su apoyo no hubiera concluido esta etapa de mi vida. Gracias por su amistad.

*A mis abuelitos Elvira y Miguel, y demás familiares, porque han sido parte importante de mi vida.*

- 
- ★ A Claudia Téllez por su invariable amistad, siempre presente, no importa la distancia.
  - ★ A Norma García, Beatriz Zacateco, Bernardino y Joel por todos los momentos compartidos durante tanto tiempo.
  - ★ A Mary Carmen Velásquez, Olga Silva y Julio Hernández, ya que han sido unos amigos incondicionales, gracias por estar siempre al pendiente de mi.
  - ★ A mis amigas de la facultad (María Luisa Silva, Verónica Juárez, Talía Alcalá, Laura Aniseto, Eva Hernández, Mara Reyes, Monserrat Garibay, Andrea García, Erika Arenas y Nallely López, por todas nuestras alegrías y tristezas compartidas durante tanto tiempo. Siempre las recordare.
  - ★ A Beatriz Elorza y Víctor Álvarez, por haberme apoyado en el momento mas difícil de mi vida. Gracias por todo, nunca lo olvidare.
  - ★ A Miguel Urincho, Oswaldo, Dimas, Sergio Martínez y Luz, porque siempre me han ayudado.
  - ★ A Carlos Guerrero, Mario Nequiz, Carlos Cárdenas, Humberto y Sergio Enríquez por su ayuda, amistad y por hacer más agradable mi estancia en el laboratorio.
  - ★ Guillermo González (Guille), gracias por hacerme parte de tu vida, te admiro y siempre te llevo en mi corazón.
  - ★ A Roberto García, por ser un amigo incondicional y preocuparse por mi. Te quiero mucho.
  - ★ A todos mis demás amigos y compañeros porque cada uno me ha dejado algo bueno que aprender.
  - ★ A mis primos Carlos, Isra, Gaby y Juan, por que los momentos a su lado serán inolvidables.

---

*A Guillermo Ibarra y Macro del Villar ,  
gracias por aceptarme en un equipo  
emprendedor*

- ★ A Hermes López, Leticia Ramírez, Teresa Marco, Manuel Díaz y Sandra San Juan, por haberme dado la oportunidad de desarrollarme profesionalmente y por sus enseñanzas. Gracias por creer en mí.
- ★ A Beatriz Hernández y Sandra Hernández por el apoyo brindado durante más de un año y a la fecha. Gracias por escucharme.
- ★ A Patricia Hernández, Patricia Sánchez y Mario Jiménez, por haber compartido conmigo parte de sus experiencias profesionales y personales.
- ★ A Gisela Vences, Karina Arteaga, Sandra Franco , Alfonso Peña, Axel, Omar y demás amigos de Janssen, por su comprensión, ayuda y porque a su lado he pasado una de las mejores etapas de mi vida.
- ★ A Carlos Ronquillo, Alejandra Rojas, Alberto Zarate, Mario, Gina, Edgar Cervantes, Jaime, Yareli Nuñez, Lety, Eugenia y Daniel, por su amistad y gran apoyo brindado en el inicio de esta nueva etapa de mi vida.



## INDICE

|   |    |
|---|----|
| I. RESUMEN  | 1  |
| II. ANTECEDENTES                                    | 3  |
| 2.1 Hematopoyesis.                                  | 3  |
| • Línea Eritroide                                   | 4  |
| • Línea Megacariocítica.                            | 4  |
| • Leucocitos.                                       | 5  |
| • Línea Mieloide.                                   | 7  |
| ❖ Neutrófilos                                       | 7  |
| ❖ Eosinófilos.                                      | 8  |
| ❖ Basófilos.  | 9  |
| ❖ Monocitos.  | 10 |
| ❖ Macrófagos  | 12 |
| ▪ Características Generales.                        | 12 |
| ▪ Funciones.  | 14 |
| 2.2 Zinc.   | 17 |
| • Generalidades                                     | 17 |
| • Bioquímica  | 18 |
| • Distribución, Absorción, Metabolismo y Excreción. | 19 |
| • Funciones   | 23 |
| • Deficiencia                                       | 25 |
| • Toxicidad   | 27 |
| III. HIPÓTESIS                                      | 29 |



---

|  |    |
|--|----|
| IV. OBJETIVOS                                    | 30 |
| V. MATERIAL Y MÉTODOS                            | 31 |
| 5.1 Reactivos.                                   | 31 |
| 5.2 Desarrollo Experimental.                     | 33 |
| • Obtención y cultivo de las estirpes celulares. | 34 |
| ❖ Células U-937 (premonocítica).                 |    |
| ❖ Monocitos humanos.                             |    |
| ❖ Células de médula ósea.                        |    |
| VI. RESULTADOS                                   | 37 |
| VII. FIGURAS Y GRÁFICAS                          | 44 |
| VIII. DISCUSIÓN                                  | 59 |
| IX. APÉNDICE                                     | 65 |
| • Preparación de reactivos                       | 65 |
| X. BIBLIOGRAFÍA                                  | 67 |



## I. RESUMEN

El zinc es un oligoelemento esencial en la función y mantenimiento del sistema inmune, que además participa en la replicación celular, el crecimiento, la madurez sexual y el metabolismo de la vitamina A en el organismo. Su deficiencia provoca graves alteraciones en humanos, tales como la acrodermatitis enteropática, anemia, trastornos renales, disminución en la respuesta inmune y malformaciones congénitas. En el citoesqueleto, el zinc ejerce un efecto directo sobre los filamentos y sobre la polimerización de la tubulina. El zinc también estabiliza la estructura de muchas proteínas e induce cambios en las membranas celulares y en el ciclo celular. Adicionalmente, se ha sugerido que el metal inhibe competitivamente algunos efectos del calcio, lo que puede deberse en parte, a que las proteínas unidoras de calcio tienen una mayor afinidad por el zinc.

La mayoría de los estudios realizados principalmente en murinos muestran las alteraciones resultantes de la deficiencia de zinc y el estímulo o la protección que induce el metal en algunos cultivos celulares; sin embargo, hay evidencias que demuestran que la suplementación de zinc *in vitro* o *in vivo* puede ocasionar alteraciones en el sistema inmune.

Nuestro estudio tiene como finalidad el establecer cual es la influencia del zinc en la maduración y la viabilidad de diferentes líneas celulares (U-937, monocitos humanos y macrófagos de médula ósea de ratón), así como el efecto que un estímulo idéntico (proporcionado por el zinc) puede generar en una misma estirpe celular, pero de origen diferente.

Los monocitos se obtuvieron de sangre venosa proveniente de individuos sanos por el método de Bóyum. Las células de médula ósea se obtuvieron del fémur de



## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad y las células U-937 de alicuotas mantenidas en cultivo.

Se colocaron  $5 \times 10^5$  cel/pozo en microplacas estériles de poliestireno, se adicionó el medio requerido para cada estirpe en ausencia de o con el factor estimulante requerido para su diferenciación (sobrenadante de células L-929 con el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos para las células de médula ósea de ratón, y acetato phorbol miristato para los monocitos humanos y células U-937), sin zinc o con diferentes dosis del metal (0.05-1.0mM). Permanecieron en cultivo 11 días a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizaron observaciones microscópicas los días tres, seis, nueve y once, para el análisis morfológico y de diferenciación celular; la viabilidad y el recuento total de células se determinaron los días seis y once.

La viabilidad de las células de médula ósea de ratón, fagocitos mononucleares y células U-937 (premonocítica) incubadas con 0.05 y 0.1mM de zinc fue similar a la de los controles sin zinc (90%): Con 1.0mM del metal, la viabilidad disminuyó considerablemente ( $p < 0.0006$ ), 50% en células de médula ósea de ratón y fagocitos mononucleares humanos, 80% en células U-937. El número de células aumentó y no hubo diferenciación celular ya que las características morfológicas observadas al inicio del cultivo (células pequeñas y redondas) no se modificaron durante el lapso señalado (11 días). El efecto deletéreo inducido con esta dosis de zinc, se observó en la tres estirpes celulares.

Las variaciones en el número, el tamaño, la morfología y la viabilidad de las células observadas con las diferentes concentraciones del metal, y/o con las mismas dosis a diferentes tiempos sugieren que el efecto ejercido por del zinc dependen no solo de la dosis utilizada sino del periodo de su interacción con las células.



## II. ANTECEDENTES

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 2.1 HEMATOPOYESIS

El proceso mediante el cual las células sanguíneas crecen, se dividen y diferencian en la médula ósea se llama hematopoyesis. Las células que participan en la respuesta inmunitaria proceden de las células madre hematopoyéticas no diferenciadas (CMH), a partir de ésta se originan 4 estirpes celulares diferentes: 1) Eritroide (eritrocitos), éstos también llamados glóbulos rojos, tienen como función el transportar oxígeno; 2) Megacariocítica (plaquetas), cuya función principal es el control de la hemorragia; 3) Leucocitos: a) linfoide (linfocitos) y b) mieloide (granulocitos y fagocitos mononucleares) y (Roitt Ivan, 1997).

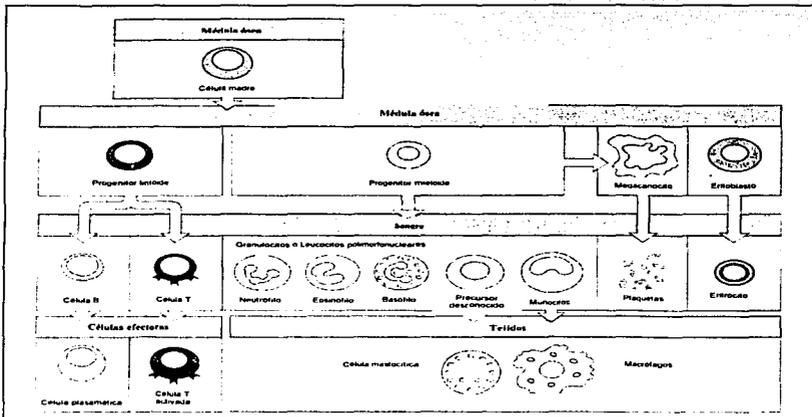


Figura 2.1 Hematopoyesis.

Fuente: Janney, Charles A. et al; Immune Biology, 4 ed., New York, 1999; p. 31.



### 1). Línea Eritroide

Son las células sanguíneas que contienen hemoglobina. Esta molécula es una proteína con átomos de hierro que le otorgan el color rojo a la sangre (Freggiaro E., 2002). Se tiñe en rosa o anaranjado con el colorante de Wrigth a causa de su elevado contenido de la proteína acidófila, hemoglobina. La célula ha perdido sus mitocondrias, RNA residuales y también algunas enzimas importantes, por lo que los eritrocitos son incapaces de sintetizar proteínas o lípidos nuevos. Su vida media normal es de 100 a 120 días (McKenzie S., 1991).

### 2). Línea Megacariocítica

Las plaquetas son células producidas en la médula ósea mediante el proceso de fragmentación citoplásmica (Pulsomed, 2002), proceden de los megacariocitos y se caracterizan por ser elementos finales sin núcleo, carecen de capacidad de división y poseen en su interior gran cantidad de substancias que se producen en los propios megacariocitos (factor plaquetario IV) o que adquieren en el plasma (serotonina), circulan por la sangre y tienen un papel muy importante en la coagulación, son no nucleadas y miden de 2 a 4 $\mu$ , son poco densas y flotan en el plasma, son extremadamente frágiles y se adhieren muy fácilmente a otros cuerpos cercanos (linfocitos, eritrocitos, etc.), o se aglutinan entre ellas formando coágulos y obstruyendo pequeños vasos, lo cual es muy importante en las heridas. La mitad de las plaquetas que se producen circulan, mientras que la otra mitad se encuentra en el interior del bazo, durante siete días las plaquetas permanecen en el torrente circulatorio y si no se destruyen en los lugares donde actúan, se mueren por apoptosis (Casals F., 1996).



La activación de las plaquetas es el resultado de una cascada de señales de transducción mediada por varios estímulos (Chou T., 2000), entre los que se encuentran las reacciones mediadas por inmunoglobulinas (Orchard M., 1986).

### 3). Leucocitos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

|            |   |                                   |   |                    |
|------------|---|-----------------------------------|---|--------------------|
| Leucocitos | { | Granulocitos o Polimorfonucleares | { | Neutrófilos 60-70% |
|            |   |                                   | { | Eosinófilos 3-5%   |
|            |   |                                   | { | Basófilos 0-2%     |
|            |   | Agranulocitos o Mononucleares     | { | Linfocitos 30%     |
|            |   |                                   | { | Monocitos 7%       |

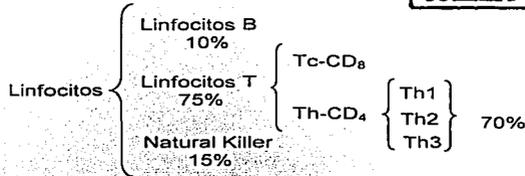
#### a) Linfoide

La línea linfoide de la que se derivan los diferentes tipos de linfocitos, responsables de llevar a cabo las principales funciones que caracterizan al sistema inmune y que le permiten reaccionar inmediatamente y a futuro (memoria) frente a moléculas extrañas, de forma específica. Los linfocitos son células esféricas o ligeramente ovoides con un diámetro de 8 a 12 $\mu$ . El núcleo ocupa 90% de la célula. El citoplasma es muy delgado y se tiñe de color azul claro formando un anillo alrededor del núcleo (Freggiaro E., 2002), que es rico en RNA, por lo que se tiñe más (azul oscuro).



Los linfocitos se dividen en:

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Los linfocitos B maduran en el hígado durante la vida fetal y en la médula ósea (MO) en los adultos. Ante un estímulo antigénico se diferencia a célula plasmática y producen anticuerpos (Ig). La mayoría de las células B humanas circulantes expresan dos isotipos en su membrana plasmática: IgM e IgD.

La mayoría de los precursores de los linfocitos T (LT) se originan en la MO y de ahí pasan al timo donde maduran, estas células tienen un receptor de membrana (TCR), de estructura similar a las inmunoglobulinas, mediante el cual son capaces de identificar al antígeno en forma específica.

Los linfocitos T citotóxicos (LTc) son portadores de la molécula CD<sub>8</sub> en su membrana plasmática por lo que detectan los péptidos presentados por moléculas MHC I, su función es lisa a las células que presentan antígenos extraños.

Los linfocitos T cooperadores (Th, helper) expresan las moléculas CD<sub>4</sub>, éstos reconocen a los péptidos cuando están unidos a moléculas MHC II, su función es la de ayudar a que tanto los LTc como las células B y los fagocitos funcionen correctamente.



### Natural killer (NK)

Son linfocitos con actividad citotóxica, a diferencia de los LTc estas células no expresan TCR, ni ningún receptor de tipo de las inmunoglobulinas, las células NK no necesitan las moléculas MHC para que los antígenos le sean presentados. Estas células también son capaces de lisar otras células (células tumorales, infectadas con virus, etc.) que por alguna razón han perdido su capacidad de expresar moléculas MHC I en su superficie (Allen J., 1983).

### ***b). Mieloide***

Las células maduras de la línea Mieloide son células con un núcleo relativamente largo alrededor del citoplasma con gránulos en su interior; en sangre hay de 6000 a 9000 por mililitro cúbico.

### Neutrófilos

Es la población celular principal en la respuesta inflamatoria aguda, y posee receptores para anticuerpos IgG y proteínas del complemento (Abbas A., 1999). Tienen una vida corta a comparación de las células mononucleares (6 a 10h) y pueden morir por apoptosis (Pietarinen P., 2000). Según la forma de su núcleo se les puede clasificar como neutrófilos en banda (formas jóvenes) y neutrófilos segmentados. Presentan divisiones de sus núcleos en un número que va de 3 a 5.

Los neutrófilos son células móviles que pueden ingerir y matar microorganismos invasores, utilizando componentes reactivos de oxígeno y proteínas microbicidas que almacenan en sus gránulos (Roitt I., 1992). Los gránulos se diferencian por su estructura y contenido enzimático: los primarios que son ricos en mieloperoxidasa (catalizadora del peróxido de hidrógeno), hidrolasas ácidas (lisozima y enzimas proteolíticas) o proteasas (colagenasa, elastasa y catepsina G). Los secundarios contienen lactoferrina (elemento básico quelante del hierro), fosfatasa ácida y alcalina, glucuronidasa y nucleasas (Cabello G., 1999).



Figura 2.2 Neutrófilos segmentados



Figura 2.2 Neutrófilos en banda

Fuente: Células inmunitarias: leucocitos. <http://moral.uv.es/semarguz/leucocitos/leucocitos.html>

### Eosinófilos

Tienen una vida de aproximadamente 13h en la sangre (Roitt I., 1992) y sólo presentan un tipo de gránulos citoplásmicos (McKenzi S., 1991), brillantes, de color rosado a rojizo y ricos en proteínas catiónicas que tienen acción citotóxica contra algunos parásitos. También poseen elementos antihistamínicos (histaminasa) y antiinflamatorios como catalasa que inactiva al peróxido de hidrógeno (Cabello G., 1999), por lo que aumentan cuando hay una reacción alérgica o en parasitosis, expresando receptores para anticuerpos IgE (Abbas A., 1999).

La estimulación de los eosinófilos por receptores que se encuentran en su membrana, inducen la liberación del contenido de sus gránulos, la activación del estallido respiratorio y la liberación asociada de metabolitos de oxígeno (Roitt I., 1992).



**Figura 2.4** Eosinófilos

Fuente: Células inmunitarias: leucocitos. <http://moral.uv.es/semarguz/leucocitos/leucocitos.html>

### Basófilos

Son células que poseen un núcleo en forma de lóbulo o arrifionado (Freggiaro E., 2002). Se encuentran en muy bajo número en la sangre y sus propiedades se han considerado semejantes a las de las células cebadas tisulares (mastocitos). Presentan gránulos citoplásmicos de color azul violeta intenso debido a su contenido en glicosaminoglicanos sulfatados (mucopolisacáridos), también son ricos en heparina, histamina y serotonina (Cabello G., 1999). Participan en la hipersensibilidad inmediata (alergia) y tardía y expresan receptores de alta afinidad para IgE (McKenzi S., 1991). La interacción de los antígenos con las moléculas de IgE unidas a las células, estimulan a los basófilos a secretar las sustancias contenidas en sus gránulos. (Abbas A., 1999).



Figura 2.5 Basófilos

Fuente: Células inmunitarias: leucocitos. <http://moral.uv.es/semarguz/leucocitos/leucocitos.html>

### Monocitos

Se desarrollan de células progenitoras pluripotenciales y formarán el linaje del macrófago tisular al diferenciarse (William E., 1993). La producción de los monocitos es controlada por varios factores de crecimiento como la interleucina 3 (IL-3) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), que estimulan la actividad mitótica de sus precursores. La prostaglandina E (PGE) y los interferones  $\alpha$  y  $\beta$  ( $IF\alpha$  / $\beta$ ) inhiben la división de estas células (Patarroyo M., 1992).

Los monocitos están en circulación durante aproximadamente 60h, posteriormente pasan a los tejidos y se diferencian en macrófagos (Nelson D., 1991), o se almacenan en compartimentos marginados localizados en MO (William P., 1993). Morfológicamente, los monocitos son las células de mayor tamaño en la sangre, con un diámetro de 15-22 $\mu$ m. En el núcleo, la cromatina se dispone a su alrededor y se tiñe de un color azul pálido (Nelson D., 1991). Posee complejo de Golgi, retículo endoplásmico y mitocondrial, así como un número pequeño de gránulos (lisosomas primarios), con peroxidasa, lisozima, proteasas naturales, colagenasa y elastasa). Durante la fase inicial de la inflamación, los promonocitos se dividen rápidamente, con un tiempo de ciclo celular corto



(10.8h) debido a la disminución en el tiempo de la síntesis del DNA pero ambos retornan a condiciones normales en 24h, por lo que aumenta el número de monocitos.

La interacción entre las moléculas de adhesión LFA-1 con ICAM-1 e ICAM-2 o VLA-4 con VCAM-1 promueven la adhesión de monocitos con células endoteliales. Esta interrelación es seguida por la migración de los monocitos sobre la superficie de las células endoteliales, posteriormente estas células pasan entre 2 células endoteliales adyacentes, atraviesan la membrana de los vasos y entran al tejido o cavidad del cuerpo, de esta forma los monocitos se diferencian en macrófagos (Van F., 1992).

Los monocitos son células fagocíticas con gran capacidad bactericida. Ante estímulos de sustancias químicas, siguen a los neutrófilos en las reacciones inflamatorias.

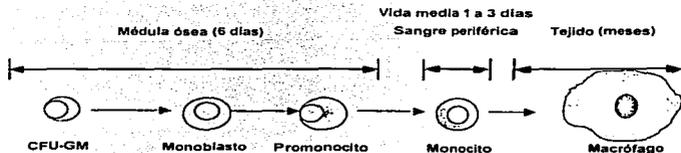


Figura 2.6 Secuencia del desarrollo de las células que comprenden el sistema fagocítico mononuclear.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



---

## Macrófagos

### ❖ *Características generales*

Se describen como células del sistema fagocítico mononuclear. Se originan en la MO que contiene macrófagos residentes, así como sus precursores: monocitos, promonocitos y monoblastos (Grattendick K., 1999).

Los macrófagos son grandes de aproximadamente 25 a 50 $\mu$ m de diámetro y de superficie irregular. Tienen núcleo de forma arrañada y presentan un citoesqueleto conformado por microtúbulos y microfilamentos que rodean al núcleo y se reparten por todo el citosol. En la cara interna de la membrana celular se encuentran filamentos de actina que intervienen en la formación de pseudópodos, en la movilidad celular y en los procesos de endocitosis. El citoplasma presenta un complejo de Golgi bien desarrollado, un número variable de vacuolas y vesículas pinocitarias, mitocondrias grandes y lisosomas asociadas a membranas (Auger M., 1992). Los macrófagos maduros tienen forma alargada, con citoplasma granular.

No todos los macrófagos son iguales, ya que esto depende del tejido en el cual maduren, éstos difieren de acuerdo al tipo y nivel de factores de crecimiento y a la interacción de moléculas de adhesión que son expresadas por las células. Por ejemplo los macrófagos alveolares se encuentran en el pulmón y son excelentes en la fagocitosis y secreción de óxido nítrico; sin embargo existen deficiencias en la presentación antigénica. En contraste, los macrófagos encontrados en el bazo y nódulo linfóide son mejores en la presentación de antígenos. El tiempo de vida del macrófago también depende del tejido en el cual reside. Las células de Kupffer pueden permanecer en el hígado durante meses (Grattendick K., 1999).



### Tipos de Macrófagos

| <i>Tejido de origen</i> | <i>Nombre del macrófago</i> |
|-------------------------|-----------------------------|
| Alvéolos del pulmón     | Macrófago alveolar          |
| Cavidad peritoneal      | Macrófago peritoneal        |
| Higado                  | Células de Kupffer          |
| Tejido óseo             | Osteoclastos                |
| Tejido nervioso         | Células de microglía        |
| Piel                    | Células de Langerhans       |
| Bazo                    | Células dendríticas         |

Macrófagos alveolares: contienen enzimas proteolíticas y constituyen alrededor del 13% de los monocitos en circulación.

Células de Kupffer: están involucradas en la regulación de la respuesta de fase aguda. (Auger M., 1991).

Células dendríticas: expresan altos niveles de proteínas de MHC II e interaccionan especialmente con las células T y B en las áreas linfoides.

Célula de microglía: es crucial en la presentación de antígenos en enfermedades inmunológicas del sistema nervioso.

Osteoclastos: una de sus características son sus multinucleaciones, éstos tienen una función clave en la reabsorción de minerales y componentes orgánicos de la médula (Unanue E., 1993).



# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## ❖ Funciones

Los macrófagos activados pueden ejercer numerosas funciones diferentes:

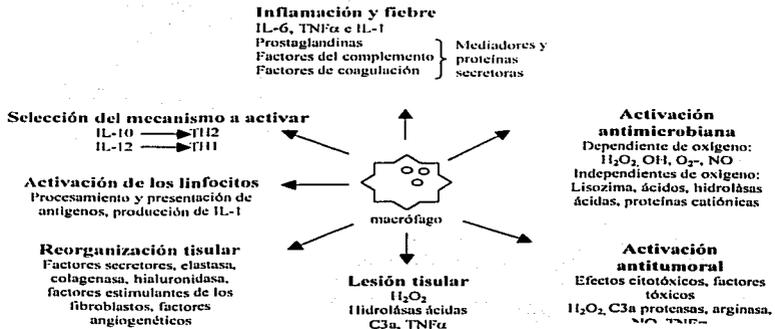


Figura 2.7 Funciones de los macrófagos

Fuente: Roitt, Ivan, et al; Inmunología. 4 ed., Harcourt Brace, 1997; p. 9.8.

Los fagocitos mononucleares intervienen en la inmunidad innata y específica.

## Inmunidad Innata

1. Los macrófagos fagocitan partículas extrañas como microorganismos, macromoléculas, entre ellas antígenos, e incluso tejidos propios que están dañados o muertos. También fagocitan partículas recubiertas por



proteínas del complemento, las cuales pueden ser producidas tanto en la inmunidad innata como en la específica. Las sustancias fagocíticas son degradadas dentro de los macrófagos.

2. Los macrófagos producen citocinas que reclutan a otras células inflamatorias, especialmente neutrófilos y son responsables de muchos de los efectos sistémicos de la inflamación.

### **Inmunidad Específica**

1. Actúan como células presentadoras de antígenos: los macrófagos muestran en su superficie antígenos extraños unidos a moléculas de MHC (complejo principal de histocompatibilidad), para que sean reconocidos por linfocitos T (LT).
2. En la fase efectora de algunas respuestas inmunitarias mediadas por células, los linfocitos T estimulados por el antígeno, secretan citocinas que activan entre otras células a los macrófagos. Estos macrófagos activados son más eficientes en la realización de sus funciones.
3. Los antígenos extraños como los microorganismos pueden ser recubiertos u opsonizados por moléculas de anticuerpos y proteínas del complemento.

**Fagocitosis:** es un mecanismo importante para la remoción de agentes extraños y partículas de células dañadas; la fagocitosis puede involucrar mecanismos inmunológicos y no inmunológicos.

Este proceso puede considerarse en cuatro pasos:

1. Quimiotaxis: es la locomoción de células estimuladas por la presencia de ciertas sustancias (quimioattractantes) en el medio.



- 
2. **Ingestión y Oponización:** la ingestión se inicia con un mecanismo de cierre (cremallera). Las partículas internalizadas van incluidas en un fragmento de la membrana plasmática, que forma una vacuola (fagosoma). Este fagosoma se fusiona con el lisosoma para formar el fagolisosoma en el cual las enzimas lisosomales son descargadas, provocando la destrucción de las partículas ingeridas.
  3. **Digestión o procesamiento de antígenos:** en la fagocitosis se utilizan dos mecanismos para destruir e ingerir a los microorganismos:
    - a). **Dependiente de oxígeno:** implica la generación de anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno, que son tóxicos para los microorganismos.
    - b). **Independientes de oxígeno:** consiste en una disminución del pH dentro del fagosoma, la fusión del fagosoma con los lisosomas y la síntesis de proteínas catiónicas, lactoferrina o lisozima.
  4. **Presentación del antígeno:** los péptidos derivados del antígeno procesado, se unen a la molécula de MHC (complejo principal de histocompatibilidad) y su expresión en la superficie celular, para establecer contacto con la célula T. (Cruse J., 1999)

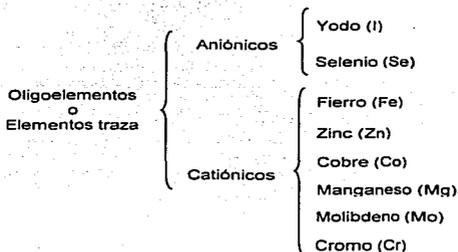


## 2.2 ZINC

### Generalidades

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Conforme avanza la investigación, se tiene una idea más clara de la importancia que tienen algunos micronutrientes en las funciones orgánicas, como los oligoelementos o elementos traza, éstos se dividen en aniónicos y catiónicos. Los primeros se difunden más fácilmente a través de las membranas y se eliminan principalmente por la orina. Los catiónicos se absorben a través de mecanismos de transporte activo y/o de difusión, son químicamente activos por lo que necesitan estar unidos a proteínas para circular en el organismo sin producir daño y se excretan principalmente por las heces (Vega G., 1997).



Los elementos traza constituyen el 0.01% de la masa corporal, tienden a ser reconocidos como participantes en interacciones químicobiológicas, muchos de éstos son constituyentes esenciales en la dieta o componentes potencialmente tóxicos (Da Silva F., 1991), tal es el caso del zinc (Cabañas M., 2000). El zinc es uno de los elementos traza más abundante del cuerpo, es un ion con carga  $2+$ , un ácido fuerte de Lewis (aceptador de electrones), sin una química redox.



---

Muestra un rápido intercambio de ligandos, factor importante para la función catalítica de las metaloenzimas (Kuvilbidila S., 1993).

### Bioquímica

El zinc es un antioxidante, protector de las células contra algún daño efectuado por los radicales de oxígeno, generados durante la activación inmune, también regula la expresión en linfocitos de proteínas metalotionina con actividad antioxidante.

El zinc es un constituyente y cofactor de aproximadamente 300 metaloenzimas, en muchas de éstas, el zinc se encuentra como ión central para la actividad enzimática, por su integración estructural (dedo de zinc) y la modulación que ejerce. Participa en funciones bioquímicas (catalítica, estructural y de regulación) entre las que se involucran a lípidos, proteínas y la síntesis y degradación de ácidos nucleicos (Guy H., 1999). Inhibe además algunas enzimas como la caspasa-3, fructuosa 1,6-bisfosfatasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y transloca a la proteína cinasa C (Lothar R., 2000).

El zinc tiene una alta afinidad por electrones y tiene capacidad de interacción con varias cadenas de aminoácidos.

El zinc influye en los niveles básicos de la replicación y transcripción, esto incluye a la DNA y RNA polimerasa, timidina cinasa y a los reguladores transcripcionales conocidos como dedos de zinc (Prasad S., 1998). Esto sugiere un papel potencial del zinc en la regulación de la diferenciación y proliferación celular, (Bruce N., 1992; Paskis C, 2001). Varios estudios indican el requerimiento del metal en la fase tardía de G1 (Prasad S., 1996) y otros menos definidos en la transcripción de la fase S (Shankar A., 1998).



El zinc está probablemente involucrado en la estimulación de la NADPH oxidasa, que actúa como cofactor de la fosfolipasa A2 y/o fosfolipasa C, también puede estabilizar al ácido araquidónico contra la oxidación y los complejos de hierro (Chandra K., 1991).

### Distribución, Absorción, Metabolismo y Excreción

El zinc está distribuido extensamente en alimentos (Cohen J., 1992) tales como: carne roja, mariscos y aves. Los de origen vegetal tienden a ser pobres en zinc, salvo la porción embrionaria de los cereales, por ejemplo, el germen de trigo. Otras fuentes menores del metal son: habas, remolacha trigo, maíz, coles, lechuga, champiñón, tomate, zanahoria, espinaca, melocotón, naranja, nueces, y productos lácteos (Bloomfield M., 1992). Para sujetos normales la cantidad recomendada es de 12 mg Zn/día para mujeres y para hombres es de 15 mg/día. Los requerimientos nutricionales de zinc son mas altos durante el periodo de crecimiento, el embarazo (15 mg Zn/día) y en la lactancia (19 mg Zn/día). La leche materna contiene zinc en concentraciones hasta 10 veces más altas que en la sangre, además este se encuentra en una forma química que favorece una mayor absorción por el niño (Bloomfield M., 1992).

El zinc es esencial en humanos y está presente en todos los tejidos del cuerpo. El metabolismo del zinc afecta y es afectado por el sistema inmune, nervioso y endócrino (Wastney M., 1991).

El zinc endógeno es movilizado del cuerpo y utilizado durante la síntesis de proteínas en respuesta a daño tisular e infecciones. Durante la inflamación particularmente en la artritis, el zinc es requerido tanto en el tejido dañado como en el hígado. Los corticoesteroides son hormonas que influyen en el control homeostático de ciertos metales como el zinc y el cobre (Guy H., 1999).



---

El zinc se absorbe en el intestino delgado, sobretodo en el duodeno y yeyuno. Los estudios realizados en el hombre sugieren que la mayor tasa de absorción de este metal corresponde al yeyuno (Hardy R., 1991), esta absorción se ve aumentada por factores de la dieta, incluyendo proteínas y algunos aminoácidos (glutamina e histidina) o disminuida por fitatos o etilendiamino tetra acetato, así como por alteraciones intestinales (infección, diarrea, inflamación) (Chesters J., 1991). Disminuye en la circulación por redistribución (estrógenos, stress, infecciones, etc.) y por alteración de moléculas transportadoras como transferrina o albúmina (Vega G., 1997).

Los experimentos realizados para conocer la absorción del zinc, se dirigen al estudio de la captación por el borde en cepillo, de la difusión intracelular, del transporte basolateral y de las fases plasmáticas (corporales): se demuestra que en la absorción del zinc hay un componente mediado (saturable) y un componente no mediado (insaturable), que al parecer dependen de la concentración del elemento (Chesters J., 1991).

La baja temperatura puede también reducir el transporte de zinc por cambios en la membrana biológica. (Bobilya D., 1992). El zinc recién incorporado desde la luz intestinal se une a muchas especies moleculares distintas, de las cuales hay 2 identificadas: metalotioneína (MT) y proteína intestinal rica en cisteína (PIRC). Aunque la asociación de zinc con PIRC es proporcional a la absorción no es probable que intervenga en el movimiento transcelular del mismo. Por el contrario la expresión del gen MT en el intestino es directamente proporcional a la ingesta alimentaria del mismo; así la absorción del zinc disminuye a medida que se eleva la síntesis de MT en respuesta al metal contenido en la circulación.



El cadmio inhibe competitivamente el transporte de zinc dentro de las células endoteliales; el magnesio y el cobre no, pero sí lo hacen dentro de los hepatocitos, se inhibe por el cadmio y el magnesio.

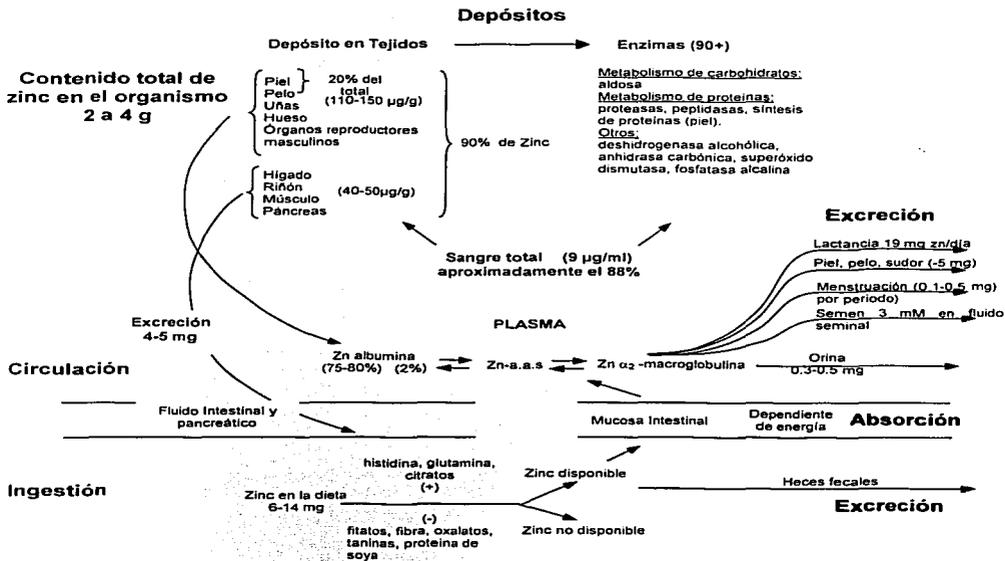
El elevado contenido de zinc de determinados órganos o compartimientos se debe a las localizaciones intracelulares de alta afinidad de captación y a sistemas regulados de transporte de entrada-salida. La química intracelular del zinc implica principalmente su unión a ligandos de tioles e imidazoles, lo que parece constituir un mecanismo importante de regulación de los niveles intracelulares de estos micronutrientes. (Cousins R., 1997). La bilis y la secreción gastroduodenal contribuyen a la secreción del zinc endógeno, pero las secreciones pancreáticas son las más importantes (James C., 2000). En el sudor, el pelo, la piel y la orina, solo se eliminan pequeñas cantidades de zinc (Linder M., 1991); el 90% de la excreción es por heces y varía de acuerdo a la dieta y a los estados de zinc en el individuo (James C., 2000).

El zinc es transportado en el plasma por la unión a proteínas, predominantemente la albúmina y en menor grado a la  $\alpha$ -macroglobulina y transferrina (Vallee, B., 1993).

La cantidad total del zinc en el cuerpo humano es de 2 a 4 g. Más del 90% está localizado en músculo y médula (Meryle E., 1991), así como en el tejido tegumentario (piel, pelo y uñas), en la retina y órganos reproductores masculinos (Linder M., 1991). La concentración en el fluido seminal en humanos y primates está en el rango de 3 mM (Setchell, B., 1988) y alrededor del 88% del zinc circulante está en las células sanguíneas, en donde existe como parte integral de 2 enzimas: la anhidrasa carbónica y la superóxido dismutasa (Meryle E., 1991).



La concentración de zinc en el plasma es de 12-16  $\mu\text{M}$  (Wéllinhausen N., 1996).  
En el adulto mexicano de  $86 \pm 4.5 \mu\text{g/dl}$  (Vega G., 1994).



Modificado de Vallee B.L., The biochemical basis of zinc physiology. Physiology Review, 1993; 73:79-118

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



---

### Funciones

Los efectos más importantes del zinc se observan en el metabolismo y mantenimiento de la piel, páncreas y órganos reproductores del hombre. El zinc es conocido como un elemento traza esencial para el desarrollo testicular y de espermatogénesis; su concentración correlaciona con la densidad celular de espermatozoides y en hombres infértiles, se encuentran bajas concentraciones del metal (Bruce N., 1998).

En el páncreas el zinc está asociado con la secreción abundante de proteasas necesarias para la digestión, además juega un papel importante en la síntesis, almacenamiento y secreción de insulina, así como en la integridad de la molécula. La ingestión o absorción inadecuada de este metal puede causar signos clínicos de diabetes (Cousin R., 1997).

Entre otras propiedades el zinc, actúa como un antioxidante, protegiendo a las células del daño originado por los radicales de oxígeno generados durante la actividad inmune (Shankar A., 1988).

Las enzimas en las cuales abunda más el zinc son la anhidrasa carbónica y la superóxido dismutasa, localizadas en el citosol de la célula y especialmente en eritrocitos. Al asociarse con deshidrogenasa, el zinc juega un papel no sólo en metabolismos intermediarios sino también en la destoxificación alcohólica y en el metabolismo de la vitamina A (Bobilya D., 1992).

Los monocitos captan rápidamente y tienen una concentración intracelular alta de zinc, así como mayor tolerancia a las variaciones extracelulares si se compara con las células T.



La importancia del zinc en la DNA y la RNA polimerasa sugiere un papel potencial de éste en la regulación de la expresión del gen en la diferenciación y proliferación celular (Sherman A., 1992).

La influencia del zinc en el sistema inmune involucra una interacción entre los tres principales mecanismos de defensa: inmunidad celular, inmunidad humoral y fagocitosis. Una de las primeras observaciones concernientes a la inmunobiología del zinc fue su función como mitógeno de linfocitos T. Es fundamental en la función de las células T y en la formación de timulina activa (factor tímico sérico unido a zinc) y puede también actuar directamente en la producción de anticuerpos por las células B (Linder M., 1991).

El zinc es un mediador potente en la resistencia del hospedero a las infecciones, ya que puede actuar como microbicida sobre algunos antígenos patógenos. La baja frecuencia de infecciones en el tracto urinario en el hombre puede ser debido en parte a las altas concentraciones que se encuentran en el semen (Fair W., 1977). También se ha podido observar que el zinc afecta la funcionalidad de las amibas y el desarrollo del absceso hepático en el hamster dorado-Mesocricetus Auratus (Vega G., 1999).

El metal también altera el fluido de lípidos y la función de membrana estabilizándola en muchos casos (Marone G., 1981; Lai Y., 1991).

En el citoesqueleto el zinc ejerce un efecto directo sobre los filamentos (Krishna M., 1980) y sobre la polimerización de la tubulina (Larsson H., 1976; Vega G., manuscrito en preparación). También se ha visto que el metal actúa competitivamente con el calcio e inhibe algunos de sus efectos (Chvapil M., 1976; Vega G., 1999), ésto puede ser debido en parte a que las proteínas unidoras de calcio tienen mayor afinidad por el zinc (Picello E., 1992).



La determinación directa del zinc puede realizarse en el plasma, la orina, el pelo, los eritrocitos y la saliva (Linder M., 1991), pero existen muchos factores que pueden influir en las variables bioquímicas que se correlacionan con el estado real del metal, un ejemplo de lo anterior lo tenemos con la cifra de zinc en plasma y orina que no son indicadores confiables, ya que se afectan entre otras cosas por el stress, infecciones e inflamación (Allan A., 2000). Otros factores dependientes del zinc incluyen a la timidina, fosfatasa alcalina y 5'-ectonucleotidasa los cuales son propuestos para el diagnóstico de la deficiencia del zinc (Meftah S., 1991).

### Deficiencia

La deficiencia de zinc puede ocurrir por la inadecuada ingesta y absorción así como por daño en el riñón o por incremento en la velocidad de eliminación corporal. Estudios en los 50 y 60's revelan que lesiones en la piel y retraso en el crecimiento y desarrollo sexual en el adolescente, podrían deberse a esta deficiencia (Linder M., 1991). El requerimiento del zinc incrementa con el embarazo y una restricción severa en la dieta durante la embriogénesis, causa severas malformaciones congénitas y atrofia tímica (Swanson C., 1987). En la senectud hay deficiencia de zinc y algunas disfunciones inmunológicas como el decremento en la producción del IFN- $\alpha$ , que han podido restaurarse *in vitro* con un suplemento de zinc (Wellinhausen N., 1996).

El zinc disminuye en la circulación y aumenta en el hígado durante la respuesta de fase aguda, que acompaña generalmente a infecciones, traumas o a otras causas de inflamación. Esto no necesariamente se interpretaría como una deficiencia del zinc, sin embargo, refleja una redistribución del zinc que va del suero al hígado, causada por un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias, principalmente IL-1 e IL-6 (Linder M., 1991).



Existen enfermedades que son causadas por una deficiencia nutricional, reabsorción o metabolismo inadecuado del metal, tal es el caso de la acrodermatitis (Neldner K., 1975). En esta enfermedad el número de células T así como la actividad de la timulina y el crecimiento corporal están disminuidos (Linder M., 1991).

En varios estudios en humanos y animales con inflamaciones crónicas, pacientes con anemia, hipogonadismo (Sherman A., 1992) enfermedades autoinmunes y enfermedades por HIV, se ha encontrado una disminución de los niveles de zinc plasmático (Bogden J., 1990). La deficiencia del metal también se asocia con diversos agentes infecciosos, tales como el *Virus de herpes simplex*, *Salmonella enteritidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Tripanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans*, *Fasciola hepática* y *Trichinella spiralis* (Wellinhausen N., 1996).

Shirley y colaboradores, encontraron que la replicación celular, parece estar correlacionada con el efecto del zinc en la nutrición. El bajo aprovechamiento del zinc inducido por quelación reduce la timidina cinasa del RNAm y esta actividad resulta en disminución de la síntesis del DNA, aunque se ha visto que en eucariotes existe una reducción de varias enzimas asociadas con la síntesis del DNA y deficiencia en la fase S (Sherman A., 1992). Esta depleción inducida por quelantes causa también un retraso en G1/S. Existen otras causas que pueden alterar la replicación celular, tal es el caso de los glucocorticoides, los cuales presentan propiedades inmunosupresivas y anti-inflamatorias y ante una disminución de zinc se induce una producción crónica de estos (Shirley C., 2001).

Hay evidencias que señalan que la disminución de las concentraciones de zinc conduce a un daño en el desarrollo inmune y reduce los niveles de la hormona tímica y la timulina (Cunningham S., 1996). Puede inhibir además algunas



funciones de varios tipos celulares tales como plaquetas, células mastocíticas, granulocitos, células NK y macrófagos. En estos últimos se disminuye la fagocitosis, la quimiotáxis y el estallido respiratorio (Keen C., 1990). La falta de este metal también afecta la memoria en la repuesta inmune (Vallee B, 1993). La deficiencia de zinc se asocia con anergia y varios estudios sugieren que este estado afecta a las células T, pero no la función de las células B, como se vió en análisis directos de linfocitos con privación de zinc en ratones. Sin embargo, King demostró en ratas que la deficiencia de zinc crea una disminución en las células B precursoras que se desarrollan en la médula (King L., 2000) y que podría también inducir la apoptosis en el desarrollo temprano de dichas células en la medula ósea (Garvy B., 1993).

La deficiencia de zinc se ha asociado al cáncer esofágico en humanos y ratas. También puede alterar el desarrollo y crecimiento del cerebro (Bruce N., 1998) y se ha asociado a la enfermedad de Alzheimer (Brush N., 1994).

### Toxicidad

Componentes tales como piritionato de zinc (usado como antimicótico capilar) y diethyldithiocarbamato de zinc (usado en la manufactura de hule) ocasionalmente causan alergia. Se ha reportado en varios estudios que la exposición a partículas de zinc metálico en procesos de galvanización y trabajo con soldadura ocasionan problemas de asma (Guy R., 1999). También se observó que la ingestión elevada de zinc en ratas se asociaba con incremento en el colesterol (Cousing R., 1997).

Se han utilizado dosis de zinc para incrementar las funciones de los linfocitos T y del macrófago (Singh K., 1992), pero también se ha visto que altas concentraciones de zinc inhiben la proliferación de células T por un bloqueo en el receptor tipo 1 de la IL-1 asociado con la cinasa (Wellinghausen N., 1997).



Estudios adicionales sugieren que una ingesta elevada del zinc en adultos y niños puede resultar en deficiencia del cobre, anemia, retraso del crecimiento, inmunodepresión, así como efectos adversos en neonatos (Shankar A., 1998).

Chandra R., 1984 demostró en 11 voluntarios a los cuales se les dieron 300 mg de Zn/día durante 6 semanas, Índices bajos en la función inmune (estimulación de linfocitos, migración quimiotáctica e ingestión de bacterias) al compararlos con los valores obtenidos antes de la suplementación.

La falta de zinc afecta la permeabilidad de la membrana del macrófago y la actividad fagocítica (Betteger W., 1993), aunque también se ha observado que una alta concentración del metal *in vivo* afecta las funciones del macrófago inhibiendo la activación, la movilidad y la fagocitosis, así como el consumo de oxígeno por el macrófago (Chavapil M., 1977).

Se ha difundido ampliamente el efecto benéfico o estimulador del zinc y escasamente su toxicidad o efecto deletéreo, lo que ha propiciado su uso indiscriminado no sólo por médicos sino por la población, que lo ingiere sin vigilancia y por la industria alimenticia que lo incluye en un buen número de productos.

Con el objeto de analizar la acción de diferentes dosis de zinc sobre la dinámica celular principalmente y de establecer diferencias entre las estirpes humana y murina, realizamos el presente estudio.



### III. HIPÓTESIS

Si el zinc antagoniza o interfiere con la función del calcio, es probable que altere la polimerización de los integrantes del citoesqueleto, lo que podría modificar la dinámica celular.



## IV. OBJETIVOS

- ❖ Observar el efecto que ejercen diferentes concentraciones de zinc sobre el crecimiento, diferenciación y viabilidad celular.
  
- ❖ Establecer las diferencias que ante un mismo estímulo (zinc) presentan células de la misma estirpe, pero de origen diferente: a) Macrófagos derivados de médula ósea de ratón., b) Monocitos humanos y c) Células premonocítica humana U-937



## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 REACTIVOS

#### Medios de cultivos

- ❖ Medio RPMI-1640.
- ❖ Medio D-MEM (Dulbecco's modificado).
- ❖ Medio de Médula Ósea (DMEM+ Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, GM-CSF).

#### Soluciones y Reactivos

- ❖ Azul tripano.
- ❖ Cloruro de amonio.
- ❖ Ficoll-Hypaque.
- ❖ Gentamicina.
- ❖ Penicilina-estreptomicina.
- ❖ Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA).
- ❖ Solución salina de fosfatos (SSF).

#### Equipo

- ❖ Autoclave.
- ❖ Balanza analítica.
- ❖ Campana de flujo laminar.
- ❖ Centrífuga.
- ❖ Incubadora para cultivos.
- ❖ Microcentrifugá refrigerada.



- ❖ Microscopio óptico.
- ❖ Potenciómetro.
- ❖ Refrigerador

### Material

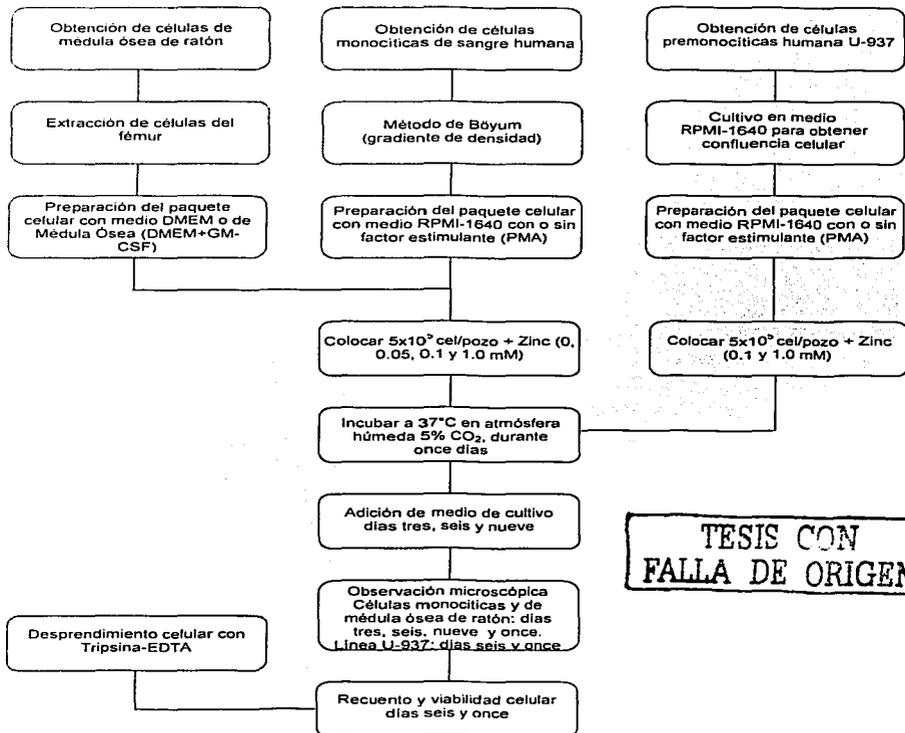
- ❖ Cámara de Neubauer.
- ❖ Estuche de disección.
- ❖ Gradilla para tubos.
- ❖ Matraz erlenmeyer aforado, varios tamaños (Pyrex).
- ❖ Micropipeta de 1000, 100, 10 y 1  $\mu$ l (Costar).
- ❖ Pipetas serológicas de 10 y 5ml (Pyrex).
- ❖ Pipetas Pasteur (Kimble).
- ❖ Puntas para micropipeta.
- ❖ Microplaca tisular de 24 pozos (Costar, Cambridge).
- ❖ Tubos de 50 y 10 ml (Falcon Labware, Franklin Lakes, NJ).
- ❖ Tubos endorff de 2 ml (Eppendorf geratebau Netheler and Hinz Hamburg, Germany).

### Población en estudio.

- ❖ Células de médula ósea de ratón.
- ❖ Células monocíticas humanas.
- ❖ Células premonocíticas humanas U-937.



## 5.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL.





## ❖ OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LAS ESTIRPES CELULARES.

**Células monocíticas humanas.** Se obtuvieron a partir de muestras de 40 ml de sangre humana de adultos jóvenes, sanos y no fumadores (generosamente donadas por el banco de sangre del CMNSXXI), heparinizada (10 unidades de heparina de sodio/ml de sangre). Las células monocíticas fueron aisladas por centrifugación sobre Ficoll® Hypaque® (FH) por el método de Böyum. Sobre 5 ml de la mezcla con una densidad de 1.077g/ml se colocaron 10 ml de sangre diluida 1:2 (v/v) con medio de RPMI-1640 (L-glutamina, buffer Hepes 25mM, bicarbonato de sodio y rojo de feno) en tubos de poliestireno (Falcon Oxnard, CA., EEUU). Posteriormente se centrifugaron a 400 x g a una temperatura de 20°C por 30 min al cabo de los cuales las células de la interfase fueron recogidas, lavándose 2 veces con RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco, Grand Island, NY), los tubos fueron centrifugados a 200 x g por 10 min a 4°C. El paquete celular se resuspendió en RPMI-1640 completo (10% SFB, 2 mM glutamina, 1% piruvato, 100 UI/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin). Se determinó la viabilidad por exclusión de azul tripano, las células obtenidas se ajustaron a una concentración de  $5 \times 10^5$  cel/pozo en una microplaca de 24 pozos (Costar, Cambridge) y su diferenciación a macrófagos se realizó mediante la adición de PMA (10ng/ml).

**Células de médula ósea.** Se utilizaron ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones se sacrificaron por luxación cervical para obtener los fémures, se realizó asepsia de la región y posteriormente un corte entre la cadera y la rotula. Los fémures se colocaron en caja de petri estéril con medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM; L-glutamina, 110 mg/ml piruvato de sodio, 10% SFB, 1% penicilina-estreptomycin). Para obtener las células de médula ósea, se cortó la cabeza del fémur y se eluyó el hueso con la ayuda de una jeringa con aguja de insulina. El eluido se recolectó en tubo de poliestireno estéril y se hizo



un primer centrifugado a 125 x g/2 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante libre de restos de hueso y nuevamente se centrifugó a 450 x g/10 min a 4°C. Las células de médula ósea se resuspendieron en medio DMEM (L-glutamina, 110 mg/ml piruvato de sodio, 10% SFB, 1% penicilina-estreptomicina) carente del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) o en medio de médula ósea (medio DMEM, 20% SFB, 1% penicilina-estreptomicina, 0.01% anfotericina, sobrenadante de células L-929 con GM-CSF) y se ajustaron a 5X10<sup>5</sup> cel/pozo.

**Células U-937 (premonocítica)** La línea U-937 (aislada originalmente de un paciente con linfoma está clasificada como una línea celular monoblástica) fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD). Esta línea celular fue cultivada en botellas de poliestireno con capacidad de 50 ml y 25 cm de cuello angulado (Nun Brand Naperville, IL) en 5 ml de medio RPMI-1640 completo (10% de suero fetal bovino, 100 u/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se dejaron hasta lograr una confluencia de células, cambiando el medio de cultivo cada 48 horas. Cuando el número de células fue el adecuado, se colocaron en tubos de 50 ml, se lavaron dos veces con RPMI-1640 completo con centrifugación a 200 x g por min a 4°C. Las células se ajustaron a 5x10<sup>5</sup> cel/pozo y se estimularon con 10µl de PMA para diferenciarlas a macrófagos.

#### ❖ CULTIVOS CELULARES.

Las células se colocaron en microplacas de poliestireno de 24 pozos, con medio de cultivo solo utilizado como control, o adicionado con el factor estimulante señalado para la diferenciación de cada estirpe, utilizando diferentes dosis de zinc (0-1.0 mM). Los experimentos se realizaron por triplicado y se incubaron durante



---

once días a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Se adicionó medio de cultivo nuevo los días tres, seis y nueve, colocando en cada pozo 250 µl del medio con o sin factor estimulante; la observación microscópica para analizar la morfología celular se realizó los días tres, seis, nueve y once para las células de médula ósea de ratón y monocíticas humanas; las células U-937 se observaron los días 6 y 11. La viabilidad y el recuento total de las células se registraron los días seis y once.

#### ❖ DESPRENDIMIENTO CELULAR

El medio de cultivo de cada pozo se substituyó totalmente con 1 ml de medio de Tripsina-EDTA y la placa se incubó durante 15 min en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrida la incubación se desprendieron los macrófagos cuidadosamente con micropipeta y se colocaron en tubos Ependorff. Se centrifugaron a 450 x g/10 min a 4°C y el botón celular se lavó en 1 ml del medio indicado para cada estirpe, repitiéndose el procedimiento de centrifugado. Se obtuvo el botón celular y con cámara de Neubauer se determinó el número y la viabilidad, mediante la tinción de azul tripano.



## VI. RESULTADOS

En los cultivos de las tres estirpes celulares suplementados con 1.0mM de zinc, las características morfológicas iniciales no variaron durante el tiempo de incubación (11 días), observándose un aumento en el número de células (Fig. 11-16) y una disminución en la adherencia.

### CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN CON GM-CSF.

#### ❖ Características morfológicas

##### Diferenciación (Gráfica 1a).

El número de células diferenciadas en los cultivos ( $n=7$ ) de control (sin zinc) fue de 23% el día tres (Figura 1a), de 55% el día seis (Fig. 1b) y de 65% el día nueve (Fig. 1c); observándose el día 11 (Fig. 1d) macrófagos lisados y de los íntegros solo el 44% con morfología normal.

El día tres, la diferenciación celular (7%) en los cultivos suplementados con **0.05** mM de zinc fue menor ( $p<0.01$ ) a la obtenida en el control. Las características morfológicas de las células transformadas fueron similares en ambos cultivos.

El día seis la diferencia fue significativa ( $p<0.01$ ) entre la cifra de células transformadas en los cultivos con el metal (21%) y la correspondiente (55%) al control. Se observó similitud morfológica entre las células de ambos cultivos (Fig. 1b, 3a). El día nueve, el número de células fue similar al del control (66%), mostrando las características de los macrófagos normales (Fig. 3b).

El día 11 el número de macrófagos se incrementó a 75%, cifra significativamente ( $p<0.01$ ) diferente a la de los cultivos control, en los que solo el 44% de las células conservó su morfología.



En los cultivos con 0.1mM de zinc el número de células diferenciadas el día tres (6%) fue menor ( $p < 0.001$ ) a la de los controles (23%). En las figuras 1a y 4a podemos observar una similitud morfológica entre las células de ambos cultivos.

El día seis, la cantidad de células diferenciadas (13%) fue menor ( $< 0.002$ ) a la de los cultivos control (55%). Las diferencias morfológicas entre ambos grupos se acrecentaron (Fig. 1b, 4b), observándose en los cultivos con zinc ausencia de prolongaciones fibrilares en una población celular disminuida.

El día nueve se observaron diferencias ( $p < 0.02$ ) entre la transformación celular de los cultivos control y con 0.1 mM de zinc, así como entre los cultivos con 0.05 y 0.1 mM de zinc.

La cifra de células diferenciadas el día 11 en los cultivos con 0.1 mM de zinc (17%) fue menor ( $p < 0.001$ ) a la del control (44%) y la transformación celular entre los cultivos con 0.05 y 0.1 mM del metal mostró diferencias importantes ( $p < 0.02$ ). Microscópicamente se detectó destrucción celular en los controles, no así en los cultivos con zinc (0.1mM) en los que las células permanecieron redondeadas, o fusiformes sin dendritas, pero integras (Fig 4c).

#### ❖ Viabilidad (Gráfica 2a).

La cifra porcentual de las células del cultivo control (sin zinc), determinada los días seis y once fue de 94 y 81 respectivamente.

Los resultados de las células incubadas con 0.05 y 0.1mM de zinc no mostraron diferencia significativa respecto al control, en los días señalados.

En las células tratadas con 1.0 mM del metal, el valor porcentual fue de 44 el día seis y de 35 el día once; valores inferiores ( $p < 0.001$ ) a los obtenidos en los cultivos control y con las dosis menores del metal.



## CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN SIN GM-CSF.

### ❖ Características morfológicas

#### Diferenciación (Gráfica 1b).

El día tres se observó que tanto la cifra de células transformadas <4% como las características morfológicas (Fig 5a, 6a y 7a) fueron similares en todos los cultivos (0-1.0 mM zinc).

El día seis la cifra de células transformadas en el cultivo control (sin zinc), fue de 47%, observándose macrófagos bien diferenciados (Fig. 5b); y los días nueve y once de 65%. Los macrófagos emitieron prolongaciones cuya longitud permitió su entrecruzamiento, lo que se intensificó el día 11 (Fig. 5c).

En los cultivos con 0.05mM de zinc día seis, se observó el 30% de células transformadas, cifra menor ( $p < 0.01$ ) a la obtenida en el control, el desarrollo fibrilar fue también menor al de las células control (Fig. 6b).

Los días 9 y 11 la diferenciación celular fue de 60 y 70% respectivamente cifras similares a las del control. Las células con esta dosis al igual que las de control mostraron prolongaciones largas (Fig. 6c) con entrecruzamientos.

Con 0.1mM de zinc, la cifra de células diferenciadas a macrófagos el día seis fue de 42%, porcentaje superior ( $p < 0.01$ ) al obtenido con 0.05 mM y similar al control. Algunas células no emitieron prolongaciones (Fig 7b).

El porcentaje de células maduras los días nueve (50) y once (58) fue inferior ( $p < 0.01$ ) al obtenido en los cultivos control y con 0.05mM. Las células mostraron poco desarrollo de las prolongaciones fibrilares y escaso entrecruzamiento (Fig. 7c).



#### ❖ Viabilidad (Gráfica 2b).

La viabilidad de las células control fue de 92 a 96% (días seis y once), con 0.05mM de zinc de 85 a 93% y con 0.1 de 92 a 80%, siendo esta última cifra menor ( $p < 0.01$ ) a la del día 11 del control.

Con 1.0mM se obtuvieron valores de 31 y 45% ambos significativamente ( $p < 0.002$ ) inferiores a los del control y a los del resto de las concentraciones de zinc.

### **CÉLULAS MONOCITICAS HUMANAS CON PMA.**

#### ❖ Características morfológicas

##### Diferenciación (Gráfica 3a).

El número de células transformadas el día tres (<5%) y las características morfológicas fueron similares en todos los cultivos (0-1.0 mM zinc). El valor porcentual de dichas células en los cultivos de control fue de 21, 36 y 51, para los días seis, nueve y once respectivamente.

A partir del día seis las células empezaron a adquirir la forma típica del macrófago lo que se logró los días nueve y once, observándose en este último día destrucción celular incipiente.

Las cifras de células diferenciadas en los cultivos con 0.05 mM de zinc fueron 16, 25 y 39% para los días seis, nueve y once respectivamente. El valor correspondiente al día 11 fue menor ( $p < 0.002$ ) al del control.

El día seis se observaron células con forma de huso y no fibrilares, el resto conservó su forma redonda y algunas de ellas no se adhirieron al pozo de cultivo.

Los días nueve y once las prolongaciones fibrilares aumentaron su tamaño, sin igualar a las emitidos por las células sin zinc.



Con 0.1 mM del metal las células transformadas disminuyeron en relación con los cultivos control ( $p < 0.004$ ) registrándose porcentajes de 5, 19 y 38 en los días señalados. En el día seis, las células iniciaron la emisión de prolongaciones fibrilares (Fig. 8b), que se incrementaron los días nueve y once sin alcanzar el tamaño de las del control.

#### ❖ Viabilidad (Gráfica 4a).

La cifra de células viables en el cultivo de control para los días seis y once fue de 89 y 87% respectivamente, sin variaciones significativas en relación a las obtenidas con 0.05 mM de zinc (85 y 82%). En las células con 0.1 (73 y 71%) y 1.0 mM de zinc (51 y 50%) la viabilidad fue menor ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ ) a la del control, para los días seis y once, respectivamente.

### **CELULAS MONOCITICAS HUMANAS SIN PMA.**

#### ❖ **Características morfológicas**

##### Diferenciación (Gráfica 3b).

El día tres la cantidad (4%) y las características morfológicas de las células transformadas fueron similares en todos los cultivos (0-1.0 mM de zinc).

Para el día seis en los cultivos control la diferenciación celular fue de 18%, cifra superior ( $p < 0.01$ ) a la obtenida con las concentraciones de 0.05 (6%) y 0.1 (6%) mM de zinc. Con estas concentraciones, disminuyó el desarrollo de prolongaciones fibrilares (Fig. 9b) respecto al control (Fig. 9a).

Los días nueve y once los cultivos control tuvieron una transformación celular de 29 y 34% respectivamente. El día nueve las células alcanzaron las características normales del macrófago y el día 11 se observó destrucción celular y disminución



de las prolongaciones fibrilares.

Con 0.05mM de zinc la diferenciación celular los días nueve y once fue de 20 y 31%, respectivamente. La longitud filamentosa fué similar a la del control, sin embargo en este cultivo no se observaron células destruidas.

En los cultivos con 0.1mM de zinc el número de células transformadas los días nueve y once fue de 11 y 27%, respectivamente, cifra inferior ( $p < 0.01$ ) a la de los cultivos de control. Las características morfológicas en ambos días muestran células menos diferenciadas que en el control.

#### ❖ Viabilidad (Gráfica 4b)

En las células control, se observó una viabilidad de 87% en el día 6 y de 81% en el día 11; con 0.05 fue de 75%, con 0.1 de 71% y con 1.0 mM de zinc la viabilidad disminuyó (50%) en forma significativa ( $p < 0.002$ ).

### **CÉLULAS U-937 (PREMONICITICA) CON PMA**

#### ❖ Diferenciación (Gráfica 5a) y viabilidad celular (Gráfica 6a).

La diferenciación celular en los cultivos control fue de 49 y 58% en los días seis y once respectivamente; en los cultivos con 0.1 mM de zinc la cifra fue de 27% ( $p < 0.004$ ).

La viabilidad de las células del control o con 0.1mM de zinc fue de 95% para el sexto día y de 91% el día 11. En los cultivos con 1.0mM de zinc, la viabilidad disminuyó a 30 y 20% los días señalados.



## CÉLULAS U-937 (PREMONICITICA) SIN PMA

### ❖ Diferenciación(Gráfica 5b) y viabilidad celular (Gráfica 6b).

Para los días seis y once la diferenciación celular en los cultivos control fue de 22 y 33%, respectivamente, siendo el día óptimo de crecimiento el último día.

Con 0.1mM de zinc se observó un aumento en el día seis y una disminución en el día once del 10% respecto al control, con una  $p < 0.01$  (fotografías no mostradas).

La viabilidad de las células de control fue de 94% a 91% para los días seis y once; con 0.1 mM el día 6 (95%) fue similar y disminuyó (83%) el día once.

Con 1.0mM se obtuvieron valores de 41 y 18% ambos significativamente ( $p < 0.004$ ) inferiores a los del control.

## VII. FIGURAS Y GRAFICAS



Figura 1a

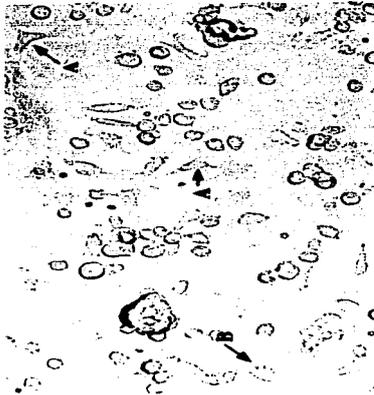


Figura 1b

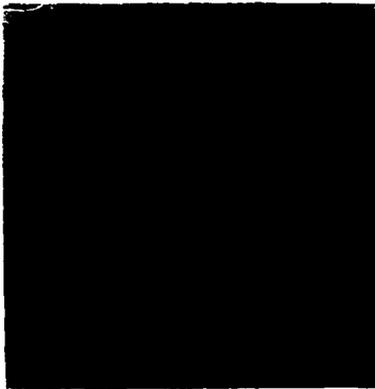


Figura 1c



Figura 1d

Cultivo de células de médula ósea de ratón con factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Fig. 1a.- día tres de cultivo (las flechas señalan células en etapas iniciales de diferenciación); Fig. 1b.- día seis de cultivo (A. Macrófagos normales; B. Células carenidas de prolongaciones filiformes); Fig. 1c.- día nueve de cultivo (macrófagos normales); Fig. 1d.- día once de cultivo (A. Macrófagos con cambios degenerativos; B. Rostros celulares); las fotografías muestran una resolución 40X.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

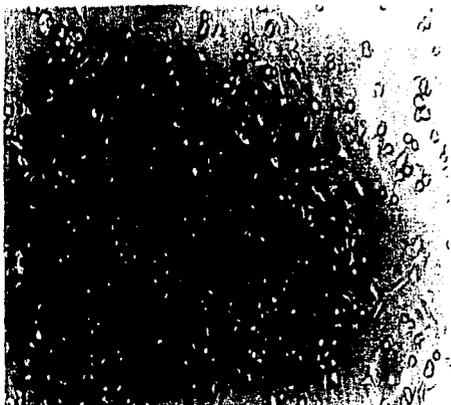


Figura 2. Cultivo de células de médula ósea de ratón con GM-CSF, día 9 de cultivo (macrófagos normales), 20x.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

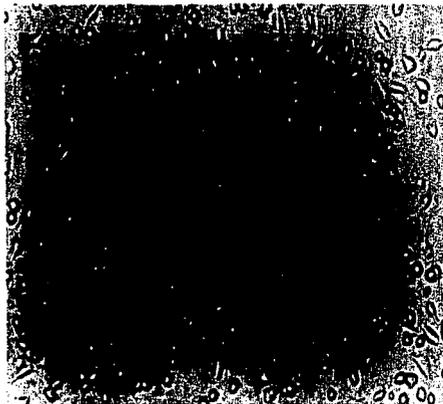
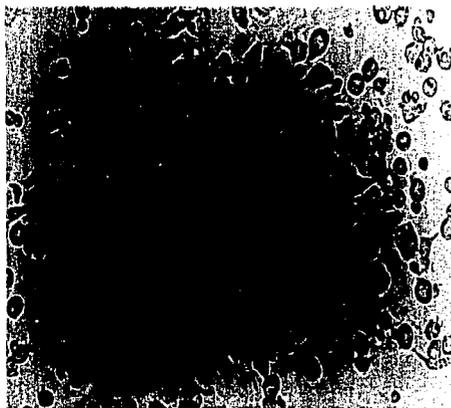


Figura 3a

Figura 3b

Cultivo de células de médula ósea de ratón con GM-CSF+0.05mM de zinc. Fig. 3a-(40X) día seis de cultivo (A. Macrófagos normales, B. Células en etapas iniciales de diferenciación); Fig. 3b-(20X) día nueve de cultivo (A. Macrófagos normales, B. Células no diferenciadas).

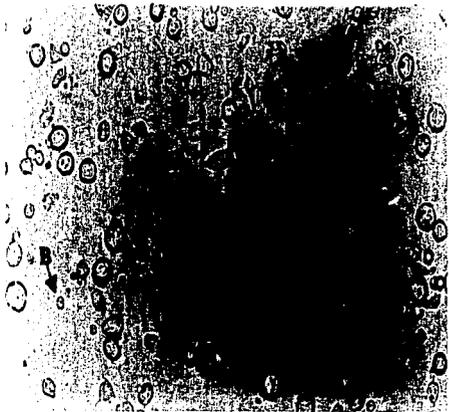


Figura 4a

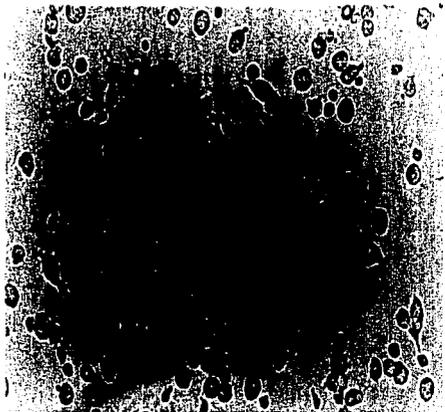


Figura 4b

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

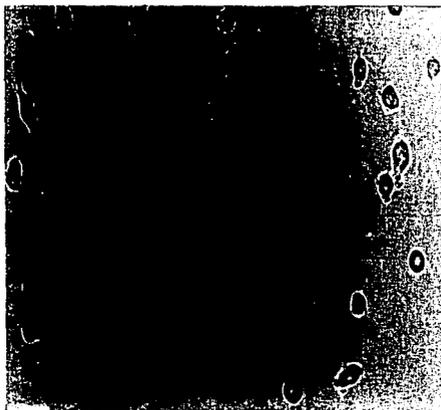


Figura 4c

Cultivo de células de médula ósea de ratón con GM-CSF+0.1mM de zinc. Fig. 4a-día tres de cultivo (A. Células en etapas de diferenciación, B. Células no diferenciadas); Fig. 4b-día seis de cultivo (células carentes de prolongaciones fibrilares); Fig 4c-día once (células redondas o fusiformes, que conservan su integridad). 40X.

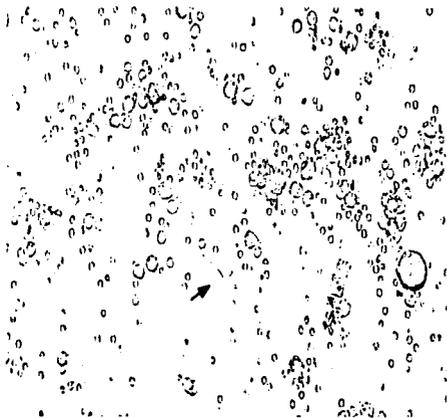


Figura 5a

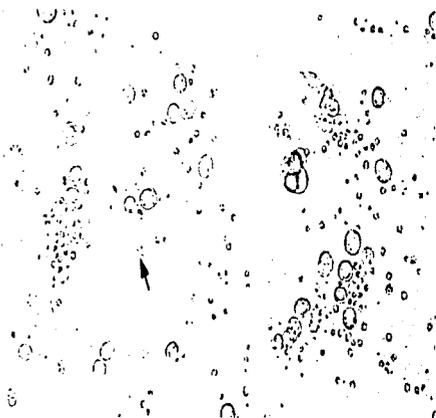


Figura 5b

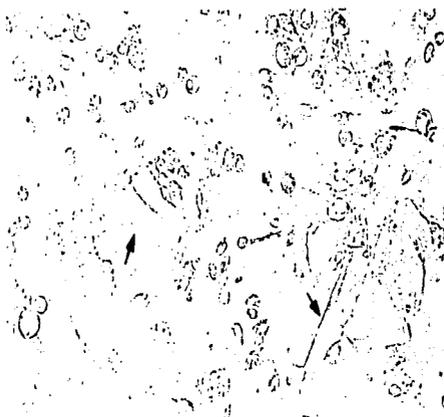


Figura 5c

FALTA DE ORIGEN  
TESIS CON

Cultivo de células de médula ósea de ratón con medio DMEM (control). Fig. 5a-día tres de cultivo (células redondas o fusiformes sin prolongaciones fibrilares); Fig. 5b-día seis de cultivo (se indica un macrófago normal); 5c-día once de cultivo (macrófagos con prolongaciones que permiten su entrecruzamiento). 40X.

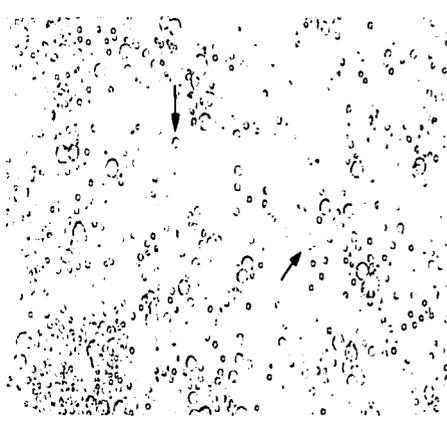


Figura 6a

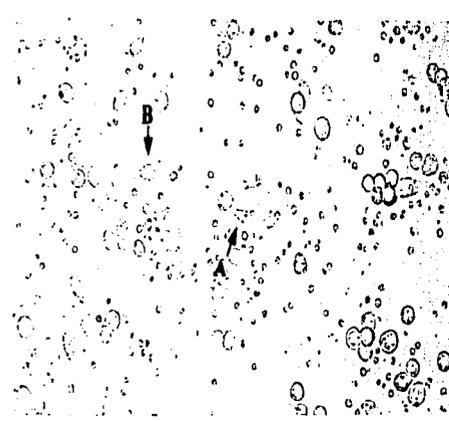


Figura 6b

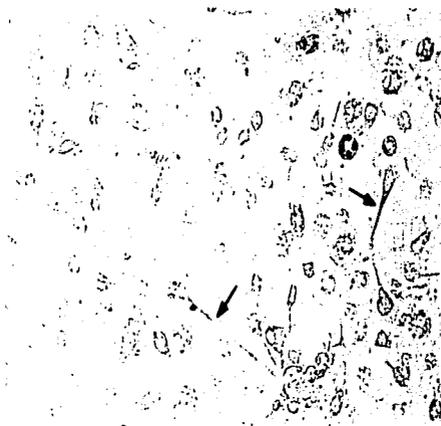


Figura 6c

FALTA DE VITALIDAD  
 NO HAY TESIS CON  
 ORIGEN

Cultivo de células de médula ósea de ratón con medio DMEM+0.05mM de zinc Fig. 6a-día tres de cultivo (células redondas o fusiformes sin prolongaciones filiformes); Fig. 6b-día seis de cultivo (A. Células en etapas iniciales de diferenciación, B. Células sin diferenciación); Fig. 6c-día once de cultivo (macrófagos con filamentos unipolares y que forman solo en algunos sitios un fondo trabeculado). 40X.

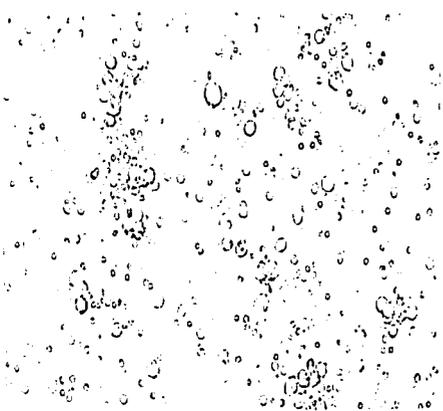


Figura 7a

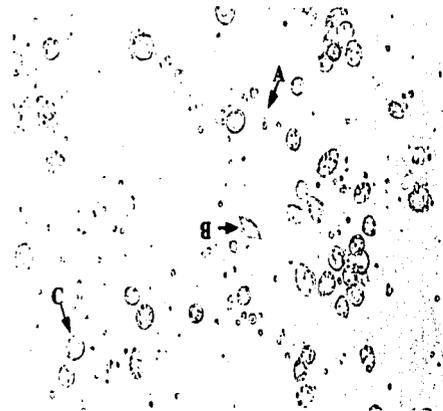


Figura 7b

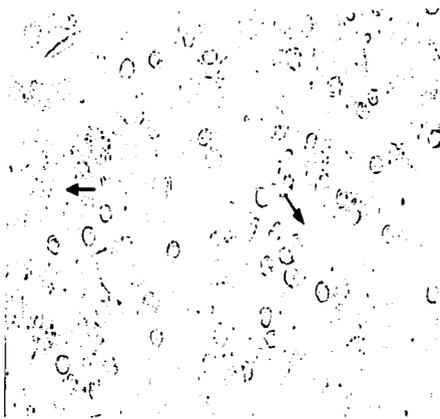


Figura 7c

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

Cultivo de células de médula ósea de ratón por medio DMEM+0.1mM de zinc. Fig. 7a-día tres de cultivo (células redondas o fusiformes sin prolongaciones fibrilares); Fig. 7b-día 6 de cultivo (A. Macrófagos normales, B. Células que se empiezan a diferenciar, C. Células con aumento de tamaño sin diferenciación); Fig. 7c-día nueve de cultivo (células que forman una malla con prolongaciones fibrilares). 40X.

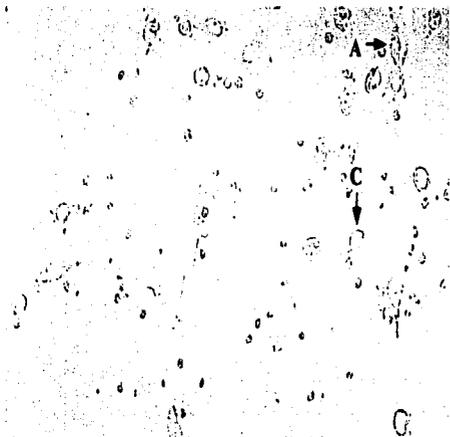


Figura 8a

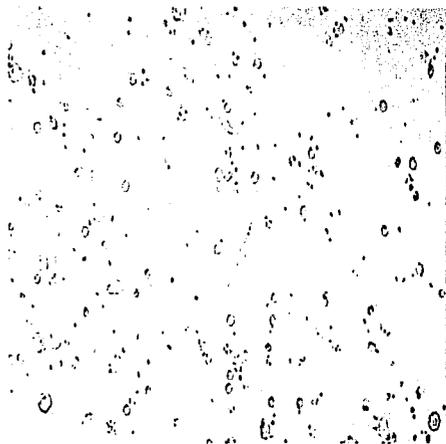


Figura 8b

Cultivo de monocitos de sangre humana con RPMI-1640+PMA, día 6. Fig. 8a-0.05mM de zinc (A. Células sin prolongaciones fibrilares, B. Células con aumento de tamaño, no diferenciadas); Fig 8b-0.1mM de zinc (inicia la formación de prolongaciones fibrilares). 40X.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

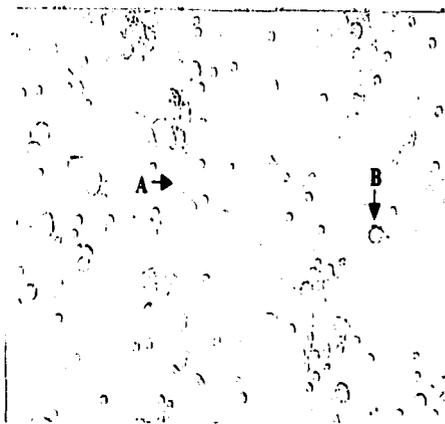


Figura 9a

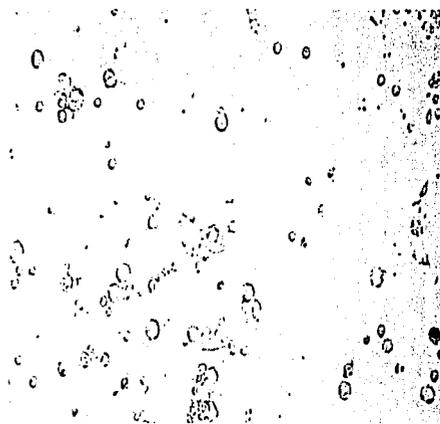


Figura 9b

Cultivo de células de monocitos de sangre humana con RPMI-1640, día 6. Fig. 9a-en ausencia de zinc (A. Macrófagos normales, B. Células no diferenciadas); Fig. 9b-0.1mM de zinc (células con prolongaciones fibrilares cortas). 40X.



Figura 10. Cultivo de células U-937 con medio de RPMI-1640 + PMA, día 11 de cultivo, 20X  
Prolongaciones fibrilares bien definidas.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

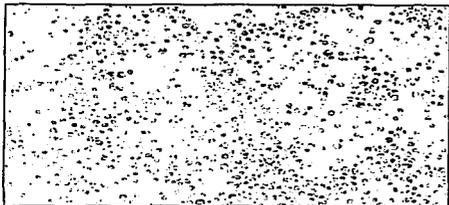


Figura 11

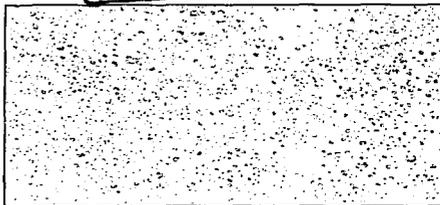


Figura 12

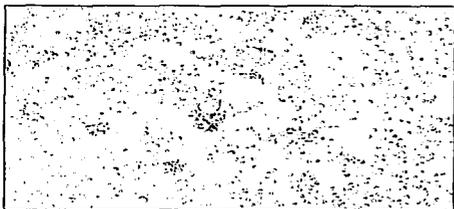


Figura 13

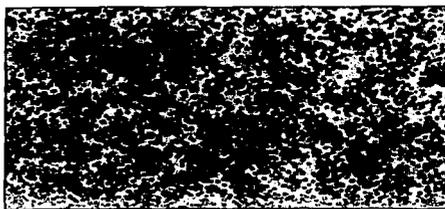


Figura 14

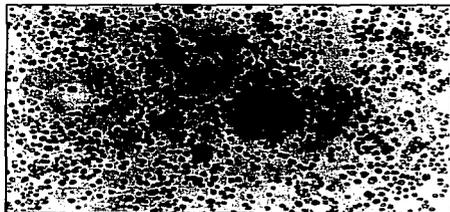


Figura 15

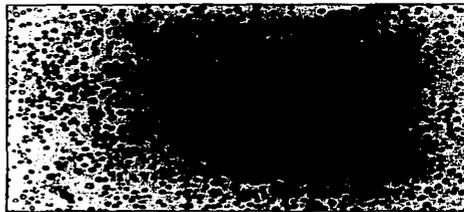


Figura 16

Figura 11 y 12. Cultivo de células de médula ósea de ratón con medio de "médula ósea" (DMEM + GMCSF) suplementado con zinc (1.0 mM), días 3 y 11 de cultivo respectivamente (40X).

Figura 13 y 14. Cultivo de monocitos de sangre humana (medio RPMI-1640 + PMA + 1.0 mM de zinc), días 3 y 11 de cultivo respectivamente (40X).

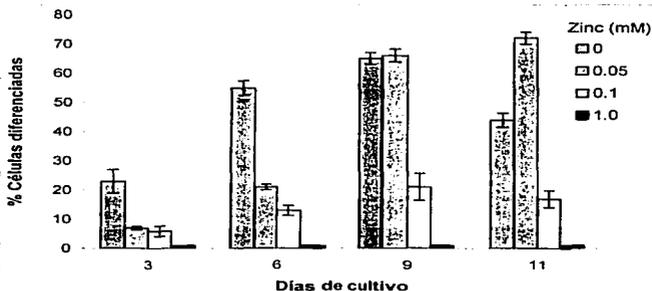
Figura 13 y 14. Cultivo de células U-937 (medio RPMI-1640 + PMA + 1.0 mM de zinc), días 3 y 11 de cultivo respectivamente (40X).

Las características morfológicas iniciales fueron similares en las tres líneas con estímulo (PMA o factor estimulado de colonias de granulocitos y monocitos) o sin el (figuras no mostradas) y no se modificaron durante el periodo de observación (11 días), solo se observó un aumento en el número de células.



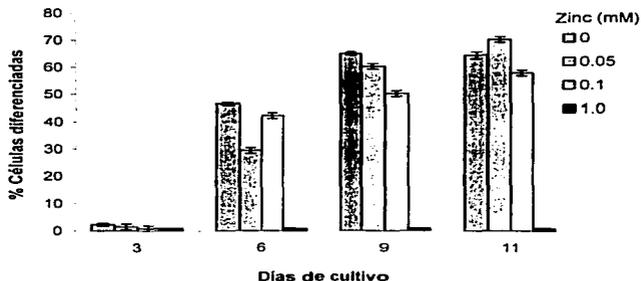
## CELULAS DE MEDULA OSEA DE RATÓN

### a) Diferenciación celular.



TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

**Gráfica 1a.** Células cultivadas con factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y diferentes concentraciones de zinc (0-1.0mM).

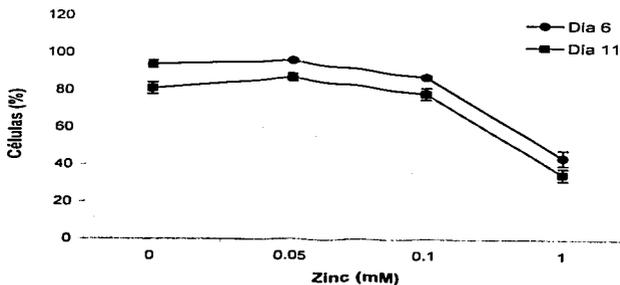


**Gráfica 1b.** Células en medio de cultivo sin GM-CSF, suplementado con zinc (0-1.0mM).

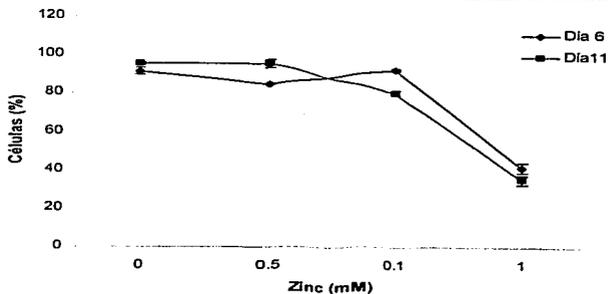


## CELULAS DE MEDULA OSEA DE RATÓN

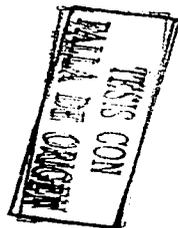
### b) Viabilidad de células totales.



Gráfica 2a. Cultivo celular con GM-CSF.



Gráfica 2b. Cultivo celular sin GM-CSF.





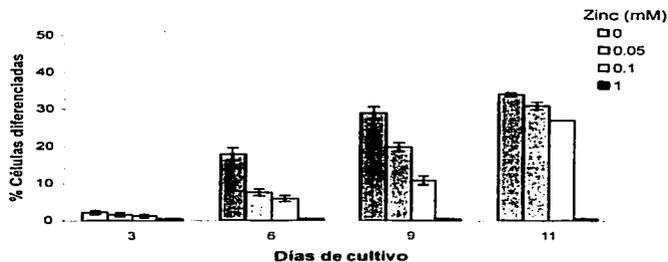
## MONOCITOS HUMANOS

### a) Diferenciación celular.



Gráfica 3a. Cultivo de células con acetato 13-formil-12 miristato (PMA) a diferentes concentraciones de zinc (0-1.0mM de zinc).

TESIS CON  
PALA DE ORIGEN

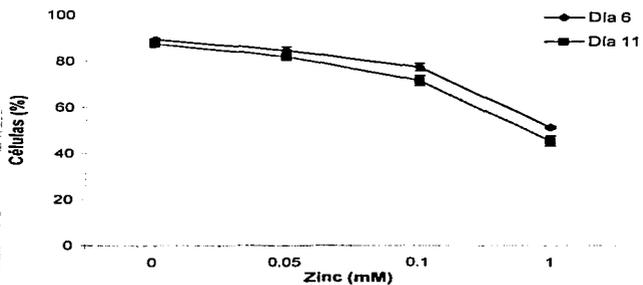


Gráfica 3b. Células con medio de cultivo sin PMA suplementado con zinc (0-1.0mM).

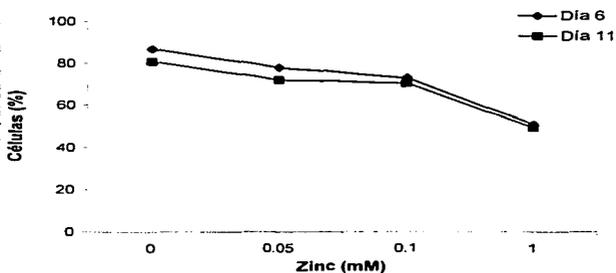


## MONOCITOS HUMANOS

### b) Viabilidad de células totales.



Gráfica 4a. Cultivo celular con PMA.



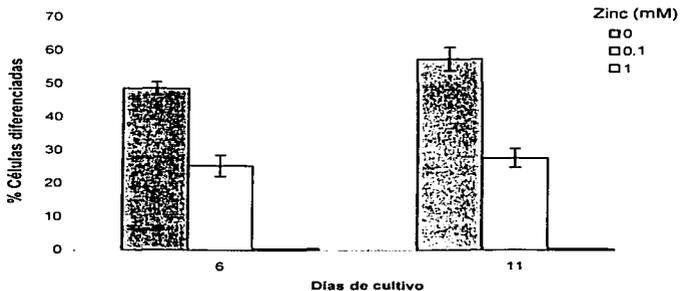
Gráfica 4b. Cultivo celular sin PMA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

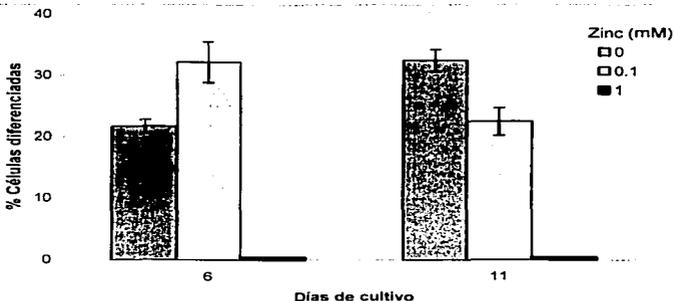


## CELULAS PREMONOCITICAS U-937

### a) Diferenciación celular.



Gráfica 5a. Células en medio de cultivo con PMA, suplementado con zinc (0-1.0mM).



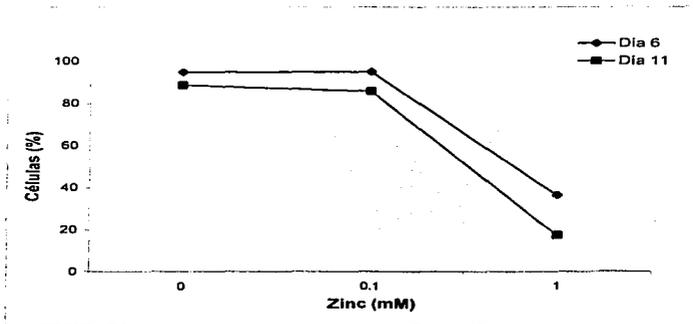
Gráfica 5b. Células en medio de cultivo sin PMA, suplementado con zinc (0-1.0mM).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

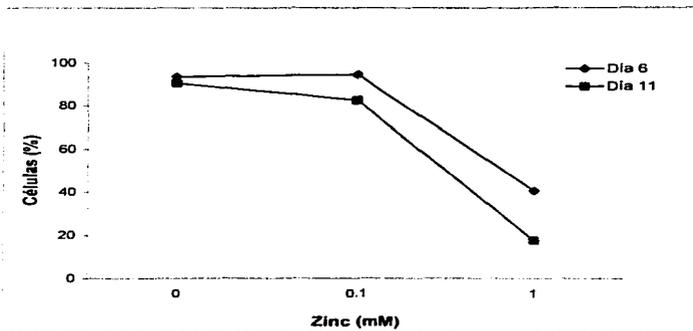


## CELULAS PREMONOCITICAS U-937

### b) Viabilidad de células totales.



Gráfica 6a. Cultivo celular con PMA.



Gráfica 6b. Cultivo celular sin PMA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## VIII. DISCUSIÓN

Los resultados de la viabilidad, diferenciación y morfología celular, obtenidos en el estudio comparativo de tres estirpes celulares con diferentes concentraciones de zinc, mostraron variaciones dependientes no sólo de la **dosis** utilizada, sino del **tiempo** de interacción metal-célula. Observándose además, algunas discrepancias entre las líneas celulares utilizadas.

Al respecto, podemos señalar que los resultados obtenidos con **0.05 mM** de zinc, mostraron variaciones en los tiempos señalados, tanto entre las líneas celulares de médula ósea de ratón y monocitos humanos como dentro de una misma estirpe. Así, al sexto día de cultivo la diferenciación de las células de la médula ósea de ratón estimuladas con CM-CSF se **inhibió** con el zinc, sin embargo, el día nueve ya **no** hubo diferencias entre éstas células y las del control. Finalmente (día once), el metal ejerció en éstas células un efecto **estimulador**, observándose un aumento significativo en la diferenciación celular y la conservación de su integridad, en relación con los cultivos control, que mostraron los cambios degenerativos y la destrucción celular que sigue al noveno día (Racoosin E., 1989), tiempo límite referido como utilizado para el estudio de éstas células. Cabe señalar que en el mismo lapso (once días), el metal ejerció el efecto opuesto, **inhibidor**, en los monocitos **humanos** estimulados con PMA.

Definitivamente con ésta dosis se observaron todos los efectos, dependientes principalmente del tiempo y de la sensibilidad de las células.

El efecto nocivo del metal, se observó en todos los cultivos con **0.1 mM** de zinc, ya que las células de las **tres** líneas mostraron en todos los períodos evaluados,



una diferenciación significativamente inferior a la de los controles y una disminución de la viabilidad hacia el día once, principalmente en los cultivos de monocitos humanos. Únicamente en los cultivos de la línea U-937 sin PMA y en el sexto día de incubación, se estimuló la diferenciación celular. El efecto nocivo de ésta dosis, se observó también en células epiteliales (Chvapil M., 1977) y difiere de lo observado por algunos autores que refieren el efecto estimulante de la misma sobre los monocitos (Wellinghausen N., 1998, Lastra M, 2001).

Los efectos señalados para éstas dosis del metal, se manifestaron con menor intensidad en los cultivos carentes de estímulo (PMA o GM-CSF), lo que nos sugiere que la serie de cambios generados en una célula activada para diferenciarse, podría potencializar la acción del zinc, posiblemente facilitando su entrada y más aún su participación (estimuladora o inhibitoria) en algunos de los mecanismos involucrados en éste proceso, los que serán analizados posteriormente.

Con 1.0 mM de zinc no hubo diferenciación, las células no modificaron su morfología inicial y en general tampoco sus dimensiones; sin embargo, aumentó la cantidad total de células en todos los cultivos y disminuyó su adherencia a los pozos de cultivo. Todas las células en estudio mostraron el mismo patrón durante el tiempo de incubación con ésta dosis del metal, y la viabilidad disminuyó significativamente registrándose cifras inferiores al 50%. El efecto deletéreo del metal con ésta dosis fue evidente, sin embargo se estimuló la proliferación celular, pero definitivamente las células generadas, no se transformaron. Algunos estudios muestran como ante factores que resultan tóxicos para las células de la médula ósea, los linfocitos que son los que primero se afectan disminuyen, al incrementarse su muerte por apoptosis (Anuraj H.,



---

1998). Ante la disminución de ésta población celular, la médula compensa aumentando el número de granulocitos principalmente neutrófilos y frecuentemente el número de eritrocitos (Fraker P., 2002). En ratones con dietas altas de zinc se observó también un incremento en las células de las criptas, pero únicamente se concentraban en un segmento del tercio distal del intestino (Duff, M. 2002).

Nuestros resultados son un claro ejemplo de la interpretación que se puede dar a los efectos de un factor en estudio, cuya respuesta varía de acuerdo al tiempo de observación (como el día once que no se incluye habitualmente en los estudios de macrófagos y en el que vimos efectos importantes y diferentes a los obtenidos el día nueve) y de manera más importante, a la especie de la que provengan las células en estudio. En nuestro estudio pudimos ver que la célula humana (monocito), es más sensible al zinc, que las células de la médula ósea de ratón, lo que denota el riesgo que se deriva de extrapolar resultados de una especie a otra.

En la literatura existen documentos que enfatizan frecuentemente sólo uno de los efectos del metal y con frecuencia éste resulta ser el estimulante (Wellinghausen N., 1996). Se ha visto además como algunos efectos nocivos atribuidos a la deficiencia del zinc (King L. 2000), pueden presentarse también con dosis elevadas del metal (Cabañas M., 2000). Así, se ha observado en humanos, que dosis cinco veces superiores a la ingesta normal durante más de ocho días, produce una disminución en la quimiotáxis y la fagocitosis (Prasad A., 1988; Chandra R., 1984). Mas tardíamente (15 días) disminuye la proliferación de las células T (Chandra R., 1984).



## ZINC

El zinc estabiliza la estructura terciaria de proteínas y puede modificar su función, participa en RNA y DNA polimerasas y es requerido durante la transición G1/S, lo que sugiere su participación en la regulación de la proliferación celular (Chesters J., 1989, Paski C., 2001, Kanekiyo M., 2002).

Una variedad de genes son rápida y transitoriamente activados cuando se estimulan células con suero o factores de crecimiento. El zinc es requerido para la expresión de múltiples genes codificando para factores de transducción como NFκ-B (Yang J., 1995) y los conocidos como dedos de zinc (Shankar A., 1998) constituidos por secuencias de siete aminoácidos (2His, 2 Cis y 3 aminoácidos hidrofóbicos) que están siempre en idénticas posiciones y que forman una asa alrededor de un ión de zinc. Una familia de éstos genes incluye a los genes de respuesta temprana de crecimiento (EGR) 1,2,3 y 4 (Kharbanda S., 1991) que codifican para factores de transcripción. Se ha visto que estos genes (EGR1 y EGR2) se expresan en monocitos humanos activados por (M-CSF) y el efecto de la adquisición de EGR se asoció con un fenotipo monocítico más diferenciado. La disminución o el aumento en su expresión puede contribuir a una pérdida del control de crecimiento o de la capacidad de las células para diferenciarse. Asimismo, en la línea U-937 estimulada con PMA se ha observado la activación de EGR1 que principalmente participa en la transformación. (Nguyen H., 1993). Nuestros resultados sugieren que el efecto sobre éstos genes dependientes de zinc pudieran ser dosis dependientes, dado que se expresaron efectos estimuladores o inhibidores de la transformación celular.

Los macrófagos tienen un citoesqueleto conformado por microtúbulos y microfilamentos. En la cara interna de la membrana celular se encuentran



---

filamentos de actina que intervienen en la morfología y la formación de pseudópodos y receptores de superficie (Auger M., 1991). En el citoesqueleto, el zinc ejerce un efecto directo sobre dichos filamentos (Kishna M., 1980), por lo que alteraciones en su estructura podrían tener un efecto sobre la dinámica celular, lo que ocasionaría una deficiencia en su funcionalidad. Además un aumento en la polimerización celular ocasionada por el zinc, le puede conferir a la tubulina una estabilidad tal que interfiere con la replicación, proceso dinámico que requiere para su progresión de la polimerización y despolimerización de la proteína. Por otra parte Larsson, 1976 observó que la tubulina al polimerizarse en presencia de zinc forma laminas y no microtubulos, lo que también podría afectar la dinámica celular.

El zinc puede enlazarse con algunas de las proteínas que unen y/o transportan calcio (Picello E., 1992); entre las que se encuentran: calregulina, calmodulina y S-100 (Donato R, 1986). Estas proteínas pueden tener una afinidad mayor por el metal que por el calcio (Chvapil M.,1976; Vega G.; 1997) y pueden además, exhibir sitios de unión para el zinc (Picello E., 1992). Esto alteraría la actividad del calcio y por ende la función celular.

Con los resultados obtenidos en éste estudio, podemos señalar que los efectos observados con diferentes dosis de zinc, varían no sólo entre especies, sino también de acuerdo a los tiempos de interacción con las mismas células. Esto puede explicar las contradicciones y variaciones existentes en los resultados obtenidos por diferentes grupos de estudio. Ante el riesgo de que una misma dosis pueda resultar estimulante o inhibitoria, se deben realizar ensayos en diferentes estirpes celulares y a diferentes tiempos, para poder definir con mayor certeza el efecto de oligoelementos sujetos a cualquier estudio. No podemos dejar de mencionar que el comportamiento *in vitro* e *in vivo* conlleva diferencias importantes y que dosis pequeñas en estudios



---

experimentales resultan estimuladoras de la respuesta inmune, efecto contrario al observado en individuos con cifras normales de zinc, en los que la administración prolongada del metal aún en dosis pequeñas, va a ocasionar una disminución en la respuesta inmune.

Se ha difundido ampliamente el efecto benéfico que tiene el zinc y desafortunadamente la información concerniente a sus efectos deletereos es escasa o nula, lo que ha propiciado su uso indiscriminado por la población en general y en forma importante en los lactantes, para los que existe un número cada vez más elevado de alimentos suplementados con éste metal. Es necesario por lo tanto, difundir en forma accesible los efectos que puede ocasionar una dosis elevada o sostenida de éste elemento, en los individuos que no lo requieren.



## VIII. APÉNDICE

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

**Medio de RPMI-1640 Suplementado** (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).  
Reactivo comercial, seguir las instrucciones del proveedor.

|   |             |
|---|-------------|
| <i>Suero fetal 10%</i>                  | <i>50ml</i> |
| Estreptomicina y penicilina 100 u/ug ml | 5ml         |
| Gentamicina 2mg/100 ml                  | 1ml         |
| Pruvato de sodio 1%                     | 5ml         |

#### **Medio de Médula Ósea.**

|   |        |
|---|--------|
| Para 100ml                              |        |
| Medio DMEM                              | 50ml   |
| Suplemento (sobrenadante células L-929) | 30ml   |
| Suero fetal bovino                      | 20%    |
| Penicilina-Estreptomicina               | 1.0%   |
| Anfotericina                            | 0.001% |

Esterilizar por filtración al vacío utilizando filtro Millipore con membrana de 0.22 um.



---

**Medio D-MEM (Dulbecco's modificado)** (Gibco, BRL). Reactivo comercial, seguir las instrucciones del proveedor.

Para preparar 1000ml.

|   |      |
|---|------|
| Medio DMEM                                | 10g  |
| Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) | 3.7g |
| Penicilina-Estreptomicina                 | 1.0% |
| Suero fetal bovino                        | 10%  |

**PMA (Phorbol 12-Myristate 13-acetate).**

Usar el PMA a una concentración final de 10ng/ml.

Reconstituir en DMSO en 0.1mg/ml.

Almacenar en alícuotas (20 $\mu$ l a  $-20^\circ\text{C}$ ).

Diluir la solución Stock en PBS estéril.

Nota: La alícuota que se usa no se vuelve a congelar.



## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, Abul K.; Lichtman, Andrew H.,** Inmunología celular y molecular, Mc Graw Hill Interamericana, México, 1999.
- Allan, Adrian K.; Hawksoworth, Gabrielle M.; Woodhouse, Leslie R; et al,** Lymphocyte metallothionein mRNA responds to marginal zinc intake in human volunteers, British Journal of Nutrition, 2000;84:747-756.
- Allen J.; Perri RT.; Mc Clain CJ.; Kay NE.;** Alterations in human natural killer cell activity and monocyte cytotoxicity induced by zinc deficiency, Journal Lab Clinical Medical, 1983;102:577-89.
- Auger M. J; Ross J.A.** The biology of the macrophages. The macrophage. Edited by Lewis C. et al. Oxford IRL Press., 1992.
- Betteger WJ; O'Dell BL.,** Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells, Journal Nutrition Biochemical, 1993;4:194-207.
- Bloomfield, Molly M,** Química de los seres vivos, Primera edición, Ed.Limusa, 1992.
- Bogden JD.; Baker H.; Frank O.;** Micronutrient status and human immunodeficiency virus (HIV) infection. Annals the New York Academy of Sciences, 1990;587:189-95.
- Bobilya, Denis J.; et al,** Zinc transport into endothelial cells is a facilitated process, Journal of cellular Physiology, 1992;151:1-7.
- Brush AI; Pettingell WH; Multhaup G; Paradis MD; et al,** Rapid induction of Alzheimer AB amyloid formation by zinc. Science, 1994;265:1464-1467.
- Bruce, N. Ames,** Micronutrients prevent cancer and delay ageing. Toxicology Letters 102-103 (1998) 5-18.
- Bruce, N. Ames,** Zinc, Copper and Iron Nutriture and Immunity, Journal Nutrition, 1992; 122:604-609.



---

**Cabello, Gladys Villouta.** Leucocitos: Aspectos morfológicos, funcionales, cinética y variaciones patológicas, Santiago de Chile, 1999.  
<http://www.veterinaria.uchile.cl/departamentos/patologia/hematologia/leucocitos-1.html>.

**Cabañas Cortes, María Asunción.** Efecto del zinc sobre la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos peritoneales, Facultad de Química, UNAM, 2000.

**Chandra, Ranjit Kumar.** Excessive intake of zinc impairs immune responses, JAMA, 1984;252:1443-6.

**Casals, Francesc J.** Plaquetas, 1996.

<http://ourworld.compuserve.com/homepages/casals/plaquet2.htm>.

**Chandra, Ranjit Kumar.** Nutrition and immunity: lesson from the past and new insights into the future, American Journal Clinical Nutrition, 1991;53:1087-1101.

**Chesters J; Boyne R.** Nature of Zn<sup>2+</sup> requirement for DNA synthesis by 3T3 cells, Experimental Cell Research, 1991;192:631-363.

**Chesters, John K.; Petrie, Linda; Vint, Hazel.**, Specificity and timing of the Zn<sup>2+</sup> requirement for DNA synthesis by 3T3 cells., Experimental Cell Research, 1989;184:499-508.

**Chou, Tz-Chong; Li, Chi-Tuan; Lee, An-Rong; Wu, Tzong Wu;** Mechanism of inhibition of platelet aggregation by HCL-31D, European Journal of Pharmacology, 2000; 387:125-31.

**Chvapil M; Stankova L; Bernhard DS; et al,** Effect of zinc on peritoneal macrophages in vitro, Infection Immunity, 1997;16(1):367-373.

**Chvapil M,** Effect of zinc on cells and biomembranes, The Medical Clinics of the North America, 1976; 60:799-805.

**Cohen J; Duke R,** Apoptosis and programmed cell death in immunity, Annual Review of Immunology, 1992;10:267-293.

**Cousins, Roberto J.** Conocimientos actuales sobre nutrición, Capítulo 29, 1997, (F.M).



- 
- Cunningham, Susanna-Rundles.** Zinc modulation of immune function: Specificity and mechanism of interaction, Journal Laboratory Medical, 1996;128:9-11.
- Da Silva, J.J.R.; Williams, R.J.P.,** The Biological chemistry of the elements: The inorganic chemistry of Life, Clarendon Press, Oxford, 1991;299-318.
- Donato R.,** S-100 proteins, Cell Calcium, 1986;7:123-145.
- Duff M.; Ettarh RR.,** Crypt cell production rate in the small intestine of zinc-supplemented mouse, Cells Tissues Organs, 2002;172(1):21-8.
- Fair WR; Heston WDW,** The relationship of bacterial prostatitis and zin, In: Brewer GJ, Prasad AS, eds. Zinc metabolism: current aspects in health and disease. New York: Alan R. Liss, 1977;129-40
- Freggiaro, Eduardo Luis,** Leucocitos o glóbulos blancos, Atlas de hematología on line. Foro bioquímico. [http://orbita.starmedia.com/~forobioq/a\\_h\\_leucos.html](http://orbita.starmedia.com/~forobioq/a_h_leucos.html).
- Fraker P; King L,** Changes in the regulation of lymphopoiesis and myelopoiesis in the zinc deficient mouse, Nutrition Review., 1998;56:567-9.
- Fraker P.,** Nutrición e inmunidad: alteración de la linfopoyesis en ratones con deficiencia de zinc. Conocimientos actuales sobre nutrición, capítulo 56, septima edición., 1997:594-600.
- Gavy B; King L; Telford W; Morford L,** Chronic levels of corticosterone reduces the number of cycling cells of the B-lineage in murine bone marrow and induces apoptosis, Immunology, 1993;80:587-92.
- Grattendick Ken.** Macrophage Functions and Macrophages in research, 1999, <http://rampages.onramp.net/~keng/macrophage/macfunctions.html>.
- Guy, Richard H; Hostyck, Jurij J,** Metals and the skin, New York, Basel, 1999, (F.M).
- Hardy RR; Carmack CE; Shinton Sda; et al,** Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stage in normal mouse bone marrow, Journal of Experimental Medicine, 1991;173:1213-1225.



---

**Instituto de la medicina, Tablero de alimentos y de nutrición, productos dietéticos de la referencia para vitamina A, la vitamina K, el arsénico, el bromo, el cromo, el cobre, el yodo el hierro, el magnesio, el molibdeno, el níquel, el silicio, el vanadio y el zinc**, Presa Nacional de la Academia, Washington, C.C., 2001.

**James C. Fleet., Biochemical and Physiological Aspects of human nutrition**, W.B. Saunders company, Philadelphia, Pennsylvania, 2001;(Chapter 32):741-760.

**Kanekiyo, Masako; Itoh, Norio; Kawasaki, Atsuko; et al., Metallothionein is required for zinc-induced expression of the macrophage colony stimulating factor gene**, Journal of Cellular Biochemistry, 2002;86:145-153.

**Keen CL; Greshwin ME, Zinc deficiency and immune function**, Annual Review Nutrition, 1990;10:415-431.

**King LE; Franker PJ, Varations in the cell cycle status of lymphopoietic and myelopoietic cells created by zinc deficiency**, The Journal of Infection Diseases, 2000;182(suppl1):S16-22.

**Kita, Hirohito; Kaneko, Māsayuki; Bartemes, Kathleen; et al, Does IgE bind to and activate eosinophils from patients with allergy?**, The Journal of Immunology, 1999,162:6901-6911.

**Krishna M., Schwartz S., Zinc modulates mitogenic responses of human lymphocytes by affecting structures influenced by citochalasin**, B. Clin Immunol. Immunopathol., 1980; 16:463-67.

**Kushner J., The phenomenon of the acute phase response**, Ann. NY Acad Sci, 1982;389:39-48.

**Kuvilbidila S; Yun L; Ode D; Warriar RP, The inmune resoste in protein-energy malnutrition and single nutriet deficiencies**, In Klurfeld DM (ed), Human nutrition: a comprehesive tratise. Plenum Press, New York, 1993:121-157.



---

**Lai, Yu-rong; Chen, Jin-liang; et al, The protective role of zinc in the action of coal dust upon mouse macrophages**, British Journal of Industrial Medicine, 1991; 48:838-40.

**Larsson H.; Wallin M.; Edstrom A., Induction of a sheet polymer of tubulin by zn++**. J. Experimental cell res, 1976;100:104-108.

**Lasta, Ma. Dolores; Pastelin R., Camacho A.; Monroy B.; et al., Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response**., Journal Trace Elem. Med. Biol., 2001;15:5-10.

**Lothar, Rink; Philip, Gabriel, Zinc and the immune system**, Proceeding of the Nutrition Society 2000;59:541-552.

**Linder MC, Nutritional Biochemistry and Metabolis**, 1991.(F.M).

**Marone, Gianni; Findlay, Steven R.; Lichtenstein, Lawrence., Modulation of histamine release from human basophils *in vitro* by physiological concentrations of zinc**, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1981;23:292-297.

**McKenzie, Shirlyn B. Hematología clínica**, Ed. El manual moderno, México 1991.

**Meryl E., Wastney; Owen M., Rennert, Encyclopedia of Humman Biology**, 1991.

**Meftah S; Prasad AS; Lee DY; Brewer GI, Ecto 5' nucleotidasa (5'NT) as a sensitive indicator of human zinc deficiency**, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1991;118:309-316.

**Misterio de la agricultura de Estados Unidos**, servicio agrícola de la investigación. Bases de datos del USDA para la referencia estándar, lanzamiento 13. Home page nutriente del laboratorio de los datos, 1999, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>



- 
- Nakajima, Katsuyuki; Suzuki, Keiji.** The cytotoxic effect of endotoxin on bone marrow cells in zinc deficient rats. Journal of Experimental Medicine, 1996;179:183-191.
- Neldner KH; Hambidge KM.** Zinc therapy of Acrodermatitis Enteropathica. New England Journal Medical, 1975;292:879-82.
- Nelson, David S.** Macrophages. Encyclopedia of Human Biology, Clare E. Lewis and James O'D McGree, vol.4. Academic Press, Inc., 1991.
- Nguyen, Hung Q.; Hoffman, Barbara-Liebermann.; Liebermann, Dana A..** The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. Cell, 1993;72(January 29):197-209.
- Orchard, Margaret A; Sobotka-Kagey, Anne; Proud David; et al.** Basophil histamine release induced by a substance from stimulated human platelets. The Journal of Immunology, 1986, 136(6):2240-2244.
- Osati-Ashtiani F; King L; Fraker P.** Variance in the resistance of early murine B-cells to a deficiency in zinc. Immunology, 1998; 94:94-100.
- Paski, Shirley C; Xu, Zhaoming.** Labile intracellular zinc is associated with 3T3 cell growth. Journal of Nutritional Biochemistry, 2001;12:655-661.
- Picello E; Damiani E; Nagreth S.** A low affinity Ca<sup>++</sup> binding sites versus Zn<sup>++</sup> binding sites in histidine rich Ca<sup>++</sup> binding protein of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992;186:659-67.
- Pietarinen, Runtti Petra; Lakari, Essi; Raivio, Karl O., Kinnula, Vuokko L.,** Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. Am J. Physiol. Cells Physiol., 2000;278:C118-C125.
- Prasad As; Beck FW; Endre L; Handschu W; Kukuruga M.** Zinc deficiency affects cells cycle and deoxythymidine kinase gene expression in HUT-78 cells. Journal Laboratory Clinical Med, 1996;128:9-11.



- 
- Prasad, A., Meftah S.; Abdallah J.; Kaplan J.; et al.** Serum thymulin in human zinc deficiency. Journal Clinical Investigation., 1988;82:1202-1210.
- Pulsomed.** 2002. <http://www.tuotromedico.com/temás.htm>
- Racossin, Esther L.; Swanson, Joel A.** Macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages., Journal Experimental Medical., 1989;170:1635-1648.
- Rodríguez, Pablo J.; Rosselot, Gastón.** Effects of zinc on cells proliferation and proteoglycan characteristics of epiphyseal chondrocytes. Journal of Cells Biochemistry, 2001;82:501-511.
- Roitt, Ivan M; Delves, Peter J.** Enciclopedia of Immunology. Academic Press, 1992; Vol.3.
- Roiit, Ivan; Brostff, Jonathan; Male, David.** Inmunología, 4a. edición, De. Harcourt Brace, 1997.
- Setchell BP; Brooks DE.** Anatomi vasculare, innervation and fluids of the male reproductive tract. In: The physiology of reproduction, edited by E. Knobil, J.D. Neill, L.L Ewing, G.S. Greenwald, C.L. Markert, and D.W. Pafaff. New York: Raven, 1998;753-835.
- Shankar, Anuraj H.; Prasad, Ananda S.** Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. American Journal of Clinical Nutrition, 1998;68(suppl):447S-63S.
- Sherman, Adria R.** Zinc, Copper and Iton Nutriture and Immunity. Journal Nutrition, 1992;122:604-609.
- Shirley C. Paski; Zhaoming Xu.** Labile intracellular zinc is associated with 3T3 cell growth. Journal of Nutritional Biochemistry, 2001;12:655-661.
- Simmer K. Y cinc de Thomson RP.** En el feto del recién nacido. Acta Paediatrica Scandinavica, 1985;319(Suppl):158-163.
- Stites, Daniel P., Abba Y; Parslow, Tristram G.** Inmunología básica y clínica, 9a. edición, Ed. El manual moderno, 1998(Cap 1,2,3):3-63.



---

**Swanson, Cristine A; King, Janet C, Zinc and pregnancy outcome**, Journal Clinical Nutrition 1987;46:763-771.

**Unanue, Emil R. Macrophages, antigen-presenting cells, and the phenomena of antigen handling and presentation**, Fundamental immunology. Third edition. Edited by William E. Paul. Raven Press. Ltd. New York, 1993.

**Valent Peter; Bettelheim Peter., Cells surface on human bashopils and mast cells: biochemical and functional characterization**, Advances in Immunology, 1992;52:333-423.

**Vallee BL; Falchuk KH, The biochemical basis of zinc physiology**, Physiology Review. 1993;73:79-118.

**Van Furth R. Production and migration of monocytes and kinetics of macrophages**; Monoclear phagocytes, 1992; 3-12.

**Vega Robledo, Gloria B, Patients with hepatic cirrhosis. Altered lymphocyte response to mitogens and its relation with plasmatic zinc, albumin and transferrin**, Archives of Medical Research, 1994;25(1):5-9.

**Vega Robledo, Gloria B, Oligoelementos**, Review Paídos 1997;4:8-14.

**Vega Robledo, Gloria B; Carrero, Julio C; Ortiz-Ortiz L, Effect of zinc on Entamoeba histolytic pathogenicity**, Parasitol Research, 1999;85:487-92.

**Verhoef Jan. Phagocytosis**. Encyclopedia of immunology. Roitt Ivan M., Academic Press, 1992; 1220-1222.

**Wellinghausen, Nele; Christoph, Driessen; Lothar, Rink, Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations**, Academic Press Limited 1996;8(18):767-771.

**Wellinghausen, Nele; Kirchner, Holger; Rink, Lothar, The Immunobiology of zinc**. Immunology Today, Novembre 1997; 18(11):519-21.

**Wellinghausen N., Immunobiology of gestational zinc deficiency**, British Journal of Nutrition, 2001;85 (suppl2):S81-6.

**William E. Pau . Fundamental Immunology**, Third edition, ed. Raven Press New York, 1993.



---

**Winchurch, Richard A; Thomás, David J; Adler, William H; Lindsay, Thomás J, Supplemental zinc restores antibody formation in cultures of aged spleen cells, The Journal of Immunology, 1984;133(2):569-571.**

**Yang, Jian-Ping; Merin, Jocelyn P.; Nakano Tatsunori; et al, Inhibition of the DNA-binding activity of NF-kB by gold compounds in vitro, FEBS Letters, 1995;361:89-96.**