



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACION CON ZINC SOBRE  
LA PRODUCCION DE IL-2 E IFN-GAMMA MURINOS EN  
ETAPAS PERINATALES

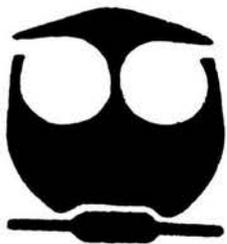
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA GUADALUPE CAMACHO IBARRA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:** Profa. Magdalena Acosta Segura

**Vocal:** Profa. Maria Dolores Lastra Azpilicueta

**Secretario:** Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre

**1er. Suplente:** Prof. Constantino III R. López Macías

**2do. Suplente:** Prof. Enrique Ortega Soto

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química. UNAM

**Asesor del tema:**

Profa. María Dolores Lastra Azpilicueta

Ma. Dolores Lastra

**Supervisor Técnico:**

Profa. Ana Esther Águilar Cárdenas

Ana Esther Águilar C

**Sustentante:**

María Guadalupe Camacho Ibarra

María Guadalupe Camacho Ibarra

## CONTENIDO

Abreviaturas.....	I
Resumen.....	II
1. Introducción.....	1
2. Generalidades.....	2
2.1. Inmunología nutricional.....	2
2.2. El zinc en el sistema inmune.....	3
2.3. Las etapas perinatales.....	5
2.3.1. Deficiencia de zinc.....	5
2.3.2. Suplementación con zinc.....	7
2.4. La respuesta Th1.....	10
2.5. La interleucina-2.....	13
2.6. El interferón-gamma.....	19
2.7. Ensayos inmunoenzimáticos.....	24
3. Justificación e hipótesis del estudio.....	26
4. Objetivos.....	27
5. Material y Métodos.....	28
6. Resultados.....	32
7. Discusión.....	47
8. Conclusiones.....	56
Bibliografía.....	57
Anexo.....	66

## ABREVIATURAS

ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
ARNm.....	Ácido ribonucleico mensajero
Con-A.....	Concanavalina A
EIA.....	Ensayo Inmunoenzimático
ELISA.....	Ensayo de enzima ligada a un inmunoabsorbente
GAF.....	Factor de activación del interferón gamma
GAS.....	Sitio activado por el gamma
GM-SCF.....	Factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago
HLA-A, B, C.....	Regiones A, B, C del complejo principal de histocompatibilidad
ICAM-1.....	Molécula de adhesión intercelular tipo 1
IFN- $\gamma$ .....	Interferón gamma
IFNGR1.....	Receptor de alta afinidad del interferón gamma
IFNGR2.....	Receptor de baja afinidad del interferon gamma
IL-2.....	Interleucina 2
IL-2R $\alpha$ .....	Cadena alfa del receptor para Interleucina-2
IL-2 $\beta$ .....	Cadena beta del receptor para Interleucina 2
iNOS.....	Óxido nítrico sintetasa inducible
IP <sub>3</sub> .....	Inositol trifosfato
JAK1, 2, 3.....	Proteína tirosina cinasa Janus 1, 2, 3
LAK.....	Células destructoras activadas por linfocina: células K y NK
MHC-I, II.....	Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad I, II
NF-AT.....	Factor nuclear activado por las células T
NF- $\kappa$ B.....	Factor nuclear $\kappa$ B
NK.....	Células asesinas naturales
PIP <sub>2</sub> .....	Fosfatidil inositol bifosfato
PKC.....	Proteína cinasa C
PLC- $\gamma$ .....	Fosfolipasa C-gamma
STAT1, 2, 4.....	Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción 1,2,4.
TCR.....	Receptor de la célula T
TGF $\beta$ .....	Factor transformante $\beta$
Th1.....	Linfocito T cooperador, subpoblación tipo 1
Th2.....	Linfocito T cooperador, subpoblación tipo 2
Tc.....	Linfocito T citotóxico
TNF- $\alpha$ .....	Factor de necrosis tumoral alfa
ZnT.....	Proteína transportadora de zinc

## RESUMEN

Desde hace muchos años se sabe que los oligoelementos juegan un papel muy importante en el desarrollo de los seres vivos ya que se involucran en diversos procesos bioquímicos y metabólicos. En estudios más específicos se ha demostrado que tales micronutrientes están involucrados en la respuesta inmunológica y que su deficiencia incrementa la susceptibilidad a diversas infecciones.

Siguiendo las investigaciones realizadas al respecto, sabemos que la deficiencia de zinc causa polarización entre las funciones de las células Th1 y Th2 por decremento en la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2.

El presente trabajo forma parte de un extenso estudio acerca de los efectos del zinc sobre el sistema inmunológico. El objetivo del mismo es establecer una relación entre el consumo de zinc y la producción de IL-2 e IFN-gamma por células del bazo de ratones de la cepa BALB/c en etapas perinatales. El modelo experimental consta de dos grupos: el grupo I recibió el suplemento de zinc desde la gestación hasta la lactancia (6 semanas) y el grupo II desde la gestación hasta 3 semanas posteriores al destete (9 semanas) mediante una solución de acetato de zinc a una concentración de 500 mg/L, administrada como agua de beber a los progenitores. Ambos grupos contaron con un grupo testigo el cual recibió agua desionizada durante los periodos correspondientes.

Se evaluó la producción de la IL-2 y del IFN-gamma por las células del bazo murino, para ello se realizó el cultivo celular con y sin estimulación por el mitógeno concanavalina A, se obtuvieron los sobrenadantes en los que se determinó la producción de ambas citocinas por medio de la técnica ELISA y se cuantificó por un espectrofotómetro lector de multipozos.

Con ello se pretende conocer la manera en que el zinc afecta a la respuesta inmunológica por inhibición o estimulación en la producción de las citocinas Th1, IL-2 e IFN-gamma, como factor modulador de la respuesta inmune celular.

Se encontró que la suplementación con zinc ocasiona un aumento en la producción de IL-2 e IFN-gamma, tanto a las seis como a las nueve semanas de tratamiento, aun sin necesidad de estimulación *in vitro*, lo cual sugiere un papel modulador del zinc que favorece la respuesta Th1.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las funciones de las células inmunes y sus productos, tales como las interleucinas, interferones y otras moléculas, dependen de reacciones metabólicas que emplean diversos nutrientes como cofactores críticos para sus acciones y actividades, por lo que la mayoría de los mecanismos de defensa del huésped se alteran con la desnutrición y deficiencia de microelementos y vitaminas. Particularmente sabemos que la deficiencia de zinc causa alteraciones sobre las funciones de las células Th1 y Th2 con disminución en la producción de IFN-gamma e IL-2.

Debido a que las edades perinatales constituyen un grupo susceptible a presentar desnutrición y deficiencia de microelementos, donde además los efectos nocivos consecuentes pueden resultar graves y hasta irreversibles, se hace indispensable diseñar esquemas de suplementación con dichos micronutrientes para evitar los efectos adversos. No obstante, antes de recomendarla deben conocerse sus repercusiones en el sistema inmune.

Dado que tanto la IL-2 como el IFN-gamma son producidos por las células Th1, los efectos del zinc sobre la producción de ambos, repercutirá en el tipo de respuesta que se desarrolle, afectando la capacidad del organismo para contender de manera adecuada ante una agresión. Por ejemplo, en infecciones intracelulares, las células Th1 tienen un efecto protector, mientras que en la producción de anticuerpos participan principalmente los linfocitos Th2.

## 2. Generalidades

### 2.1. Inmunología nutricional

El desarrollo normal de los humanos está determinado por el funcionamiento óptimo del organismo en todos sus niveles, los cuales dependen del estado nutricional del individuo, a través del metabolismo de los ácidos nucleicos, del metabolismo de los lípidos y de los carbohidratos y de la síntesis de proteínas, estos procesos se han visto fuertemente afectados por cambio en las concentraciones de zinc en el organismo. <sup>(2, 5, 10, 12, 18)</sup>

La mayoría de los mecanismos de defensa del hospedero se alteran con la desnutrición proteico calórica, lo mismo sucede en los casos de deficiencia de microelementos y de vitaminas. <sup>(2, 8, 10, 20, 22, 29)</sup> Aunque, la desnutrición humana generalmente es un síndrome mixto compuesto por múltiples deficiencias nutricionales (desnutrición proteico calórica, deficiencias de vitamina A, vitamina E, zinc, cobre, selenio, entre otros), que ocasionan el aumento de radicales libres implicados en el estrés oxidativo con repercusiones en las células inmunocompetentes, <sup>(12)</sup> también se han observado deficiencias aisladas de nutrientes con repercusiones similares. <sup>(18, 32)</sup> En el sistema inmune se han observado efectos importantes por cambios en la biodisponibilidad de diversos micronutrientes, la deficiencia de selenio se asocia con alteración de la fagocitosis, disminución de linfocitos T CD4+ e incremento de infecciones <sup>(25, 33)</sup>, la deficiencia de selenio y de cobre alteran las funciones de los linfocitos T y B <sup>(10, 33, 40)</sup>, mientras que el suplemento parenteral con selenio mejora las respuestas inmunes en personas con mala absorción intestinal. <sup>(60)</sup>

## 2.2. El zinc y el sistema inmune

El zinc tiene tres formas fundamentales de participar en los procesos bioquímicos: como ión estructural formando dedos de zinc en diversas proteínas, principalmente como factores de transcripción; como componente catalítico en más de 300 enzimas, vitaminas y hormonas <sup>(tabla 1)</sup> y como ión regulador, evitando la formación de radicales libres. <sup>(51,53)</sup> También se presenta su acción en la destrucción de elementos tóxicos como el cadmio que ingresa al organismo a través del humo del cigarro; <sup>(61)</sup> además de abarcar una serie de procesos metabólicos y bioquímicos importantes como la síntesis de proteínas y de diversas moléculas fundamentales para el sistema inmune.

Molécula	Participación del zinc
Fosfatasa alcalina	Estructura
Carboxipeptidasa	Estructura
Anhidrasa carbónica	Estructura
Procarboxipeptidasa	Estructura
Dehidrogenasa alcohólica	Cofactor: por unión del zinc a la coenzima NAD <sup>+</sup> al sitio activo de la enzima.
Deshidrogenasa málica	Estructura
Deshidrogenasa alcohólica	Estructura
Retino reductasa en la retina	Metaloenzima dependiente de zinc
Vitamina A	El zinc participa en su metabolismo
Angiotensina	Es dependiente de zinc.
Insulina	El zinc forma complejos con ella, interviniendo en su almacenamiento, liberación y acción.
FCI-1	El zinc regula este sistema hormonal de crecimiento.

**Tabla 1.** Participación del zinc en moléculas biológicamente activas. <sup>(48, 51, 53)</sup>

La distribución tisular del zinc depende de los glucocorticoides y de los estrógenos, los primeros favorecen su captación, aumentando la concentración en hígado, eritrocitos, útero y riñón, mientras que los segundos disminuyen los niveles plasmáticos y la captación hepática. En el cuerpo existen entre 2 y 3 gramos de este micronutriente y se encuentra almacenado como complejo 7S en el factor TFIIIA, el cuál tiene de 7-11 átomos de zinc unidos a cisteína e histidina, formando 9 dominios similares con aproximadamente 30 aminoácidos cada uno. Este factor TFIIIA actúa como ligando para algunos aminoácidos, incluyendo la histidina y cisteína; ayuda a las nucleoproteínas para dar estabilidad estructural al RNA en la síntesis de proteínas. Los tejidos que tienen la mayor cantidad de zinc son los huesos, el hígado, la próstata y los testículos.

El zinc se puede administrar al organismo por medio del consumo de carnes, vísceras como el hígado, pescados y mariscos, lácteos, yema de huevo, principalmente. La adición de leche, yogurt y quizá otras proteínas de origen animal aumentan la absorción de zinc de dietas basadas en alimentos de origen vegetal.<sup>(93)</sup>

Numerosos estudios han demostrado la participación del zinc en varios aspectos del sistema inmune, desde de la piel hasta la regulación de genes dentro de los linfocitos (tabla 2): es esencial para el funcionamiento normal de las células que median la inmunidad no-específica, tal como neutrófilos y células NK;<sup>(14)</sup> el desarrollo de linfocitos B y la producción de anticuerpos, particularmente de la inmunoglobulina G,<sup>(62, 63)</sup> afecta las funciones del macrófago, lo cual puede impedir la eliminación intracelular, la producción de citocinas y la fagocitosis;<sup>(8, 18)</sup> altera la respuesta humoral primaria y secundaria y juega un papel importante en el crecimiento, desarrollo y función de células NK, neutrófilos y linfocitos T y B.<sup>(79)</sup>

## 2.3. Etapas perinatales

### 2.3.1. Deficiencia de zinc

En las etapas perinatales los efectos pueden ser más significativos, la deficiencia moderada de zinc en los niños mexicanos aumenta la incidencia de enfermedades infecciosas y muy probablemente disminuye el desarrollo neurocognitivo. En estudios realizados en la India, se ha observado que menos del 67% en niños de bajo peso al nacer suplementados con zinc, logran sobrevivir. <sup>(42, 75)</sup> En el embarazo normal el zinc plasmático disminuye, quizá debido a efectos endocrinos y de expansión del volumen circulante y la cantidad total de zinc en el compartimiento plasmático permanece constante o puede haber disminución de zinc en los leucocitos, si bien, puede ser solo el reflejo de cambios en las proporciones de los subgrupos de estas células durante el embarazo y ser en sí, una deficiencia. <sup>(36, 59)</sup> En embarazos anormales y trastornos del crecimiento fetal puede haber cambios de zinc plasmático. También se han encontrado efectos positivos en el crecimiento lineal y ponderal de niños suplementados con zinc. <sup>(75)</sup>

La deficiencia de zinc genera atrofia linfoide, reduce las respuestas de los linfocitos y la hipersensibilidad cutánea. <sup>(5, 8, 14, 22, 29)</sup>

Estos efectos en los mediadores inmunológicos son debidos a la participación del zinc en las funciones básicas celulares, tales como la replicación de ADN, la transcripción de ARN, la división celular, y la activación celular. También, la apoptosis o muerte programada de células está potenciada por la deficiencia de zinc.

Mientras que la suplementación con este metal ayuda a una más rápida cicatrización de las heridas, alivia alergias y aumenta la inmunidad natural contra infecciones bacterianas, ocasionando una disminución significativa en la severidad de diarreas e infecciones respiratorias en los niños. <sup>(8)</sup>

En América latina se observó que la suplementación con zinc disminuye a menos del 41% la incidencia de neumonías y hasta en un 25% la prevalencia de diarrea. <sup>(90)</sup> En México, aproximadamente el 25% de las poblaciones estudiadas presenta deficiencia de zinc asociada principalmente a una dieta con baja biodisponibilidad. Generalmente, el zinc se encuentra en niveles bajos en los individuos que comen muchos cereales, pero pocas proteínas de origen animal ya que los cereales contienen ácido fítico que se adhiere al zinc e impide su absorción en el aparato digestivo. <sup>(30, 36,37, 93.)</sup>

Los síntomas clínicos de la deficiencia de zinc ocurren cuándo los niveles de zinc en plasma disminuyen hasta menos de 650µg/L (0.65ppm).

La deficiencia de zinc está asociada con dermatitis, dificultades en la curación de lesiones, atrasos de crecimiento, desarrollo y pubertad, y reducción de gusto. Los niveles menores de 330 µg/L (0.33ppm), se asocian con la falta del gusto y del olfato, con dolores abdominales, diarrea, erupciones cutáneas y falta de apetito.

La deficiencia de zinc está asociada a numerosas enfermedades, infecciones, neoplasias y enfermedades autoinmunes. En la enfermedad de Crohn, los niveles bajos de zinc en suero pueden causar síntomas, como acrodermatitis enteropática cuyas principales consecuencias son la deficiencia de linfocitos T y B y alteraciones en la función de los neutrófilos; también se puede presentar disfunción retinal. Ambas pueden ser corregidas con suplementos de zinc. <sup>(45)</sup>

Otra enfermedad relacionada con la deficiencia de zinc es la anorexia nerviosa, varios estudios han indicado que el alto número de mujeres que padecen esta enfermedad, puede tener niveles bajos de zinc en suero, ya que ellas prefieren alimentos con bajo contenido de zinc de tal manera que cuando se administra un suplemento de zinc presentan mejorías clínicas tales como la reducción de la depresión y del ansia y con el aumento de peso. <sup>(11)</sup>

### 2.3.2. La suplementación con zinc

Dado que el consumo de zinc resulta de suma importancia para la salud del individuo y puesto que las dietas alimenticias acostumbradas en nuestro país, generalmente no lo aportan en una cantidad suficiente, ya sea por baja ingesta o por reducción en la biodisponibilidad según presencia de otros alimentos, la suplementación con este micronutriente adquiere importancia y se ha visto que la absorción fraccional de zinc en la tortilla es del 22% en mujeres adultas y la adición de hierro a ésta, no afecta la absorción de zinc. Mientras que el zinc adicionado a la tortilla se absorbe adecuadamente y puede usarse óxido de zinc que es más estable. <sup>(17, 27, 71)</sup>

Los estudios de suplementación con zinc que se han realizado, han demostrado la reversión de los efectos debidos a la deficiencia de este elemento como son las complicaciones asociadas con el embarazo, la disminución del peso al nacer y en la circunferencia cefálica. <sup>(2, 7, 17, 27, 40, 41, 59, 70, 73)</sup>

En nuestro país, una de las evidencias más claras del deterioro en el estado nutricional de los niños es la alta prevalencia de retraso en el crecimiento, que especialmente se muestra como un retraso en la talla para la edad. Con el fin de evaluar si el zinc podría desempeñar un papel etiológico importante en este fenómeno, Rosado y colaboradores, <sup>(74)</sup> realizaron un estudio de suplementación con zinc (20mg/día), en niños entre 12 y 36 meses de edad, en una comunidad rural del Estado de México, contrario a lo observado en otros estudios, no se encontró un cambio significativo en ninguno de los indicadores antropométricos, lo cuál probablemente se deba a que el retraso en el crecimiento de los niños en nuestro país puede ser la resultante del efecto de la deficiencia moderada de varios nutrientes, siendo las más comunes la de hierro, riboflavina, vitamina B12, vitamina E, zinc y vitamina A, por lo que la suplementación con uno solo de ellos, solo tiene un efecto parcial. También se sabe que el efecto positivo de la suplementación con zinc en el crecimiento es más evidente cuando el retraso en el crecimiento es mayor y/o cuando los niveles de zinc en plasma son muy bajos. <sup>(40, 41, 59, 73)</sup>

En el laboratorio de investigación en inmunología, se han desarrollado varios trabajos en los que se han evaluado los efectos del zinc en la respuesta inmune, se estudió el efecto del zinc como inmunomodulador, según su participación en la linfoproliferación y se encontró que a dosis adecuadas en tiempos controlados es una alternativa para revertir trastornos ocasionados por inmunodeficiencias fisiológicas. En estos trabajos se encontraron datos importantes, tales como que el zinc tiene un efecto mitogénico sobre esplenocitos; estimula la respuesta inmune humoral IgM; aumenta la capacidad reductora de los macrófagos; inhibe la involución del timo; <sup>(38)</sup> aumenta la producción de IL-1 $\alpha$  y el TNF- $\alpha$  por macrófagos; aumenta la expresión del gen para IL-1 $\alpha$ , y el TNF- $\alpha$ . <sup>(39)</sup> La concentración en útero y placenta aumentan y el número de embriones viables es mayor, recientemente se observó que aumenta el número de células secretoras de IFN-gamma. <sup>(44)</sup> Todos estos efectos durante las etapas perinatales, entre las 3 y 6 semanas de edad, ya que la susceptibilidad de la respuesta inmune a una manipulación es mayor en etapas gestacionales, que después que dicha respuesta inmune ha sido desarrollada.

Por otro lado, es conveniente destacar que el consumo de este elemento en exceso como suplemento terapéutico, aun en concentraciones mínimas, puede tener resultados adversos. En seres humanos, la ingesta de 300mg/d ocasiona alteraciones en el perfil de lípidos de la sangre (aumento en lipoproteínas de baja densidad y disminución en lipoproteínas de alta densidad) y en la respuesta inmunológica por depresión en el índice de proliferación, la migración quimiotáctica y la ingestión bacteriana de en linfocitos. Tanto en células K, NK y T, el exceso de zinc es capaz de reducir los tipos de toxicidad mediados por estas células, <sup>(12,29)</sup> sin embargo los mecanismos de la acción inmunodepresora producida por el exceso de zinc aún no han sido completamente investigados.

Por estas razones, el zinc debe considerarse un micronutriente indispensable para el desarrollo y la salud de los individuos y los programas de intervención con zinc no deben considerarse en forma aislada <sup>(73)</sup>, ya que la deficiencia de zinc también está asociada a las deficiencias de otros oligoelementos como son el cobre cuya deficiencia disminuye la actividad bactericida de neutrófilos; el selenio, cuya deficiencia disminuye la respuesta inmune humoral y disminuye la actividad de la glutatión peroxidasa de células fagocíticas; el yodo cuya deficiencia se asocia a la disminución en la función de linfocitos y neutrófilos; el cobalto, el cadmio y el arsénico relacionados con alteraciones inmunológicas *in vitro*. (17, 33, 35, 40)

En la tabla 2 se resumen los principales efectos del zinc en las funciones del sistema inmune, que se han expuesto.

Efectos de la deficiencia de zinc	Efectos de la suplementación con zinc	
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Involución tímica	Reversión de la involución tímica	Aumenta la función de neutrófilos
Disminución en la cuenta de timocitos	Aumentan los niveles de timulina	Aumenta la producción de IL-2 en células Th1 periféricas de adultos sanos
Disminución de los niveles de timulina en suero	Aumenta el número de células secretoras de timulina	Aumenta la producción de IFN- $\gamma$ por cultivos de leucocitos
Dismutación de la hipersensibilidad retardada	Aumenta la actividad de NK	Aumenta la expresión del receptor de IL-2
Disminución en la cuenta de células T periféricas	Aumenta la respuesta proliferativa de células T a PHA	Aumenta el número de células secretoras de timulina en timos maduros
Disminución de la respuesta proliferativa de células T a PHA	Aumenta la cuenta de células T periféricas	Aumenta la producción de timulina de cultivo de timos maduros
Disminución de la actividad citotóxica de células T	Aumenta la reparación de DNA	Disminuye la apoptosis de linfocitos T periféricos en población adulta.
Disminución de la función de células Th	Aumenta el conteo de células CD4- en poblaciones maduras	Disminuye la apoptosis de timocitos en edades mayores
Disminución de la actividad de NK	Disminuye infecciones en sujetos con síndrome de Down	Disminuye el número de células T aloreactivas.
Disminución de la función de macrófagos (fagocitosis, citotoxicidad intracelular)	Aumentan las funciones cognitivas en sujetos con síndrome de Down	
Disminución de la función de neutrófilos (especies reactivas de oxígeno, quimiotáxis)	Aumenta la supervivencia de ratones viejos	
Disminución en la formación de anticuerpos	Beneficios clínicos en enfermedad de Crohn	
Disminuyen IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$	Beneficios clínicos en artritis reumatoide	
Aumentan IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$	Restauración de la producción de anticuerpos	
Aumenta apoptosis tímica		
Alteración en rutas extratímicas de células T		
Reduce la reparación de DNA		

**Tabla 2.** Efectos del zinc en las funciones del sistema inmune. <sup>(47)</sup>

## 2.4. La respuesta Th1

Los linfocitos T colaboradores (Th) son células que, después de haber reconocido un antígeno, expresan una respuesta para modular y/o dirigir la reactividad que tienen los otros linfocitos que han sido sensibilizados por los mismos determinantes, aumentando con ello la respuesta inmunitaria frente a ese antígeno. Esta forma de colaboración la llevan a cabo liberando citocinas que actúan estimulando o suprimiendo la proliferación y la diferenciación de los otros linfocitos, así como estableciendo interacciones con las células de los otros sistemas, el nervioso y el endocrino.

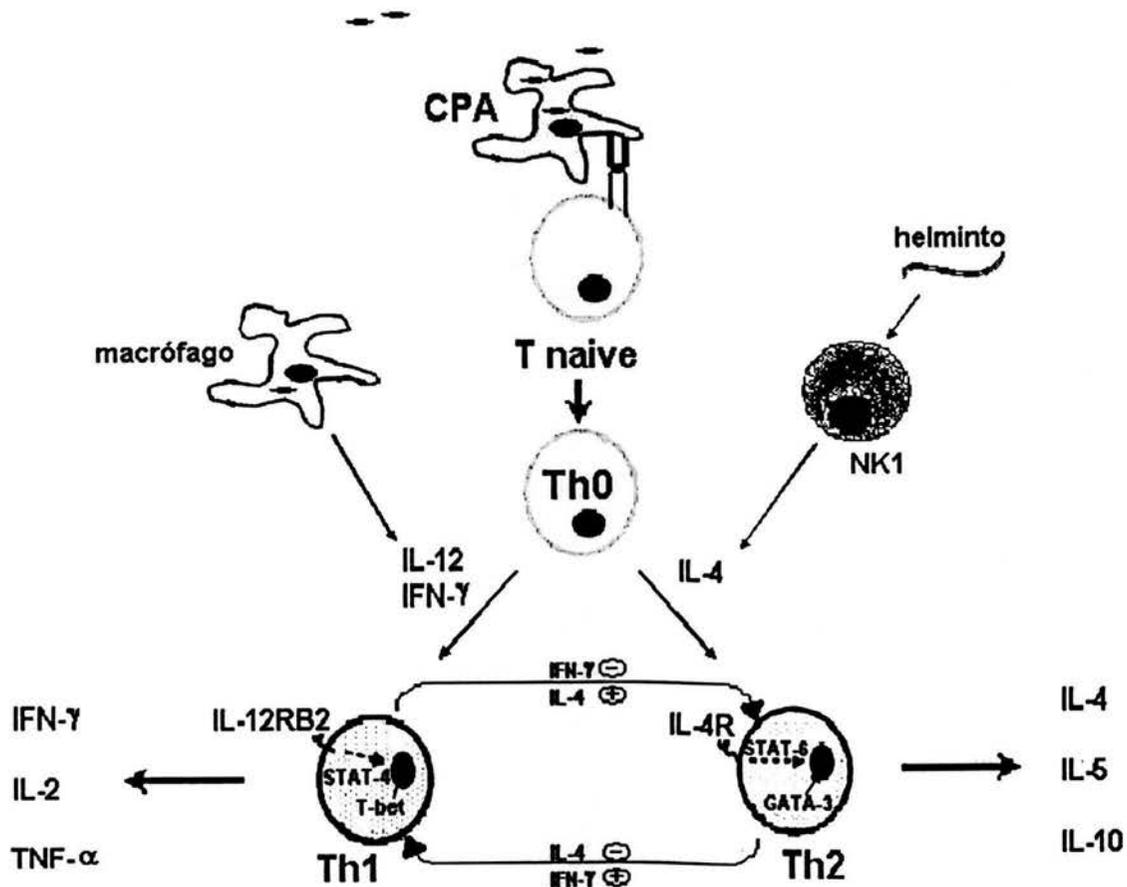
Los linfocitos Th se clasifican según el tipo o la clase de respuesta con la cual colaboran en linfocitos Th1 y linfocitos Th2 ambos, expresan sobre su membrana el antígeno CD4, sin embargo, el receptor de IL-12 (IL-12R $\beta$ 2) y el receptor para la IL-18 (IL-18R), son selectivamente expresados por células Th1, son producidos en presencia de niveles altos de IL-12 y producen de manera permanente, IL-2, IFN- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral alfa, linfotóxica, y otras citocinas que promueven las respuestas inmunes contra los patógenos intracelulares e inhiben la síntesis de IgE por parte de las células B, activan a los fagocitos en macrófagos, inducen anticuerpos IgG2a, tienden a antagonizar las respuestas inflamatorias alérgicas estimuladas por las citocinas del tipo Th2, estimulan a los linfocitos T citotóxicos y promueven respuestas de hipersensibilidad retardada. Mientras que las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. <sup>(1)</sup> y está dirigida a los antígenos solubles que se encuentran fuera del citoplasma de las células, estimulan predominantemente a los linfocitos B, promueven el desarrollo de las células cebadas y de los eosinófilos y está relacionada con las reacciones de hipersensibilidad inmediata.

La diferenciación polarizada de las clonas de células Th hacia los subtipos Th1 o Th2, además de las citocinas presentes en el sitio blanco, es dirigida por varios factores, como el tipo de célula presentadora de antígeno, la cantidad de antígeno, las moléculas coestimuladoras expresadas, la afinidad y la duración de la exposición.

Las células B naive estimuladas en una forma dependiente de antígeno con secreción de citocinas polarizada de células T efectoras, pueden ser inducidas para diferenciarse hacia dos tipos de células B efectoras, por ejemplo, Be1 secretan IFN-gamma y otras citocinas; Be2 secreta IL-4 y otras citocinas, regulando así el desarrollo hacia células Th1 y Th2 por el antagonismo existente entre estas citocinas que favorecen un tipo de diferenciación respectivamente.

La diferenciación hacia células Th1 es dirigida por la IL-12, la cuál es producida por macrófagos activados y células dendríticas. Esta inducción de la diferenciación hacia células Th1 se da a través de STAT4 (Transductor de señal y activador de la transcripción 4), mientras que la diferenciación hacia células Th2 requiere la respuesta del factor de transcripción STAT6 para la IL-4. La acción sinérgica de la IL-18 con la IL-12 induce la producción de IFN-gamma. <sup>(65)</sup> Esta acción sinérgica de la IL-18 es mediada por el receptor de la IL-1 asociado a la ruta de las cinasas, no por STAT4 que induce la translocación nuclear del complejo de NF-kB selectivamente en células Th1. Protooncogenes adicionales, cinasas y factores de transcripción han sido implicados en la diferenciación Th1/Th2, induciendo interferón regularmente, factor 1 y la expresión de T-bet. La ruta JNK/MAPCinasa es inducida en células efectoras Th1 y no en las células efectoras Th2, en éstas se induce el prooncogen c-Maf y el GATA3. <sup>(7)</sup>

Probablemente, las dos subpoblaciones de linfocitos, Th1 y Th2 proceden de células que expresan un fenotipo común, Th0, capaz de sintetizar todas las diferentes citocinas que, más adelante, solo van a ser producidas por uno u otro tipo de célula colaboradora. La clasificación de las dos subpoblaciones de linfocitos Th de acuerdo a su capacidad para producir citocinas no se traduce en una separación operacional absoluta ya que, si bien, los patrones de citocinas producidas son diferentes, eso no distingue completamente sus funciones. <sup>(Figura 1)</sup>



**Fig. 1. Generación de los subgrupos CD4 Th1 y Th2:** Después de la estimulación inicial de las células T, se generan diversas células que producen un espectro muy amplio de citocinas. Bajo diferentes condiciones, la población resultante se inclina hacia un tipo específico: en presencia de IL-12, producida por macrófagos en una infección intracelular, se favorece el desarrollo de células Th1, que producen las citocinas características de la inmunidad mediada por células. La IL-4, producida por la interacción de microorganismos con el receptor tipo lectina NK1.1 en células con baja afinidad de TCR2 o por la misma célula Th0, inclina el desarrollo hacia la generación de células Th2 cuyas citocinas contribuyen a la progresión de los linfocitos B hacia células secretoras de anticuerpos y al desarrollo de la inmunidad humoral. Las citocinas Th1 y Th2 polarizadas son mutuamente inhibitorias. <sup>(1, 72, 76)</sup>

## 2.5. La interleucina 2

La IL-2 es un factor de crecimiento autocrino y paracrino que secretan los linfocitos T activados. Se considera una citosina reguladora importante por su función esencial en la proliferación clonal de las células T, sus efectos sobre la producción de citosina, sobre las propiedades funcionales de las células B, macrófagos y células NK. (Fig. 2)

La molécula de IL-2 es un polipéptido con un peso molecular de 1544 kDa con 133 aminoácidos de largo, codificada por un gen único en el cromosoma 4 humano. Puede glucosilarse a diversos grados con producción de especies de peso molecular más alto, aunque las cadenas laterales glucosiladas no son necesarias para la función. Su secuencia de aminoácidos no tiene semejanza con la de cualquier otra citosina conocida, aunque tiene una estructura tridimensional similar a la de IL-4 y GM-CSF. La IL-2 es una proteína globular constituida por dos hélices alfa, la cual se mantiene en parte por un enlace disulfuro único entre las cadenas, que es esencial para la actividad biológica.

Los linfocitos T en reposo no sintetizan ni secretan IL-2, pero se les puede inducir a ambas cosas mediante combinaciones apropiadas de antígeno y factores coestimulantes, o por exposición a antígenos policlonales y a mitógenos como la concanavalina A y la fitohemaglutinina (Con A, PHA).

La producción de IL-2 originada por antígeno, ocurre principalmente en las células Th CD4. No obstante, también puede lograrse que los linfocitos CD8 y algunas células NK secreten IL-2 en ciertas condiciones.

Los receptores de la IL-2.

La transcripción del gen del receptor de la IL-2 es otro de los componentes importantes de la activación de las células T. Esto es necesario para que tenga lugar el mecanismo autocrino de estimulación del crecimiento de las células T mediado por la IL-2 que ellas mismas están secretando durante su activación.

El crecimiento inducido por la IL-2 en las células T requiere la formación de un complejo trimolecular en la superficie de los linfocitos T, compuesto de la citocina y

de dos proteínas integrales de membrana con función receptora, de 55 y 75 KDa. La estimulación mediada por TCR de la célula T conlleva un incremento en la expresión de la subunidad de 55Kda (p55) del receptor de la IL-2. Esta respuesta se debe en parte a un incremento en la expresión del correspondiente gen y no depende de una síntesis de proteínas nuevas. Los ligandos de TCR-CD3 hacen que las células entren en el ciclo celular pero no que progresen de la fase G1 a S ("factores de competencia"), mientras que IL-2 se ha denominado "factor de progresión" porque hace que las células alcancen la fase S.

El receptor de la IL-2 de alta afinidad, no se expresa en células T en reposo, pero alcanza sus valores máximos en un plazo de 2 a 3 días después de que las células se activan. La declinación de la expresión del IL-2R, se inicia independientemente de que haya IL-2 presente, lo cual indica que se regula de manera autónoma. Esto asegura que después de unos días la célula se vuelva refractaria a la IL-2, de tal manera que cese la proliferación clonal.

El receptor de alta afinidad de la IL-2 consiste en un complejo de tres polipéptidos distintos integrantes de membrana, designados como alfa, beta y gamma. La cadena IL-2R alfa (llamado también Tac, CD25 o p55), fija IL-2 con escasa afinidad. Y no da lugar a señalamiento, la cuál se requiere para la homeostasia normal de la célula T. Los otros componentes del IL-2R, la cadena IL-2R beta (p75) y la cadena IL-2R gamma (p64), son transductores de la señal. Ambas proteínas enlazan otras citocinas además de la IL-2. La cadena IL-2R beta, enlaza la IL-2 con afinidad intermedia, mientras que la cadena gamma (p64), por sí misma no enlaza a la IL-2. Los complejos receptores constituidos por heterodímeros alfa/gamma y beta/gamma, enlazan IL-2 con afinidad mayor, pero menor a la del heterodímero alfa/beta/gamma. La IL-15 también puede mediar la transducción de la señal a través de dímeros beta/gamma, pero es un estimulante más eficaz cuando enlaza a un heterodímero constituido por cadenas IL-2R beta y gamma y una cadena singular IL-15R alfa. La cadena de IL-2R gamma también es un componente fundamental de los complejos de receptor IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-13R e IL-15R.

El IL-2R se vincula con Jak1 y Jak3, que enlazan subunidades alfa y gamma respectivamente. El enlace de la citosina aproxima a las subunidades del receptor y

permite que las proteínas Jak se fosforilen y activen entre sí. Los sustratos primarios de los Jak activados son una familia de factores de transcripción llamados proteínas STAT, (transductores de la señal y activadores de la transcripción), las proteínas STAT contiene dominios SH2 Como consecuencia los factores STAT se fosforilan y esto hace que se dimericen y enseguida se trasladen al núcleo, donde actúan para promover directamente la expresión de genes específicos.

Vías de señalización.

Varias regiones citoplasmáticas diferentes de las cadenas IL-2R beta pueden estar implicadas en el señalamiento celular mediado por IL-2.

La vía de señalamiento Ras puede iniciarse por proteínas citosólicas llamadas cinasas de la familia Src, éstas contienen dominios de proteínas especializadas llamadas dominios SH2 (región 2 de homología de src), los cuales les permiten fijar otras proteínas que contienen dominios fosforilados de tirosina. Cuando un receptor de citosina enlaza al ligando, las subunidades del receptor se fosforilan y pueden enlazarse de inmediato por una cinasa de la familia Src. Esta interacción conduce al enlace de otras proteínas citoplasmáticas, de tal manera que en la cara interior de la membrana celular se forma un complejo de señalamiento de componentes múltiples. Este complejo luego activa proteínas de la familia Ras, cada una de las cuales tiene actividad intrínseca de GTPasa. La ruptura del trifosfato de guanosina (GTP), a difosfato de guanosina (GDP), por las proteínas de la familia Ras, induce un cambio estructural que de algún modo desencadena la activación de la cinasa Raf. Esto a su vez activa las proteincinasas llamadas Mek y a la MAPK (proteincinasa relacionada con la mitosis), que se fosforilan y activan entre sí en secuencia. Una vez activa la MAPK migra al interior del núcleo donde fosforila a las proteínas reguladoras de la transcripción controladoras de genes específicos. Entre los efectos de la activación de MAPK, se encuentra el aumento de la proliferación celular, activación de genes y cambios en la organización y función de las células hematopoyéticas.

La actividad de componentes individuales de la vía Ras también puede aumentarse o inhibirse por otros factores de señalamiento en las células. Además el

señalamiento a través de la vía Ras, también puede afectar las funciones celulares sin importar la de la MAPK. Un ejemplo es la regulación del NF- $\kappa$ B que controla las actividades de muchos genes implicados en la función hematopoyética celular. El NF- $\kappa$ B debe penetrar al núcleo para poder actuar, pero por lo común se retiene en el citoplasma por su interacción con una proteína citoplasmática inhibidora I $\kappa$ B. La vía Ras conduce a la fosforilación de I $\kappa$ B, lo que permite que NF- $\kappa$ B se disocie, para introducirse al núcleo y activar sus genes blanco. A través de esta vía, el NF- $\kappa$ B media muchos efectos de las citocinas sobre la expresión de genes. El gen de IL-2 contiene en el área del promotor un segmento corto de DNA de 275pb que incluye numerosas rutas de señalización tanto para la síntesis de IL-2 como para la activación y proliferación de linfocitos T; contiene además, un sitio de origen para el factor NF- $\kappa$ B.

Los factores NF- $\kappa$ B son rápidamente inducidos por una gran variedad de estímulos activantes de células T. Casi todos los estímulos que dirigen la activación de células T, también activan NF- $\kappa$ B. La inducción de la expresión del gen del receptor para IL-2, también está mediada por la inducción nuclear de la expresión de NF- $\kappa$ B. Este factor es un inductor potenciador de la unión a DNA, que correlaciona con el aumento en la transcripción del gen.

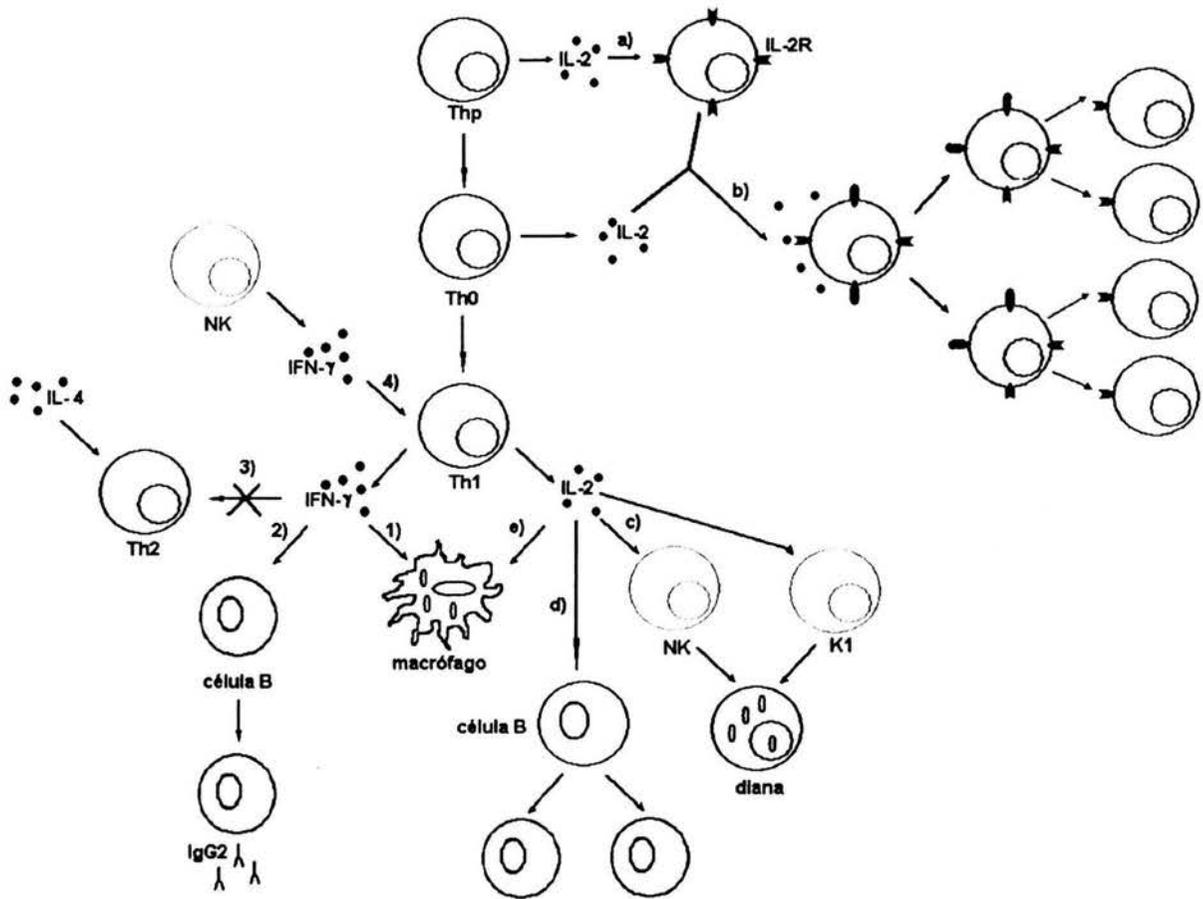
La expresión de numerosos genes es controlada por NF- $\kappa$ B, entre los cuales, varios codifican para citocinas, factores de crecimiento, quimiocinas y mensajeros biológicos, que a su vez, coordinan y controlan las funciones de numerosas células. Entre ellas también se cuenta al IFN-gamma. <sup>(Figura 3)</sup>

Efectos de la IL-2.

Cuando se exponen a estímulos activadores apropiados, los linfocitos T CD4 en reposo comienzan a expresar tanto IL-2 como IL-2R de superficie y poco después empiezan a proliferar. La interferencia con la IL-2 o su receptor (por ejemplo con anticuerpos específicos), impide la respuesta proliferativa. Las células T CD8 casi nunca pueden producir cantidades adecuadas de IL-2 y por lo tanto, requieren IL-2 exógena de células cooperadoras para proliferar. Las células T estimuladas por

IL-2 muestran un aumento de citotoxicidad y producen linfocinas del tipo IFN-gamma, TNF-beta y TGF beta, factores de crecimiento de células B, como IL-4, IL-6 y factores de crecimiento hematopoyético como IL-3, IL-5 y GM-SCF.

Las células NK son singulares entre las células linfoides en lo referente a que expresan constitutivamente IL-2R y por lo tanto, siempre responden a IL-2 incluso en estado de reposo. Puesto que solo expresan las cadenas beta y gamma, las células NK enlazan IL-2 con una afinidad más o menos escasa, y proliferan solo en respuesta a concentraciones correspondientemente más grandes de IL-2. No obstante, una vez estimuladas las células NK empiezan a expresar la cadena alfa del IL-2R y adquieren receptores de alta afinidad. Las células NK activadas por IL-2 tienen actividad citolítica aumentada y secretan múltiples citocinas (IFN-gamma, GM-SCF y TNF-alfa) que son potentes activadores de macrófagos. Los linfocitos B activados o transformados expresan IL-2R de alta afinidad en un 30% comparado con los linfocitos T. La IL-2 aumenta la proliferación y secreción de anticuerpos por las células B normales, aunque a concentraciones 2 a 3 veces mayores que las requeridas para obtener respuestas de células T. También influye en el cambio de clase de cadena H y desvía a las células B hacia la expresión de anticuerpos IgG2. Los monocitos y macrófagos expresan de manera constitutiva valores escasos de IL-2R beta, pero expresan por inducción, receptores de alta afinidad que contienen las tres cadenas, al exponerse a IL-2, IFN-gamma u otras sustancias activantes. La exposición continua de un macrófago activado a grandes concentraciones de IL-2, aumenta sus actividades microbicida y citotóxica también puede activar a los neutrófilos.



**Fig. 2. Funciones de las citocinas Th1: IL-2.** a)Inducción de la expresión del IL-2R: los linfocitos T activados que expresan receptores superficiales para la IL-2 proliferan por la respuesta a la IL-2 producida por ellos mismos o por otro subgrupo celular T. b)Expansión clonal: La expansión es controlada a través de la inhibición del receptor de IL-2 por la misma IL-2, la población expandida secreta una gran variedad de citocinas biológicamente activas, de las cuáles, también la IL-4 intensifica la proliferación de células T. c)Activación de células LAK para intensificar la destrucción de las células dianas. d)Proliferación de células B activadas. e)Activación de macrófagos: en combinación con el IFN-gamma, el TNF y el GM-CSF; con lo que el macrófago adquiere capacidad microbicida. **IFN-gamma:** 1)Activación de macrófagos: y expresión de las clases I y II del MHC en macrófagos y otras células 2)Síntesis de IgG2a por células B activadas. 3)Antagonismo de varias funciones de la IL-4: inhibe la proliferación de las clonas de células Th2 4)Diferenciación de células Th hacia Th1: junto con IL-12 favorece el desarrollo de linfocitos Th1 5)Antivirósico: impide el acceso del virus a la maquinaria replicativa de la célula por la activación de sintetasas y de receptores TNF. (1, 3, 72, 85)

## 2.6. El interferón gamma

Los interferones constituyen un conjunto de biomoléculas reconocidas como citocinas, que participan en los mecanismos naturales de defensa de los seres vivos, según tres actividades principales: como inmunomoduladores, antivirales y antiproliferativos.

Los interferones se clasifican por el tipo de estructura genética y protéica:

Interferones tipo I: alfa o leucocitario, beta o fibroblástico, delta, omega y tau. Estos interferones tienen como características principales ser codificados por genes múltiples sin intrones, son proteínas monoméricas y son estables a pH ácido.

Interferones tipo II: interferón gamma o inmune, codificado por un gen simple de tres intrones ubicado en el brazo largo del cromosoma 12 humano. Tiene como características principales ser una proteína dimerica, expresada por células T y un número limitado de otras células, es inestable a un pH ácido.

Los interferones ejercen su acción biológica a través de dos tipos de receptores diferentes. Todos los interferones tipo I se unen al mismo receptor, mientras que el IFN-gamma se une a otro tipo de receptor ubicado en la superficie de la célula, para activar mecanismos de señalización citoplasmática que resulta en la estimulación o modulación de la expresión de genes que codifican para diversas proteínas que determinan la gran variedad de acciones biológicas de los interferones.

El receptor del interferón gamma.

Es secretado por células NK ante diferentes estímulos como la IL-12 y el TNF-alfa, derivados del macrófago o por estimulación del propio IFN-gamma liberado por células Th1 y CD8+.

Está formado por dos cadenas polipeptídicas IFNGR1, cadena alfa o CD119w y la cadena IFNGR2 cadena beta o factor accesorio.

La cadena IFNGR1 está codificada en el cromosoma 6 humano y es fundamental para el reconocimiento del ligando, en la incorporación de éste a la célula y en la transducción de señales. La IFNGR2 se encuentra codificada en el cromosoma 21 y

tiene una participación relevante en la estabilización del complejo ligando-receptor y en el proceso de señalización.

Cada una de estas cadenas polipeptídicas se encuentra asociada a un miembro de la familia de proteínas cinasas Janus de residuos de tirosina (JAK). Ambas cadenas se expresan de manera constitutiva aunque la cadena IFN $\gamma$ R2 se expresa en niveles muy bajos y presenta menor afinidad que el IFN $\gamma$ R1.

En el proceso de señalización están involucrados dos tipos de proteínas, las JAKs y las STAT1: proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción.

Las STAT se encuentran en forma de monómeros en el citosol con dominios SH<sub>2</sub> necesarios para establecer su unión con la cadena IFN $\gamma$ R, su activación se da por la fosforilación de un residuo de tirosina llevado a cabo por las JAKs, las STAT1 activadas forman homodímeros llamados GAF, factor de activación del interferón gamma, éste se incorpora al núcleo a través de un complejo de poros a nivel del núcleo (CPN) y se favorece por dos proteínas transportadoras alfa y beta, este mecanismo requiere energía que involucra a la GTPasa Ran. Una vez en el núcleo, el GAF se une a un segmento denominado sitio activado por el gamma (GAS) generándose una respuesta primaria que involucra la expresión de algunos genes que forman parte de factores transcripcionales necesarios para establecer una respuesta secundaria, dando lugar a la expresión de proteínas. Por ejemplo, IRF-1, factor regulatorio del IFN, que regula la expresión de la enzima inducible óxido nítrico sintetasa (iNOS) regulado por STAT6. (Figura 3)

La función biológica del IFN-gamma puede ser afectada por las modificaciones estructurales del receptor, así como cualquier modificación que ocurra a nivel de las proteínas que participan en los mecanismos de señalización. (57)

En las células Th1 diferenciadas, la expresión del interferón gamma puede ocurrir por dos vías diferentes: 1) por la estimulación del receptor de las células T (TCR) o 2) por la inducción por citocinas como la IL-12 y la IL-18, que aumenta la producción de interferón gamma, sin embargo, a diferencia de la IL-12, es incapaz de inducir la diferenciación de las células T naive a células Th1; la combinación de IL-12 e IL-18 induce la producción de interferón gamma en ausencia de la estimulación del TCR. Para la inducción de la expresión del interferón gamma por las citocinas IL-12 e

IL-18, se sabe que hay una fuerte dependencia del factor STAT4 activado por la IL-12 y el factor NF- $\kappa$ B activado por la IL-18, mientras que en la producción de interferón gamma inducida por la estimulación del TCR, el factor NF-AT es muy importante. (Figura 4)

### Efectos del IFN-gamma.

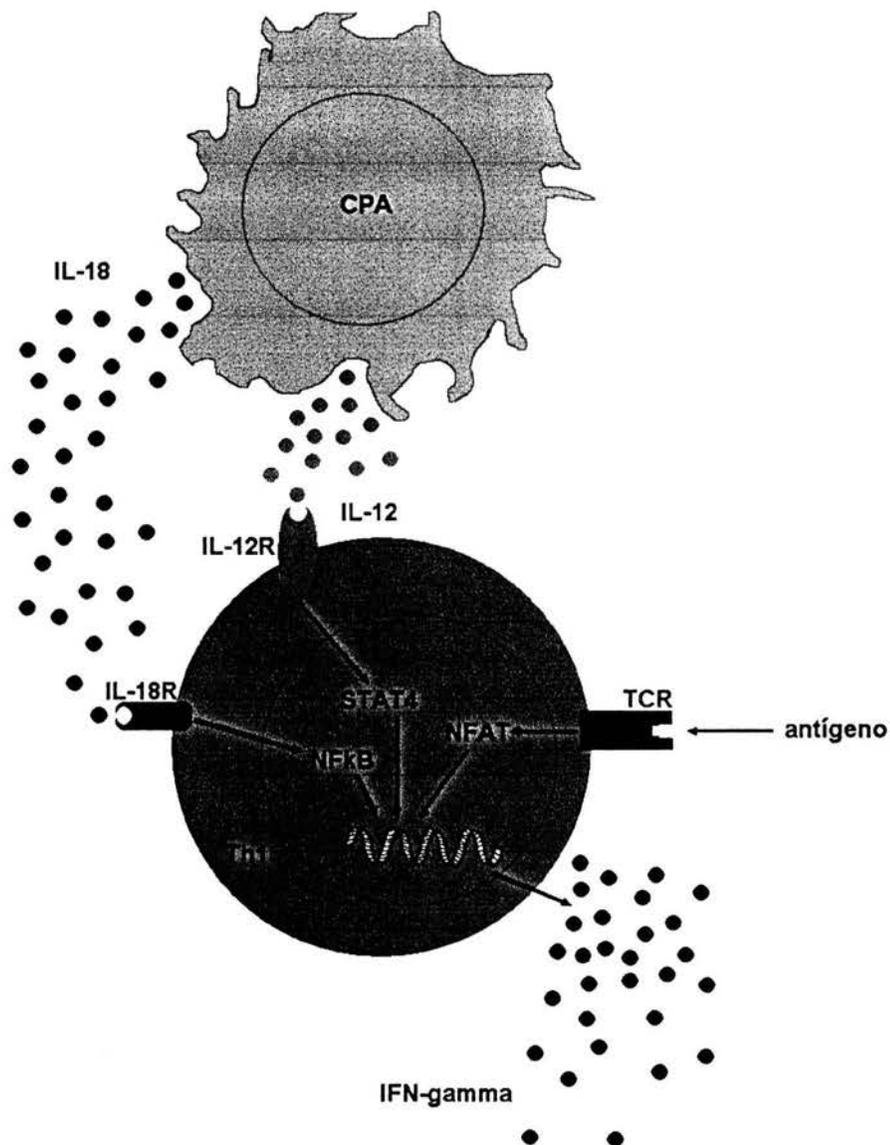
El principal blanco del interferón gamma es el macrófago, donde se sabe induce la expresión de genes que codifican para las subunidades de la NADPH oxidasa y enzimas lisosomales, cuyos productos están relacionados con la destrucción de los microorganismos digeridos. Otro blanco importante del interferón gamma son las células NK. (15, 16)

El interferón gamma incrementa la síntesis de algunas citocinas, como la subunidad p40 de la IL-12, el TNF-alfa y la IL-1, lo cual contribuye con la inmunidad antimicrobiana *in vivo*. (1)

Por otra parte, el interferón gamma puede inducir la expresión de moléculas de MHC de tipo II como HLA-DR, así como la molécula de adhesión intracelular tipo I (ICAM-1). (72)

La importancia del interferón gamma en la inmunidad innata antiviral al parecer depende principalmente del tipo de virus infectante, pues se sabe que el interferón gamma induce la expresión de diversas proteínas que inhiben la propagación viral como la 2-5 adenilato sintetasa, la cual cataliza la formación de un oligonucleótido inusual, 2-5A, requerido para activar una endonucleasa latente, ARNasa L, cuya función es degradar el ARNm requerido para la replicación citoplasmática de una gran variedad de virus. (80)

Además de estos efectos, inmunológicamente, el IFN-gamma está involucrado en procesos importantes como la diferenciación de células Th, con predominio hacia el subtipo celular Th1, ya que además de promover el desarrollo de esta tipo celular, en combinación con IL-12, antagoniza con las funciones de la IL-4, como es la diferenciación hacia el subtipo celular Th2. (Figura 2)



**Figura 3. Producción de IFN-gamma.** Las células Th1 son capaces de producir interferón gamma como respuesta a las citocinas IL-12 e IL-18, las cuales promueven la expresión de los factores de transcripción STAT4 y NF-kB respectivamente, así como por la presentación de antígenos vía TCR que induce la expresión del factor de transcripción NFAT.

NK: células "natural killer"; TCR: receptor de las células T; STAT1: proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción; IL12RB1: cadena 1 del receptor de la interleucina 12; IL-12: interleucina 12; IL-18R: receptor de la interleucina 18; IL-18: interleucina 18; NF-kB: factor nuclear kB; NFAT: factor nuclear activado por las células T. <sup>(44, 72)</sup>



## 2.7. Ensayos inmunoenzimáticos

El estudio de las citocinas presenta diferentes problemas ligados fundamentalmente a sus propias características como su baja concentración, una vida media corta y la redundancia de sus efectos biológicos, lo que dificulta su estudio. Hasta hace algunos años, se tenía el problema de la falta de anticuerpos específicos para el estudio de las citocinas de diversas especies, afortunadamente ahora se pueden obtener citocinas recombinantes, con lo que se logra tener anticuerpos monoclonales que hacen posible el desarrollo de diversos métodos de valoración inmunológica, para dichas citocinas. Principalmente, estos métodos son inmunoenzimáticos, del tipo ELISA y tienen como ventajas una elevada sensibilidad y especificidad para la captación y cuantificación de citocinas, pero tienen el inconveniente que pueden detectar y cuantificar citocinas no activas biológicamente. Otros métodos, los de tipo molecular se han podido desarrollar gracias al conocimiento de las diferentes secuencias de un gran número de citocinas, que ha permitido la adaptación de técnicas de amplificación de PCR, permitiendo detectar distintas citocinas en diferentes tejidos o células. Estas técnicas, que hoy día pueden ser también cuantitativas, pueden detectar y cuantificar las diferentes citocinas, aunque como en el caso de los métodos inmunológicos, su detección no implica necesariamente, actividad biológica.

Las diferencias de sensibilidad, especificidad, capacidad de utilización a gran escala, etc. son algunos de los conceptos más importantes a la hora de seleccionar una u otra técnicas; respecto a la sensibilidad podemos observar que hay técnicas con niveles bajos como las de precipitación, de sensibilidad media como la aglutinación bacteriana, fijación de complemento y otras de sensibilidad mayor como el ELISA, la seroneutralización o la actividad bactericida. (tabla 3)

En la actualidad el ensayo ELISA es uno de los métodos más utilizados para el diagnóstico serológico de distintas enfermedades y de estados fisiológicos como el embarazo, el consumo de drogas etc. El método ELISA está recomendado fundamentalmente para el estudio de poblaciones.

Es una técnica altamente sensible y de gran especificidad, que permite realizar en poco tiempo estudios sobre grandes poblaciones, de manera sencilla y económica. Esta técnica presenta además una buena reproducibilidad y facilidad en la interpretación de los resultados.

MÉTODO	SENSIBILIDAD ( $\mu\text{g/mL}$ )
Precipitación en gel	30
Precipitación en anillo	18
Aglutinación bacteriana	0.05
Fijación de complemento	0.05
Hemaglutinación pasiva	0.01
Inhibición de la hemaglutinación	0.005
Inmunofluorescencia	0.005
ELISA	0.0005
Neutralización bacteriana	0.00005

**Tabla 3:** Comparación de sensibilidad entre diversas técnicas. <sup>(87)</sup>

### **3. Justificación.**

En el Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química de la UNAM, se han explorado los efectos de la suplementación con zinc durante las etapas perinatales sobre el sistema inmune y se ha observado un aumento en la proliferación de células T, así como en la capacidad defensiva de macrófagos, al aumentar su capacidad fagocítica y la producción de citocinas como la IL-1 y el TNF- $\alpha$ . En ratones infectados con *Taenia crassiceps* se observó que la suplementación con zinc disminuye en un 50% la carga parasitaria con aumento en la producción de citocinas Th1, IL-2 e IFN-gamma, sin afectar a las citocinas Th2, IL-4 e IL-10, debido posiblemente a que el tipo de respuesta predominante en estas infecciones intracelulares es la Th1. También se ha observado un aumento en la producción de IL-12, como resultado de la suplementación con zinc, la cual induce la diferenciación linfocitaria hacia el subtipo Th1 que principalmente secretan IFN-gamma e IL-2. Para conocer si la suplementación con zinc induce o mantiene la secreción de las citocinas que están relacionadas con el tipo de respuesta Th1, decidimos evaluar los efectos de la misma sobre la producción de IL-2 e IFN-gamma. Si se conocen los efectos que tiene el zinc en la respuesta Th1, la suplementación con el mismo podría ser considerada para prevenir enfermedades ocasionadas por microorganismos intracelulares, como infecciones respiratorias y del tracto gastrointestinal, en poblaciones susceptibles como los niños, los ancianos y las mujeres en embarazo y lactancia y se puede empezar a considerar en los esquemas de tratamiento contra enfermedades que cursan con inmunodeficiencia.

#### **Hipótesis del estudio**

La suplementación con zinc a ratones en etapas perinatales incrementará la producción de las citocinas Th1: interleucina 2 e interferón-gamma.

## **4. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Observar los efectos de la suplementación con zinc sobre la producción de IL-2 e IFN-gamma en ratones BALB/c durante las etapas perinatales.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Desarrollar las condiciones óptimas del cultivo de células esplénicas para evaluar la producción de IL-2 e IFN-gamma
- Estandarizar la técnica del ensayo inmunoenzimático para el estudio de los efectos del zinc sobre la producción de IL-2 e IFN-gamma en ratones durante las etapas perinatales.
- Evaluar los efectos de la suplementación con zinc sobre la producción de IL-2 e IFN-gamma en esplenocitos de ratón.

## 5. Material y métodos

### 5.1. Animales

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, hembras y machos, con un peso de 22g, alojados por parejas en cajas de plástico con rejillas de acero inoxidable y fondo con aserrín. Las botellas de agua tuvieron tapones de polietileno y tubos bebederos de acero inoxidable. La dieta de los animales consistió en alimento comercial Lab diet 5015 (PMI Foods Inc, St Louis MO, USA), al cuál tuvieron libre acceso. El suplemento de zinc fue administrado por medio del agua de beber a una concentración de 500mg/L de acetato de zinc. Y fue administrado a los progenitores desde el apareamiento, durante la gestación y la lactancia.

Los animales de trabajo se dividieron en dos grupos cada cual con su testigo correspondiente:

**Grupo I:** Crías F1, con 3 semanas de edad y con 6 semanas de tratamiento: gestación y lactancia.

**Testigo I:** Hembras y machos F1 con 3 semanas de edad.

**Grupo II:** Crías F1, hembras y machos de 6 semanas de edad con 9 semanas de tratamiento: gestación, lactancia y 3 semanas posteriores al destete.

**Testigo II:** Hembras y machos F1 con 6 semanas de edad.

	TRATAMIENTO		
Grupo	GESTACION	LACTANCIA	DESTETE
I	■		□
Testigo I	□		□
II	■		□
Testigo II	□		□

□ Agua destilada  
■ Zn 500 mg/L

Tabla 4. Diseño experimental

## 5.2. Obtención de los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos

Para evaluar el efecto del zinc en la producción de citocinas Th1, se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos, provenientes del bazo de los ratones de los grupos de experimentación (tabla 4), el cuál se obtuvo en condiciones de esterilidad y se perfudió con 3 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO No. Cat. 830-180EH, USA), las células obtenidas se lavaron 2 veces por centrifugación a 250 g durante 10 minutos a 4°C y fueron resuspendidas en 2mL de RPMI suplementado.

El número de células se determinó mediante conteo en una cámara de Neubauer, utilizando la exclusión del colorante vital azul tripano (Flow Laboratories, USA), en todos los casos se observó una viabilidad celular mayor del 95%. La suspensión celular final se ajustó a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/mL de la cuál se tomó una alícuota de 100 $\mu$ L (100 000 células), para ser depositada en un pozo de la placa para cultivo (Costar No. Cat. 3596, USA). Por cada ratón trabajado se ocuparon 6 pozos: tres pozos a los que se les adicionó RPMIs que fungieron como controles y tres pozos que fueron estimulados con concanavalina A (No. Cat 2490, Méx.), (mitógeno para linfocitos T no específico), a una concentración de 5 $\mu$ g/mL), para estimular la proliferación.

La placa se incubó a 37°C en cámara de humedad y atmósfera de CO<sub>2</sub> por 48h, según el tiempo y la concentración de concanavalina A en el que se demostró, la proliferación óptima (gráficas no mostradas). Después de este tiempo, los sobrenadantes del cultivo se recogieron y almacenaron para la posterior cuantificación de IL-2 e IFN-gamma, mediante un ensayo inmunoenzimático.

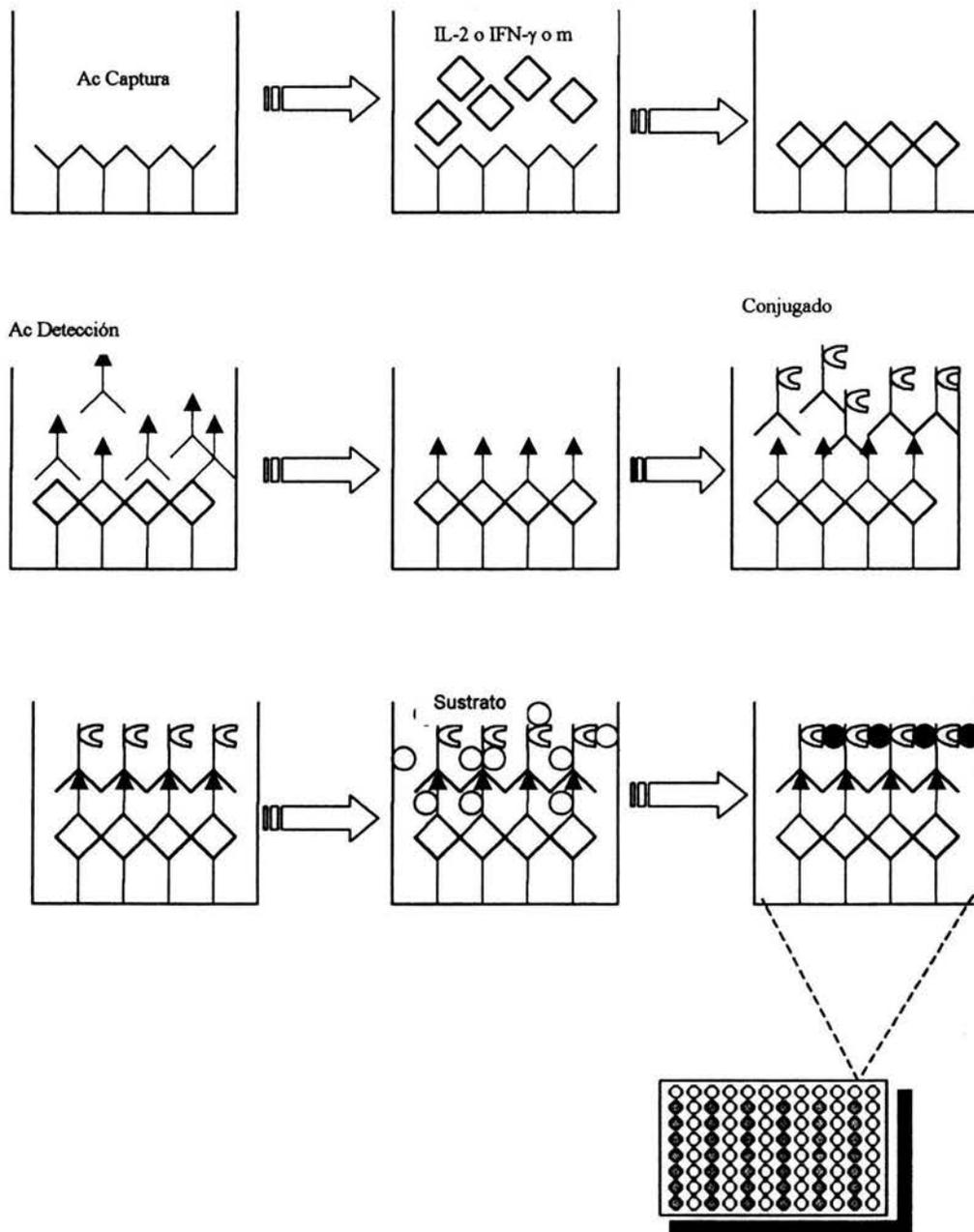
### 5.3. ELISA

Para cuantificar la cantidad de IL-2 e IFN-gamma producida por las células de bazo provenientes de ratones suplementados con zinc y sin suplementar durante los dos periodos estudiados: la gestación y la lactancia (6 semanas) y la gestación, la lactancia y el destete (9 semanas), se determinó la concentración de interleucina-2 e interferón-gamma en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos mediante un ensayo inmunoenzimático ELISA (PEPROTECH No. Cat. 900-K108 y 900-K98, Méx.).

Para el ensayo inmunoenzimático se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Costar No. Cat. 2580, USA) con un anticuerpo monoclonal anti-IL-2 o anti-IFN-gamma, durante 24 horas para después depositar los sobrenadantes del cultivo de esplenocitos, se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Al termino del periodo de incubación, se adicionó un anticuerpo biotinilado de cabra anti-IL-2 o anti-IFN-gamma murinos; se incubó una hora a temperatura ambiente.

Se adicionó avidina-peroxidasa (Sigma Chem No. Cat. A-7419, USA), se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se agregó el sustrato ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6 sulfonic acid) (Sigma Chem USA No. Cat. A-3219). Después de cada periodo de incubación se eliminó el exceso de reactivo por inversión de la placa y se lavó cuatro veces con una solución de PBS-Tween20 al 0.05%.

El anti IL-2 o anti-interferón-gamma conjugado con la avidina-peroxidasa reaccionó con el sustrato durante 15 minutos, generando un cambio de color. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas (Behring EL 301). En cada ocasión se incluyó en la placa una curva patrón, con 100µL de cada una de las soluciones que contenían 20, 40, 80, 160, 320, 640 y 1280 pg/mL de IL-2 o IFN-gamma recombinante de ratón.



**Figura 5.** Ensayo inmunoenzimático (ELISA ).

## 6. RESULTADOS

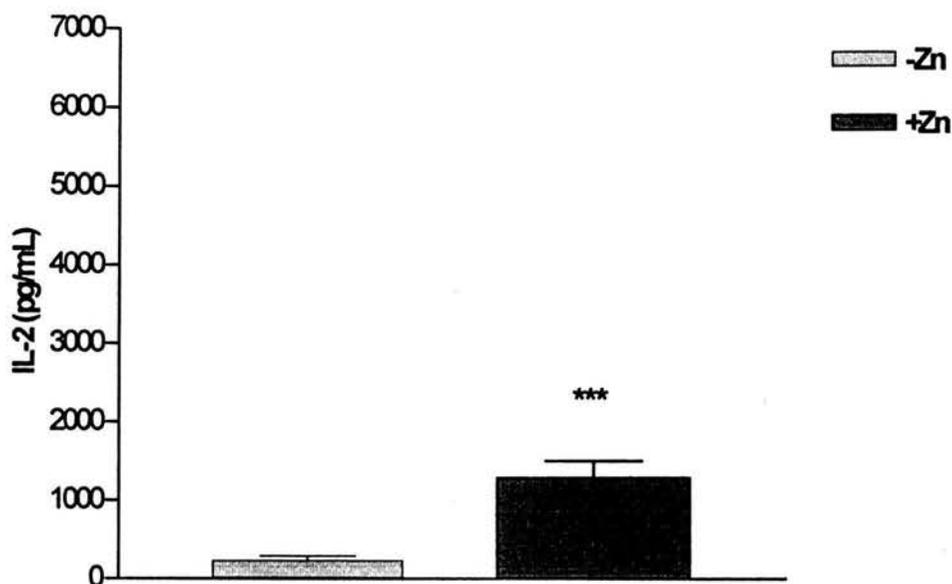
Una vez calculada la concentración de la IL-2 y del IFN-gamma en los sobrenadantes de cultivo celular de esplenocitos de ratones en estudio, grupos I y II, con sus testigos.

Se obtuvieron los promedios y las desviaciones estándar de cada grupo (n=16). Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante la prueba ANOVA y la prueba T de student, utilizando el software Prism 3.0

Con estos datos se realizaron finalmente las gráficas comparativas de los diferentes tratamientos.

## Efectos del zinc sobre la producción de IL-2 de ratones suplementados durante 6 y 9 semanas

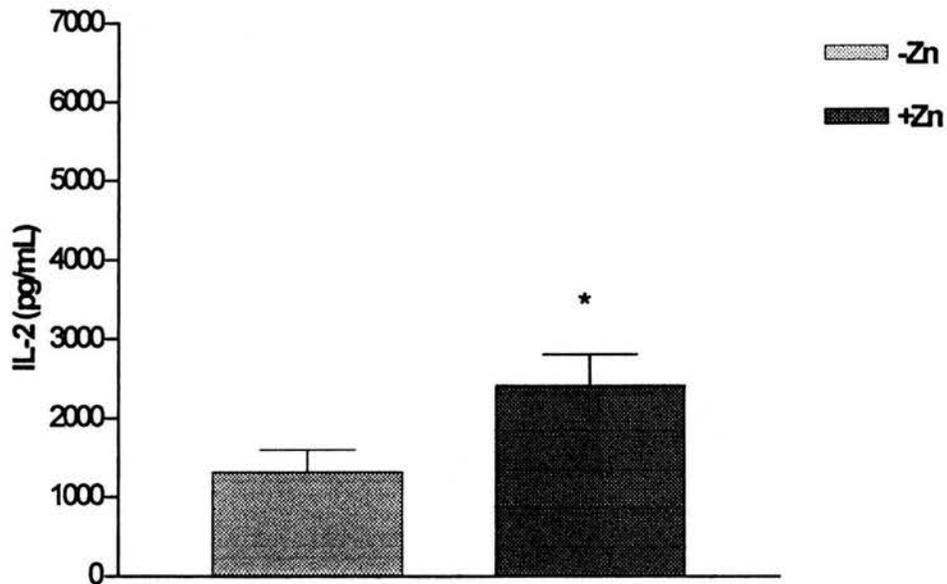
Con el propósito de conocer los efectos de la suplementación con zinc sobre la producción de IL-2 por ratones tratados durante **6 semanas** (6s: periodos de gestación y lactancia), se determinó la concentración de citocinas en el ELISA de los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos y se obtuvieron los siguientes resultados, correspondientes a 4 experimentos representativos y cada muestra por duplicado (n=16).



**Gráfica 1.** Efecto del zinc sobre la producción de IL-2 (6s), sin estimulante.

Observamos mayor producción de IL-2 cuando se administró zinc in vivo, con una diferencia significativa, (t Student,  $p < 0.0001$ ), ambos casos sin estimulación *in vitro*.

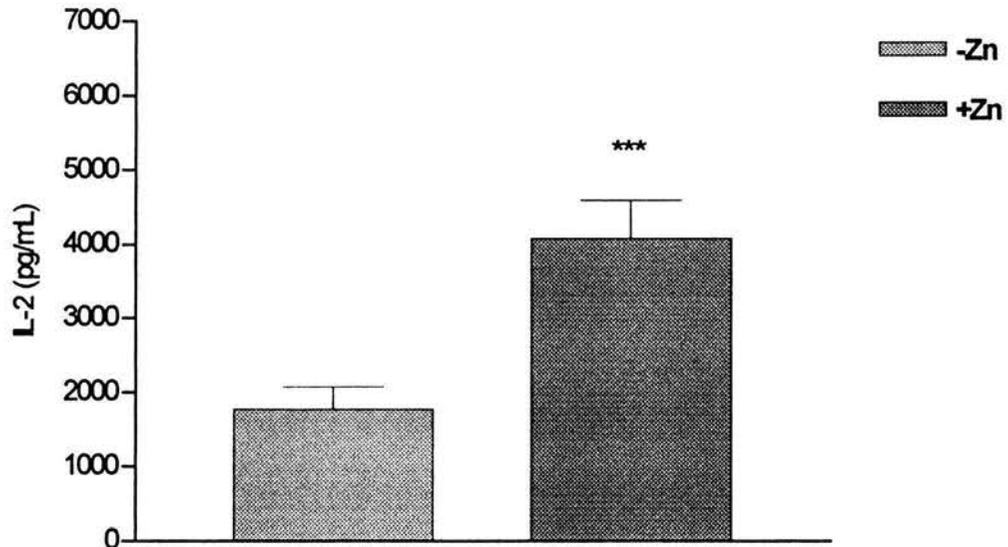
Al mismo tiempo se realizó el ELISA con células de ratones suplementados con zinc durante 6 **semanas** (6s: periodos de gestación y lactancia), con estimulación *in vitro* con **Con A**.



**Gráfica 2.** Efecto del zinc sobre la producción de IL-2 en presencia del estimulante (6s, Con A).

Observamos, que cuando los ratones son tratados con zinc durante 6 semanas (periodos de gestación y lactancia), hay mayor producción de IL-2 por las células esplénicas, comparando con la cantidad producida por las células de ratones de la misma edad, pero sin suplementación con zinc, (t Student,  $p < 0.05$ ,  $p = 0.0344$ ). En ambos casos se estimuló *in vitro* con concanavalina A

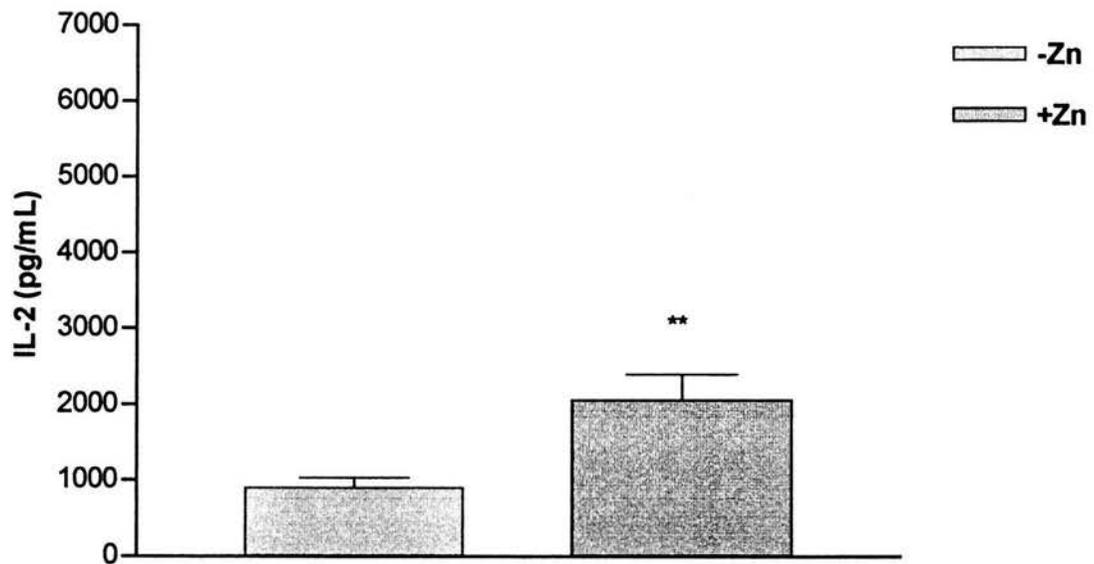
Con las células de ratones suplementados con zinc durante **9 semanas** (9s: periodos de gestación, lactancia y destete) estimuladas con **Con A**, los resultados también corresponden a 4 experimentos representativos y cada muestra por duplicado y n=16.



**Gráfica 3.** Efecto del zinc sobre la producción de interleucina 2 en presencia del estimulante, concanavalina A (9s, Con A).

En los ratones que recibieron el suplemento de zinc durante **9 semanas** (9s, +Zn, Con A), se observó un incremento significativo (t Student,  $p < 0.05$ ,  $p = 0.0005$ ) en la producción de interleucina 2, en comparación con los testigos (9s, -Zn, Con A).

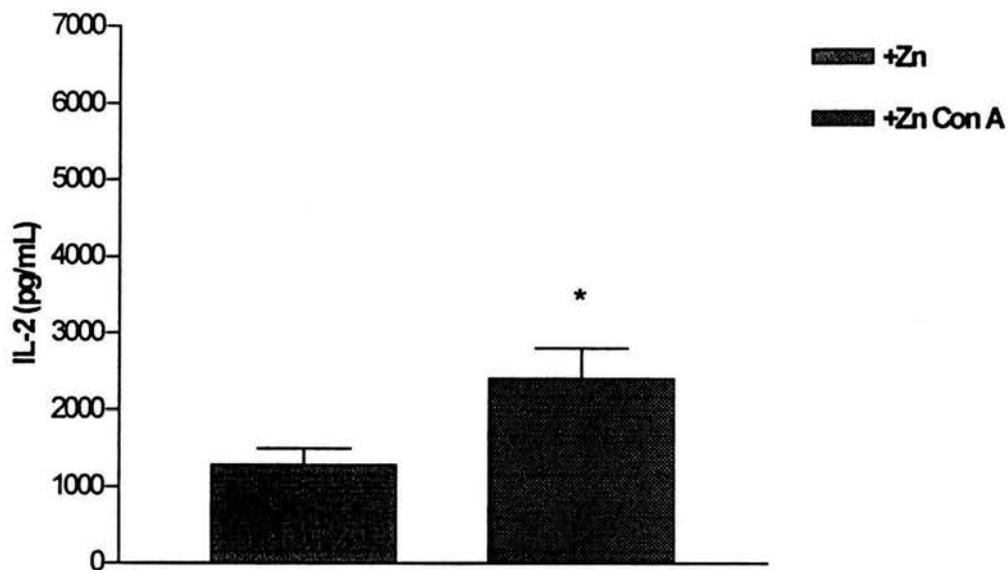
Al mismo tiempo se realizó el ELISA con células de ratones suplementados con zinc durante **9 semanas** (9s: periodos de gestación lactancia y destete), sin estimulación *in vitro* con Con A. Los resultados corresponden a 4 experimentos representativos y cada muestra por duplicado (n=16).



**Gráfica 4.** Efecto de la suplementación con zinc sobre la producción de IL-2 por ratones tratados durante 9 semanas.

Se analizaron los datos encontrándose que hay diferencias significativas entre los grupos (t Student,  $p < 0.05$ ,  $p = 0.0033$ ).

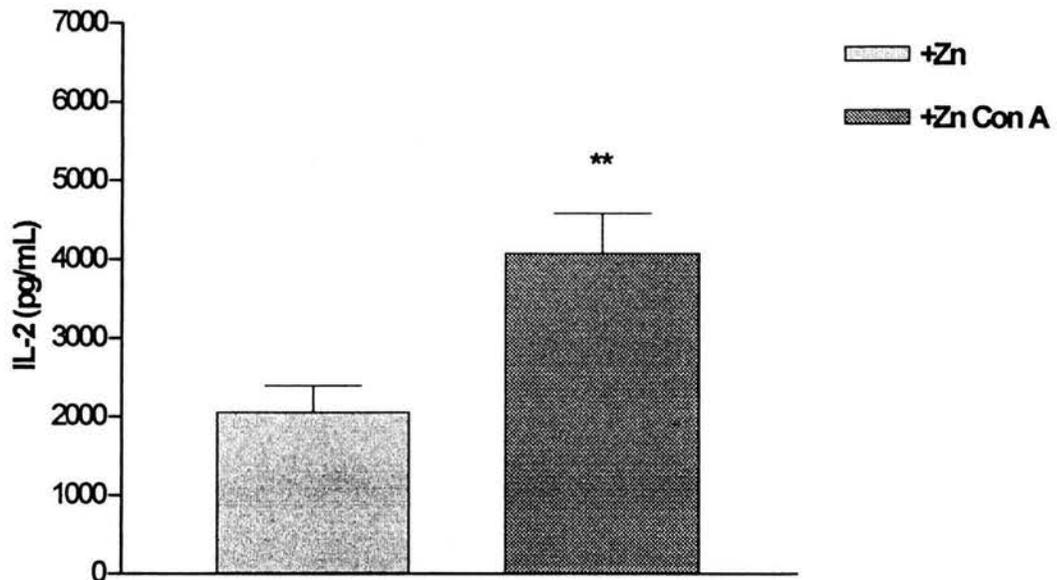
También se comparó la cantidad de IL-2 producida por esplenocitos de ratones del **grupo I**, es decir, suplementados durante **6 semanas** (6s: periodos de gestación y lactancia), con y sin estimulación *in vitro* con **Con A**. Los resultados corresponden a 4 experimentos representativos y cada muestra por duplicado (n=16).



**Gráfica 5.** Producción de IL-2 en grupo I (+Zn, 6s) y Con A.

Observamos que hay un aumento significativo en la producción de IL-2 cuando se tienen los dos tratamientos *in vivo* con zinc e *in vitro* con Con A (t Student  $p < 0.05$ ,  $p = 0.0200$ ).

También se comparó la cantidad de IL-2 producida por esplenocitos de ratones del **grupo II**, es decir, suplementados durante 9 **semanas** (9s: periodos de gestación, lactancia y destete), con y sin estimulación *in vitro* con **Con A**.

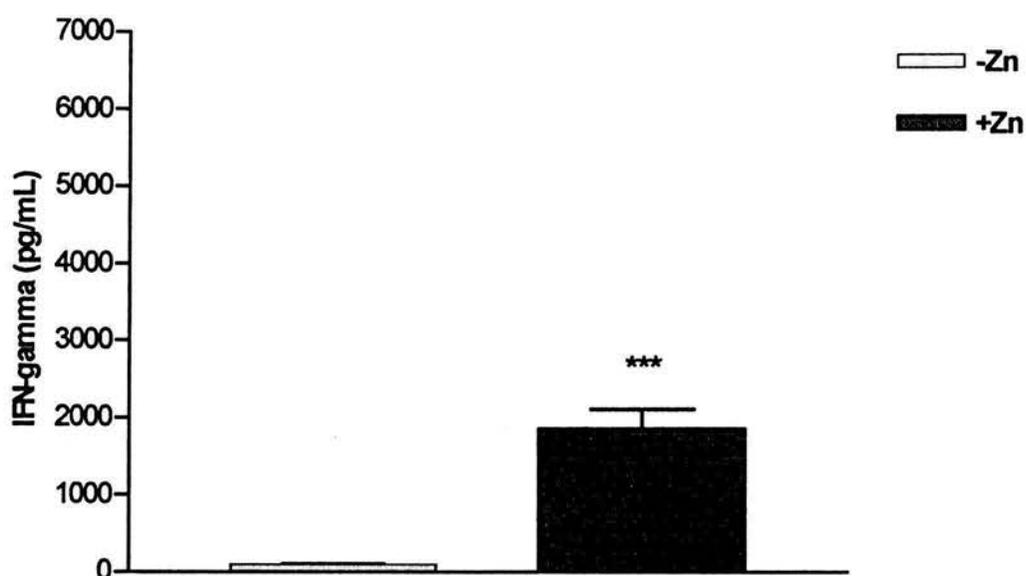


**Gráfica 6.** Producción de IL-2 en grupo II (+Zn, 9s). Con A: concanavalina A.

Observamos que hay un aumento significativo en la producción de IL-2 cuando se tienen los dos tratamientos: estimulación *in vivo* con zinc e *in vitro* con Con A (t Student  $p < 0.05$ ,  $p = 0.0023$ ). El efecto es mayor que el observado a las 6 semanas.

## Efecto del zinc sobre la producción de IFN-gamma de ratones suplementados durante 6 y 9 semanas.

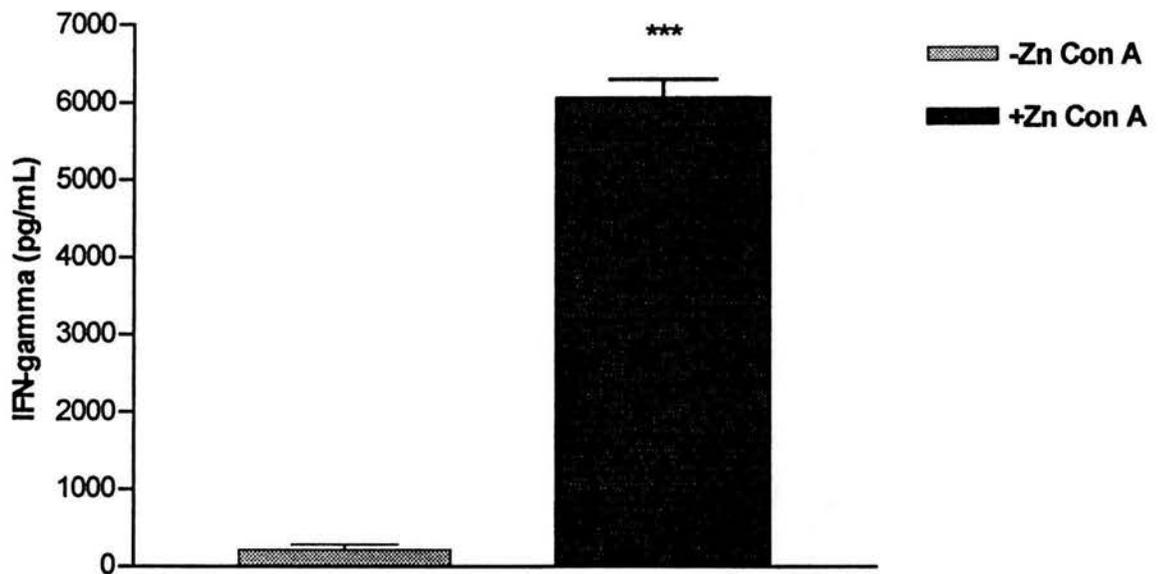
Con el propósito de conocer los efectos de la suplementación con zinc en la producción de IFN-gamma por ratones tratados durante **6 semanas** (6s: periodos de gestación y lactancia), se realizó el ELISA de los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos y se obtuvieron los siguientes resultados, correspondientes a 4 experimentos representativos y cada muestra por duplicado y n=16.



**Gráfica 7.** Efecto de la suplementación con zinc sobre la producción de IFN-gamma por ratones tratados durante 6 semanas

Cuando los animales han recibido el suplemento de zinc durante 6 semanas, la producción de IFN-gamma es significativamente mayor (t Student,  $p < 0.05$ ,  $p = 0.0005$ ).

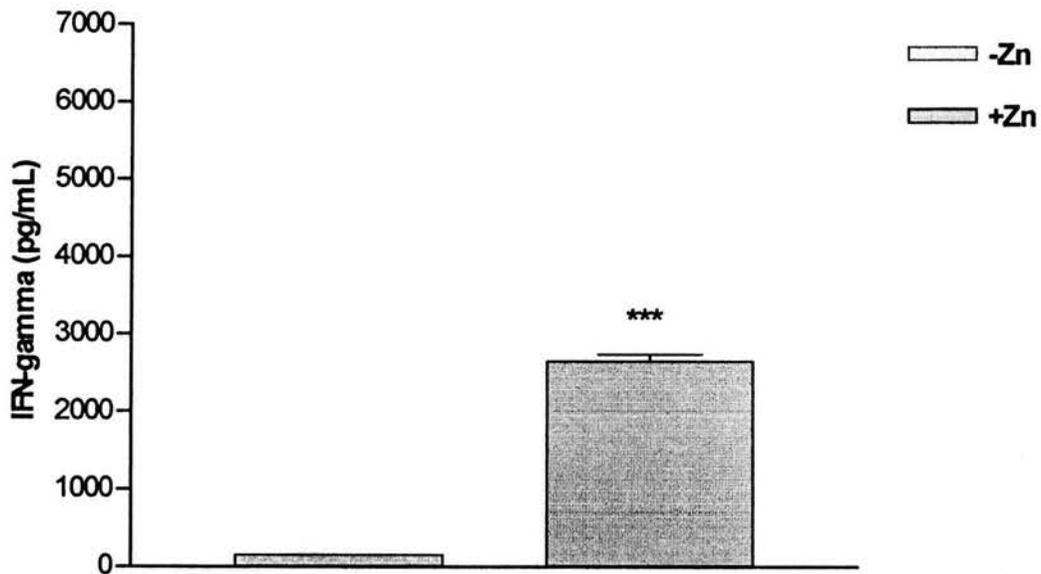
También se comparan los resultados de la suplementación oral con zinc durante **6 semanas** (6s: periodos de gestación y lactancia) sobre la producción de interferón gamma con estimulación *in vitro* con **Con A**.



**Gráfica 8.** Efecto de la suplementación con zinc sobre la producción de IFN-gamma en presencia del estimulante (6s, Con A). Con A: concanavalina A.

Se analizaron los datos encontrando que hay diferencias significativas entre los grupos (t Student,  $p < 0.0001$ ).

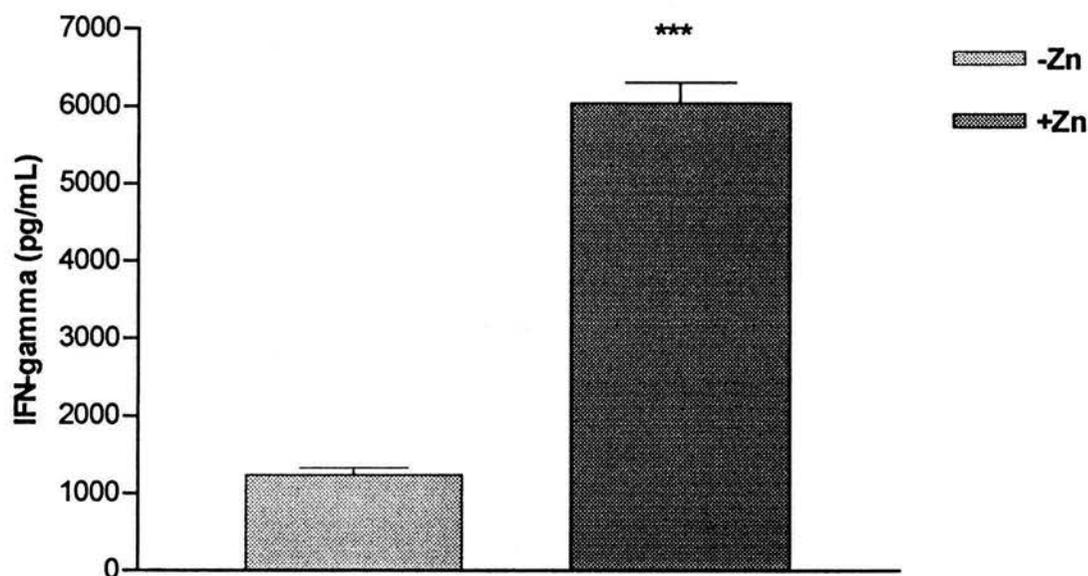
Se analizaron los datos obtenidos para la producción de IFN-gamma por los testigos de 9 semanas de edad comparados con los datos obtenidos para el grupo II (suplementación durante los periodos de gestación lactancia y destete), sin estimulación *in vitro*.



Gráfica 9. Efecto del zinc en la producción de IFN-gamma, (9 semanas)

Encontramos que hay diferencias significativas entre los grupos ( t Student,  $p < 0.05$ ,  $p = 0.0001$ ).

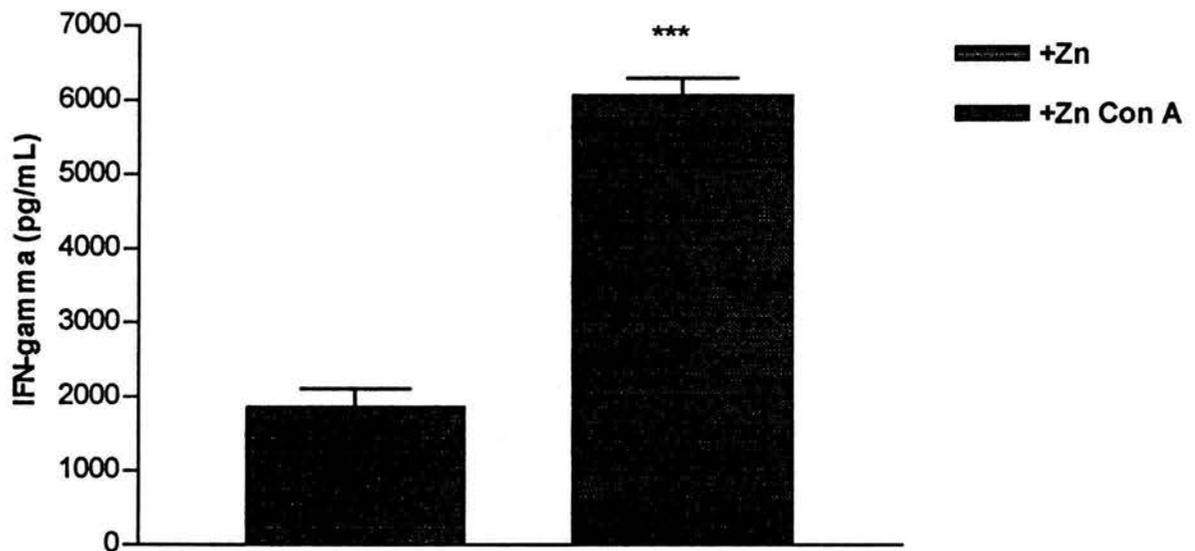
Para la producción de IFN-gamma por los testigos de **9 semanas** de edad comparados con los datos obtenidos para el **grupo II** (suplementación durante los periodos de gestación lactancia y destete), con estimulación *in vitro* con **Con A**.



**Gráfica 10.** Efecto de la suplementación con zinc sobre la producción de IFN-gamma en presencia del estimulante (9, Con A).

Encontramos que hay diferencias significativas entre los grupos (t Student,  $p < 0.05$ ,  $p = 0.0007$ ).

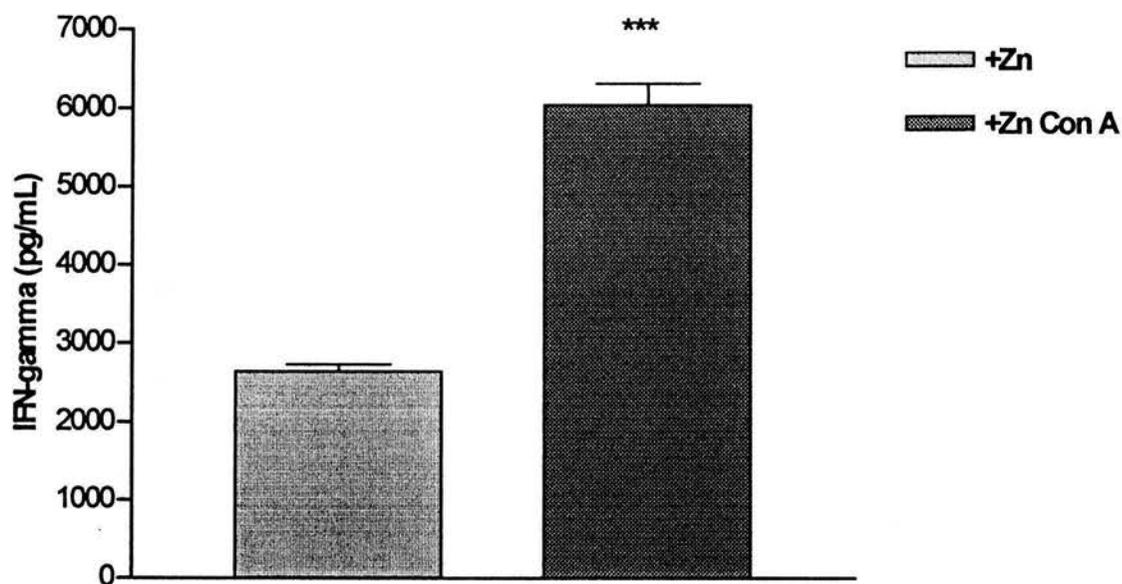
Al comparar la cantidad de IFN-gamma producida por esplenocitos de ratones del **grupo I**, es decir, suplementados durante **6 semanas** (6s: periodos de gestación y lactancia), con y sin estimulación *in vitro* con **Con A**. Los resultados corresponden a 4 experimentos representativos y cada muestra por duplicado (n=16).



**Gráfica 11.** Producción de IFN-gamma en grupo I (+Zn, 6s)

La producción de IFN-gamma es mayor cuando se suplementa *in vivo* con zinc y además se estimula *in vitro* con Con A, que cuando solo se administra el suplemento de zinc (t Student  $p < 0.0001$ ).

También se comparó la cantidad de IFN-gamma producida por esplenocitos de ratones del **grupo II**, es decir, suplementados durante 9 **semanas** (9s: periodos de gestación, lactancia y destete), con y sin estimulación *in vitro* con **Con A**.

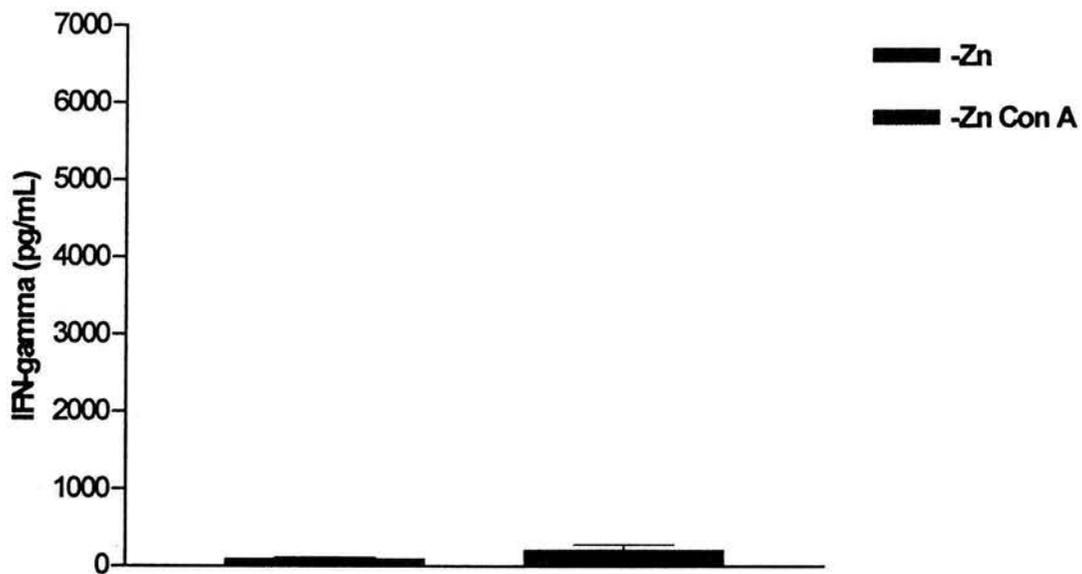


**Gráfica 12.** Producción de IFN-gamma en grupo II (+Zn, 9s).

Con A: concanavalina A

La producción de IFN-gamma es mayor cuando se estimula *in vivo* con zinc e *in vitro* con Con A, que cuando solo se estimula *in vivo* con zinc, (t student  $p < 0.0001$ ). Este efecto es menor que el observado a las 6 semanas.

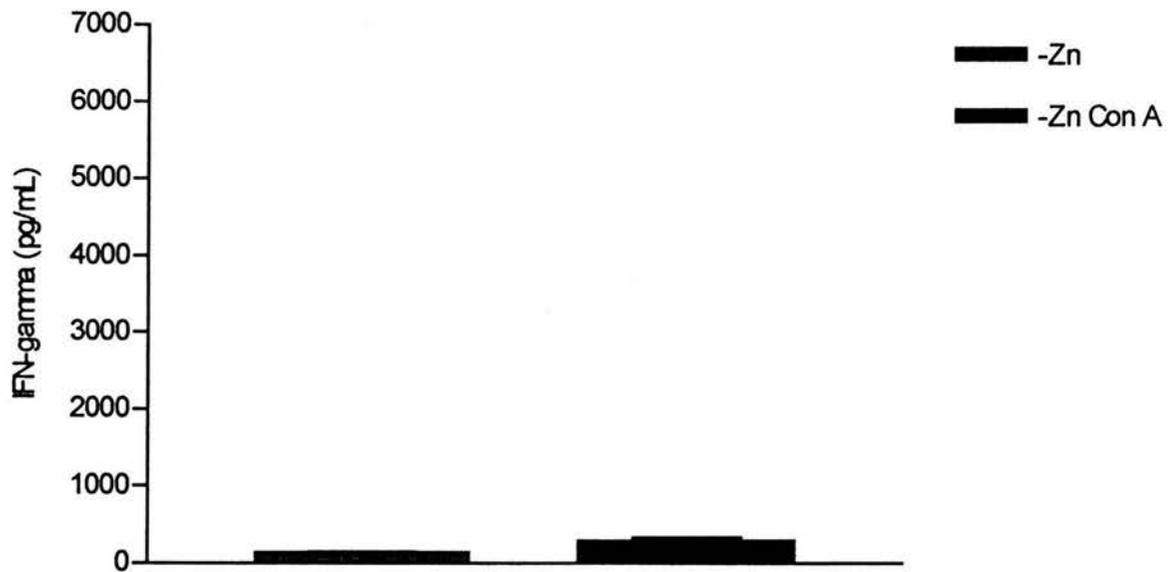
Comparando el efecto de la estimulación *in vitro* con Con A, sin el efecto *in vivo* (sin suplementación con zinc), realizamos las gráficas correspondientes a la producción de IFN-gamma por los ratones del grupo **testigo I** (3 semanas de edad).



**Gráfica 13.** Producción de IFN-gamma en grupo testigo I. (-Zn, 6s), Con A

No observamos diferencias significativas entre los grupos.

También realizamos la comparación del efecto *in vitro* con Con A para el grupo **testigo II** (6 semanas de edad).



**Gráfica 14.** Producción de IFN-gamma en grupo testigo II (-Zn, 9s).  
Con A: concanavalina

No se observan diferencias significativas entre los grupos.

## VIII. Discusión

Sabemos que el zinc se involucra en el mantenimiento de una respuesta inmune efectiva, por tres actividades principales, como ión regulador, participando en la estructura de biomoléculas y colaborando como factor catalítico. <sup>(51, 52, 54)</sup>

En otros estudios se ha demostrado que la expresión de la IL-2, del receptor de la IL-2 y del IFN-gamma, depende de zinc, por lo que en estados de deficiencia de este micronutriente, se ocasiona un desbalance en la relación Th1/Th2, por la influencia en la producción de las citocinas tipo Th1 sin aparente alteración en la producción de las citocinas Th2. <sup>(64)</sup>

En los resultados que presentamos se observa, que cuando los ratones son tratados con zinc durante 6 semanas (grupo I, periodos de gestación y lactancia), hay mayor producción de IL-2 por las células esplénicas, comparando con la cantidad producida por las células del grupo testigo I, ratones de la misma edad, pero sin suplementación con zinc, ( $p < 0.0001$ ). <sup>(gráfica 1)</sup> Ambos grupos de sobrenadantes, grupo I y testigo I, provienen de cultivos no estimulados *in vitro* con Con A. Esto concuerda con estudios anteriores, donde se ha observado un efecto mitogénico del zinc *in vitro*, <sup>(37)</sup> el cual puede deberse a una inducción del elemento en la producción de citocinas proliferativas de linfocitos T, como es el caso de la IL-2; también se ha demostrado que el zinc está involucrado en el mantenimiento de la estabilidad de la membrana plasmática, por lo que alteraciones en su concentración la afectan sensiblemente ocasionando cambios en las enzimas unidas a membrana, flujo de otros iones tanto en la membrana como en el citoesqueleto, ocasionando modificaciones en la activación de las células en reposo y/o la interacción de las células en los cultivos, <sup>(57)</sup> con lo que se verán afectadas la expresión de citocinas involucradas como la IL-2.

Al comparar la producción de IL-2 por el grupo I con la producción de esta citocina por el grupo testigo I en sobrenadantes de cultivos estimulados *in vitro* con Con A, encontramos que sigue siendo significativamente mayor la producción de IL-2 cuando se administró zinc *in vivo*, ( $p = 0.0344$ ), aunado a los efectos proliferativos de la Con A que se relacionan con el aumento de esta citocina proliferativa. <sup>(gráfica 2)</sup> Si

además comparamos la producción de IL-2 en el grupo I con y sin estimulación *in vitro*, observamos que hay un aumento significativo ( $p=0.0200$ ) en la producción de IL-2 cuando se ha suplementado *in vivo* con el elemento y además se estimula *in vitro* con Con A; <sup>(gráfica 5)</sup> esto nos sugiere algún mecanismo sinérgico entre la Con A y el zinc en la producción de IL-2, relacionado posiblemente con la interacción del mitógeno con su receptor. Al respecto, O'Dell y col. mencionan que el zinc ocasiona modificaciones en el número y movilidad del receptor para el mitógeno, ocasionando una respuesta proliferativa en los cultivos que son suplementados con zinc. <sup>(33)</sup>

A las nueve semanas de tratamiento, periodos de gestación, lactancia y destete (grupo II), seguimos observamos el efecto positivo del zinc en la producción de IL-2. <sup>(gráficas 3, 4 y 6)</sup> Si comparamos la producción de IL-2 "basal" del testigo I y el testigo II, observamos que es mayor en este último, lo cuál sugiere una producción de la citocina dependiente con el tiempo; no obstante, la producción de IL-2 en el grupo II es significativamente mayor respecto al grupo testigo II, tanto con estimulación *in vitro* con Con A, como sin ella,  $p=0.0033$  <sup>(gráfica 3)</sup> y  $p=0.0005$ , <sup>(gráfica 4)</sup> estas diferencias son mayores que las observadas a las seis semanas entre los mismos tratamientos. Este efecto mayor de la suplementación con zinc sobre la producción de IL-2, puede ser debido por un lado al periodo de suplementación y por otro al aumento en la absorción del elemento, por el cambio de la suplementación indirecta vía la leche materna, a la suplementación directa vía el agua de beber. De esta manera, el aumento de la producción de IL-2 a las 9 semanas en células de ratones suplementados con el micronutriente y de cultivos estimulados *in vitro* con Con A es mayor al observado a las 6 semanas, <sup>(gráfica 6)</sup> con lo que podemos decir que hasta este periodo de suplementación con zinc, el efecto benéfico del mismo se conserva sin presentar daños colaterales observables en el organismo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el laboratorio donde se ha observado que el zinc tiene efectos positivos en la producción de IL-1 $\alpha$  durante los periodos de gestación y lactancia y en la producción de TNF- $\alpha$  e IL-12 hasta las tres semanas posteriores al destete. <sup>(38)</sup>

Para el caso del IFN-gamma tenemos, que la producción de IFN-gamma “basal”, es semejante a la producción de las nueve semanas (TI y TII) y que cuando se utiliza el estimulante *in vitro*, no hay aumento significativo en la producción de IFN-gamma al igual que a las 9 semanas de tratamiento. <sup>(gráficas 15 y 16)</sup> Esto concuerda con la actividad de la concanavalina A como mitógeno que induce linfoproliferación y no directamente, la producción de citocinas como el IFN-gamma, sin embargo, algunos autores mencionan el uso de la Con A como estimulante para la producción de esta citocina. <sup>(25)</sup> Otros autores mencionan su empleo en una combinación con PMA 1:10 <sup>(24)</sup>. Nosotros usamos este estimulante para poder comparar la producción de ambas citocinas (IL-2 e IFN-gamma), en condiciones semejantes tanto en ausencia como en presencia de zinc, según suplementación con el mismo.

En el grupo I (+Zn, 6s), la producción de IFN-gamma es mayor comparada con los testigos (TI: -Zn, 6s), el aumento es de 18 veces por efecto de la suplementación *in vivo* con el oligoelemento. <sup>(gráfica 7)</sup> Cuando además se estimula *in vitro* con Con A, el aumento es de 28 veces <sup>(gráfica 8)</sup> es decir, el efecto de la suplementación con zinc se ve potenciado por el empleo del estimulante Con A *in vitro* <sup>(gráfica 9)</sup>, ya que cuando no hay suplementación con zinc *in vivo*, no se tienen diferencias estadísticamente significativas entre la producción de IFN-gamma con y sin estimulación *in vitro* con Con A <sup>(gráfica 13)</sup>, podemos inferir que el aumento en la producción de esta citocina se debe a la propagación de señales al interior de las células dependientes de zinc, vía estabilización de la PKC y del factor de transcripción NF-kB cuyas estructuras contienen zinc. <sup>(44)</sup> También pueden estar relacionadas con el receptor del mitógeno y con cambios a nivel de membrana que afectan los mecanismos de activación de las células y en consecuencia, la producción de citocinas efectoras como el IFN-gamma, o proliferativas como la IL-2 (ver antes). Además, si tenemos en cuenta que la concanavalina A presenta también en su estructura átomos o iones metálicos; un ion  $Mn^{2+}$  y un ión  $Ca^{2+}$  y que los cambios en las concentraciones de zinc afectan el balance de los demás oligoelementos, por afectación de canales dependientes de zinc, como el canal de calcio, el cual es inactivado por la formación de un enlace disulfuro como resultado de la oxidación del grupo -SH del cual es removido el zinc cuando hay deficiencia de este elemento; <sup>(58)</sup> podemos inferir

alteraciones en la estabilidad de la proteína y en consecuencia, en su actividad, las cuales pueden ocasionar un aumento en los niveles de calcio por liberación del contenido en la proteína, al unir zinc e iniciarse así las rutas de señalización necesarias para la síntesis de ADN y la proliferación celular, así como la síntesis de diversas proteínas como la IL-2 y el IFN-gamma. <sup>(47)</sup>

A las 9 semanas, cuando los animales han recibido el suplemento, durante los periodos de gestación, lactancia y 3 semanas posteriores al destete (grupo II), la producción de IFN-gamma es mayor. <sup>(gráfica 9)</sup> Observamos que el efecto *in vivo* ocasiona un aumento del 94%. Cuando además se estimula *in vitro* con Con A, tenemos que el aumento debido al suplemento es de cuatro veces. <sup>(gráfica 10)</sup> Este efecto es menor que el que se tiene a las seis semanas, lo cual posiblemente se deba a fenómenos de saturación del zinc, pues en estudios anteriores realizados en el laboratorio, se observó que cuando la suplementación con el metal se prolonga después de 9 semanas, la concentración del elemento en tejidos como el timo y el hígado se incrementa de manera gradual dependiente del tiempo, mientras que en otros estudios, se ha mostrado que la suplementación prolongada con zinc incrementa la concentración del elemento en linfocitos y granulocitos. <sup>(64)</sup> Esto pone en evidencia que la exposición prolongada al suplemento trae como consecuencia una acumulación de zinc en otros órganos que puede redundar en efectos nocivos para el sistema inmune.

El aumento en la producción de IFN-gamma es mayor que el presentado en el caso de la IL-2, lo cuál es lógico si se tiene en cuenta que la producción de INF-gamma es resultado de la interacción compleja de varias citocinas como la IL-2 y la IL-12, las cuáles también se encuentran aumentadas como consecuencia del efecto del zinc (en otro estudio se demuestra el aumento en la producción de IL-12 por macrófagos de ratones suplementados con zinc, Lastra 2004), y coestimulan la producción de IFN-gamma. Se ha observado que la IL-2, la IL-12, la IL-18 y el GMCSF exógenos, ocasionan un aumento sustancial en la producción de IFN-gamma. <sup>(43 y 76)</sup>

De esta manera, hemos podido observar que la suplementación con zinc ocasiona un aumento en la producción de citocinas Th1, IL-2 e IFN-gamma, aún en ausencia

del mitógeno. No obstante, la producción de IFN-gamma se ve incrementada, aún de manera más evidente que la IL-2, lo cual puede polarizar la respuesta inmune hacia el tipo celular o Th1.

Por la observación de resultados obtenidos en trabajos anteriores en el laboratorio de investigación en inmunología y que concuerdan con los reportes en la literatura (21 y 66), sabemos que las citocinas que dirigen hacia Th2 no se ven afectadas por efecto de la suplementación con zinc, así que podemos inferir un predominio de moléculas que dirigen hacia Th1 y que inhiben Th2. Por el contrario, se ha reportado que un déficit en la biodisponibilidad de iones de zinc, puede inducir una polarización del balance Th1-Th2-Th3 hacia el tipo Th2-Th3 con un aumento en las citocinas pro-inflamatorias seguido por el aumento en la actividad de MTs y NO. Esto puede estimular PARP hacia muerte de células inmunes por estimulación de la actividad de caspasa-3 o por depleción de NAD<sup>+</sup>. (31)

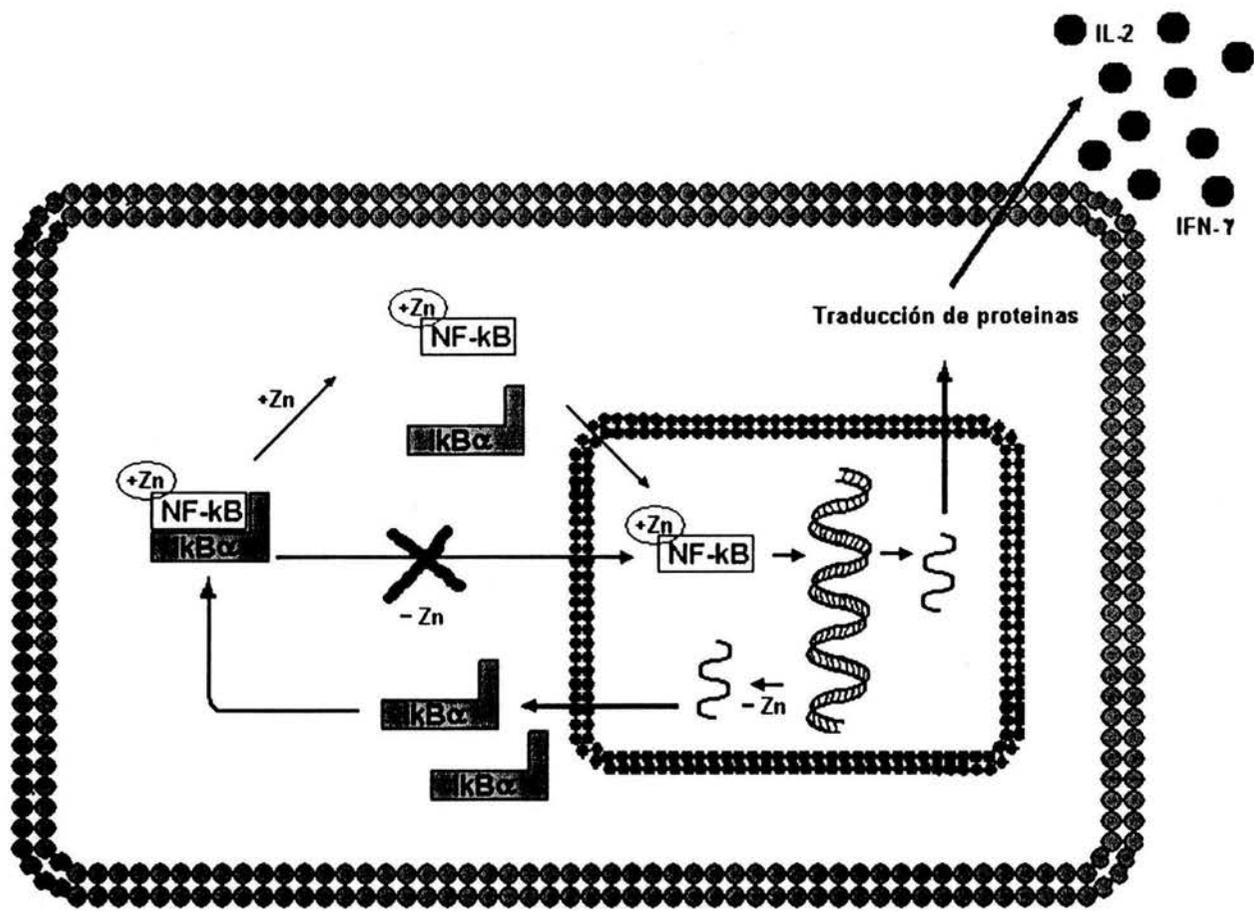
No obstante, es necesario recordar la participación central de la IL-2 en la diferenciación de células Th2, al conferir estabilidad en la accesibilidad del gen que codifica IL-4. (15)

El aumento en la producción de las citocinas IL-2 e IFN-gamma por efecto del zinc puede estar relacionado con la presencia de dominios de "dedos de zinc" requeridos por los factores de transcripción para la replicación de DNA los cuáles, están influenciados por los cambios en el contenido de zinc intracelular. Uno de estos factores con dominios de dedos de zinc que regula la expresión de diversas citocinas es el NF-kB, (44) factor de transcripción dependiente de zinc cuya actividad depende de la posibilidad de entrar al núcleo para iniciar la transcripción de los diferentes genes. Esta entrada al núcleo está impedida por su unión con IκB, el cuál es degradado por un proceso de ubiquitinación iniciado por la fosforilación del complejo IκK (IκKa e IκKb), inducido por la unión de IL-1 y TNF-α. Se ha demostrado que ambas moléculas se encuentran aumentadas en presencia de zinc, lo cuál contribuye a la activación del NF-kB y se correlaciona con el aumento en la producción de las citocinas de los genes que regula, como los de la IL-2 y del IFN-gamma. También se conoce que los glucocorticoides interfieren con la

activación del NF- $\kappa$ B, éstos se producen de manera crónica cuando se tiene una deficiencia de zinc. <sup>(7 y 24)</sup> De esta forma, cuando se bloquea la actividad de NF- $\kappa$ B por cambios en la unión con el ADN, ya sea por cambios estructurales como puede ser la accesibilidad del zinc en la formación de dominios con dedos de zinc, o por disminución de las citocinas involucradas como el TNF- $\alpha$  o la IL-1 o por impedimento estérico ocasionado por el aumento de glucocorticoides, se puede bloquear la producción de las otras citocinas cuyos genes son regulados por el NF- $\kappa$ B. (Figura 6)

Se han reportado otros factores de transcripción que contienen los dominios “dedos de zinc” que se ven afectados por los cambios en la concentración de zinc por competencia con el hierro, cuyo reemplazo elimina o disminuye la actividad del factor de transcripción por alteración de las interacciones proteína-DNA. Los factores de transcripción reportados son MTF1, RING, TFIIIA, EGR-1, EGR-2, BTE, WT-1, TRAF-2, ZEB, KS-1 <sup>(55)</sup> y recientemente la proteína KRAB relacionada con la familia de factores de represión de la transcripción, que parece estar involucrado en la activación de linfocitos. <sup>(73)</sup>

También se conoce que el complejo de factores de transcripción NF-AT es requerido para la expresión de un grupo de proteínas que colectivamente coordinan la respuesta inmune, entre ellas el IFN-gamma y la IL-2. Los agentes que aumentan el Ca<sup>2+</sup> intracelular o activan la proteínkinasa C, como el zinc, modifican NF-AT, con lo que distintas rutas de señalización convergen en la regulación para la expresión de diversas citocinas. <sup>(32)</sup>



**Figura 6. Efectos del zinc en la transcripción:** Los cambios en la concentración de zinc pueden alterar la estructura del NF-kB de tal manera que en concentraciones bajas del elemento (-Zn), el NF-kB se une con mayor afinidad al IκB entorpeciendo su entrada al núcleo (1) o impedir la unión del NF-kB que ya entró al núcleo, con el DNA y activar la expresión de otros genes, entre ellos el que codifica para IκB, ocasionando un aumento de este inhibidor que bloquea al NF-kB libre en el citosol. Por otro lado cuando se tienen concentraciones óptimas de zinc (Zn+), la estructura del NF-kB se mantiene y puede liberarse de su inhibidor, entrar al núcleo, unirse al DNA y transcribir los genes que codifican tanto para IL-2 como para IFN-gamma, lo cuál conlleva a la proliferación y diferenciación de la célula. <sup>(7 y 64)</sup>

El aumento en la producción de la IL-2 y del IFN-gamma que hemos reportado por efecto de la suplementación con zinc, concuerda con los resultados encontrados por otros investigadores los cuales demuestran que el zinc es requerido para la activación de linfocitos T mediada por IL-2 por la inducción del receptor de alta afinidad para IL-2 de los linfocitos y también por el aumento en la producción de esta citocina y del IFN-gamma. <sup>(16, 95)</sup> En otro estudio se establece que el zinc juega un papel importante en la respuesta inmune mediada por células o respuesta Th1, ya que la deficiencia de este metal ocasiona deficiencia en la actividad de NK y de la hormona tímica, así como una producción alterada de citocinas, donde el zinc media positivamente la transcripción del gen de IL-2 y el de IFN-gamma en las células Th1, mientras que regula negativamente la expresión del gen de IL-8 y TNF- $\alpha$  en células Th2. <sup>(8)</sup>

El aumento en la producción de IL-2 e IFN-gamma como consecuencia de la suplementación *in vivo* con zinc, complementa otros trabajos de investigación, en donde se ha observado que el zinc adicionado *in vitro* en concentraciones estimulantes a cultivos de células mononucleares de sangre periférica induce la secreción de citocinas como la IL-1, el TNF-alfa y el interferón gamma <sup>(62)</sup> y otros en que se establece que el zinc está activamente involucrado en el control transcripcional de los genes que codifican para el receptor de IL-2 ocasionando un aumento en el número de interacciones entre la IL-2 y su receptor, de tal manera que se favorece la proliferación celular. <sup>(69)</sup>

En este trabajo proponemos un vía de participación del zinc en la respuesta Th1, por sus efectos en la producción de la IL-2 y del IFN-gamma, por la estabilización y activación de los factores de transcripción involucrados NF-kB, AP-1 y Sp-1 principalmente, por sus efectos estabilizadores de membrana según cambios estructurales en las proteínas transmembranales y el flujo de iones, así como en el control de reacciones de estrés oxidativo por NO, por lo que deben seguirse desarrollando proyectos en los que se estudien los receptores de estas moléculas y su expresión a nivel transcripcional para dilucidar las condiciones y el mecanismo por el cuál el zinc interviene en la producción de estas y otras citocinas. Además de

seguir buscando los efectos de la suplementación con zinc sobre los diversos componentes del sistema inmune en diferentes etapas de la vida, así como su relación con otros micronutrientes y ensayar sus efectos sobre la capacidad defensiva del organismo, frente a una infección por microorganismos intracelulares como *Leishmania sp* o *Toxoplasma gondii*, para evaluar la funcionalidad biológica de las moléculas cuantificadas, de la IL-2 y del IFN-gamma.

Cuanto más conozcamos los efectos de este micronutriente en el desarrollo de una respuesta inmune efectiva y el mecanismo por el cual actúa, sus interacciones con otros micronutrientes y los límites de dosis efectivas y tóxicas, mayor será la seguridad con que podremos suplementar este micronutriente y ofrecer alternativas de prevención contra enfermedades infecciosas, mayor eficacia en los tratamientos para enfermedades que cursan con inmunodeficiencias o en que el sistema inmune se encuentra comprometido.

## VIII. CONCLUSIONES

- La suplementación con zinc durante la gestación, la lactancia y tres semanas posteriores al destete, favorece la producción de citocinas Th1: la IL-2 y el IFN-gamma.
- La producción de IL-2 e IFN-gamma, es mayor cuando además de suplementar *in vivo* con el metal, también se estimula *in vitro* con Con A, tanto a las seis como a las nueve semanas de tratamiento.
- El aumento en la producción de IL-2, por efecto de la suplementación con zinc, es mayor en aquellos casos en que la suplementación se prolonga hasta nueve semanas de tratamiento.
- El aumento en la producción de IFN-gamma, por efecto de la suplementación con zinc, es mayor cuando solo se suplementa durante la gestación y la lactancia (6 semanas de tratamiento).
- Por sí sola, la estimulación *in vitro* con Con A no produce ningún efecto en la producción de IFN-gamma.
- El ensayo inmunoenzimático ELISA, es una técnica que nos permite estudiar los efectos de la suplementación con zinc sobre la producción de IL-2 e IFN-gamma por ratones en etapas perinatales y se puede aplicar al estudio de otras citocinas, ya que es una prueba muy sensible.

## BIBLOGARFÍA

1. Argyrios N T, Stefanos K, Dwight H K and Brian R "The role of IFN-g in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity" *Arthritis Res* **2001**, 3:136–141
2. Ashworth CJ and Antipatis C. "Micronutrient programming of development throughout gestation" *Reproduction* **2001**, 122:527-535
3. Baluna R, Rizo J, Gordon BE, Ghetie V and Vitetta ES. "Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome (immunotoxin integrins disintegrin cytokine)" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, March **1999** pp. 3957–3962, Medical Sciences.
4. Bao B. "Zinc modulates mRNA levels of cytokines" *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2003**, 285:E1095-E1102.
5. Baum MK, Shor-Posner G and Campa A. "Zinc Status in Human Immunodeficiency Virus Infection" *J. Nutr.* 130: **2000** 1421S—1423S.
6. Berendji D, Kolb-Bachofen V, Zipfel PF, Skerka C, Carlberg C, Kroncke KD "Zinc finger transcription factors as molecular targets for nitric oxide-mediated immunosuppression: inhibition of IL-2 gene expression in murine lymphocytes." *Mol Med* **1999** Nov 5:11 721-30
7. Bianchi M, Charis M and Lionel BI. "Inhibition of IL-2-induced Jak-STAT signaling by glucocorticoids" *PNAS*. **2000** 15, vol. 97 no. 17 9573–9578
8. Black RE. "Therapeutic and preventive effects of zinc on serious childhood infectious diseases in developing countries" *Am J Nutr* **1998**; 68: 476S-479S.
9. Brockdorff J, Kanner SB, Nielsen M, Borregaard N, Geisler C, Svejgaard A and Odum N. "Interleukin-2 induces b2-integrin-dependent signal transduction involving the focal adhesion kinase-related protein B (fakB)" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* June **1998** Vol. 95, pp. 6959–6964
10. Buzina Suboticane K, Buzina R, Stavljenic A, Farley TM, Haller J, Bergman Markovic B, Gorajscan. "Ageing, nutritional status and immune response." *Int J Vitam Nutr Res* **1998** 68:2 133-41.

11. Caulfield LE, Zavaleta N, Shankar AH, Merialdi M. "Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival. *Am J Clin Nutr* **1998** Aug 68:2 Suppl 499S-508S.
12. Chimienti F, Aouffen M, Favier A, Seve M "Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate." *Curr Drug Targets* **2003** May 4:4 323-38.
13. Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, Chiodetti Y, Howward A, Hu-Li J, Zhu J, Paul WE. "Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation" *PNAS* **2004** March vol. 101. no.11 3880-3885.
14. Dardenne M. "Zinc and immune function." *Eur J Clin Nutr* **2002** 56 Suppl 3: S20-3
15. Decker EL, Skerka C, Zipfel PF. "The early growth response protein (EGR-1) regulates interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells." *J Biol Chem* **1998** Oct 9 273:41 26923-30
16. Decker EL, Nehmann N, Kampen E, Eibel H, Zipfel PF, Skerka C "Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression." *Nucleic Acids Res* **2003** Feb 1 31:3 911-21
17. Dijkhuizen MA, Wieringa FT, West CE, Muherdiyantiningsih, and Muhilal. "Concurrent micronutrient deficiencies in lactating mothers and their infants in Indonesia" *Am J Clin Nutr* **2001**;73:786–91.
18. Erickson KL, Medina EA, Hubbard NE "Micronutrients and innate immunity". *J Infect Dis* **2000** Sep 182 Suppl 1: S5-10
19. Fischer Christa Walker and Black Robert E. "Zinc and the risk for infectious disease *Annu. Rev. Nutr.* **2004**. 24:255–75
20. Fortes C, Forastiere F, Agabiti N, Fano V, Pacifici R, Virgili F, Piras G, Guidi L, Bartoloni C, Tricerri A, Zuccaro P, Ebrahim S, Perucci CA. "The effect of zinc and vitamin A supplementation on immune response in an older population". *J Am Geriatr Soc* **1998** Jan 46:1 19-26.

21. Fragoso G, Lastra M D, Pastelín R, Aguilar A E, et al. "Effect of oral zinc supplementation upon *Taenia crassiceps* murie cistecircosis" *J Parasitol* **2001** 87(5) : 1034-1039
22. Fraker PJ, King LE, Laakko T and Vollmer TL. "The Dynamic Link between the Integrity of the Immune System and Zinc Status" *J. Nutr.* **2000**, 130:1399S—1406S,
23. Gupta RP, Verma PC, Garg SR. "Effect of experimental zinc deficiency on immunological responses in Salmonella-infected guinea-pigs." *J Comp Pathol* **2000** 123:1 1-6
24. Halonen S K, Taylor GA, Weiss LM. "Gamma Interferon-Induced Inhibition of *Toxoplasma gondii* in Astrocytes Is Mediated by IGTP" *Infection and Immunity*, **2001**, p. 5573–5576
25. Hegazy SM, Adachi Y. "Comparison of the effects of dietary selenium, zinc, and selenium and zinc supplementation on growth and immune response between chick groups that were inoculated with Salmonella and aflatoxin or Salmonella". *Poult Sci* **2000** Mar 79:3 331-5.
26. Hernández P, Martín Odalys, Rodríguez de Pablos Y and Ganem FA. "Aplicaciones de las lectinas" *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* **1999**; 15(2):91-5.
27. Hotz C, Brown KH. "Identifying populations at risk of zinc deficiency: the use of supplementation trials". *Nutr Rev* **2001** Mar 59:3 Pt 1 80-4.
28. Hurov G, Gomez G, Tellez I and Ortiz V. "gamma-Interferon and IL-2 activities in supernatant of lymphocytes on chicken splenocytes stimulated with concanavalina A". *Departamento de Produccion Animal Aves, FMVZ, UNAM, Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV del IPN, Unidad de Investigacin Medica en Inmunoquimica del hosp. de especialidades del centro medico nacio.* **2001**.
29. Ibs KH, Rink L "Zinc-altered immune function". *J Nutr* **2003** May 133:5 1452S-6S
30. Kambé T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R and Nagao M. "Overview of mammalian zinc transporters" *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **2004** 61:49-68.

31. Kidd P. "Th1/Th2 Balance: the hypothesis, its limitations and Implications for health and disease" *Altern Med Rev* **2003**; 8(3):223-246.
32. Klein, C J. "Nutrient Requirements For Preterm Infant Formulas" *J. Nutr.* **2002**, 132: 1395S-1577S.
33. Kocyigit A, Gur S, Erel O, Gurel M S. "Associations among plasma selenium, zinc, copper, and iron concentrations and immunoregulatory cytokine levels in patients with cutaneous leishmaniasis". *Biol Trace Elem Res* **2002** 90:1-3 47-55.
34. Kolenko V, Rayman P, Roy B, Cathcart MK, O'Shea J, Tubbs R, Rybicki L, Bukowski R and Finke J. "Downregulation of JAK3 Protein Levels in T Lymphocytes by Prostaglandin E2 and Other Cyclic Adenosine Monophosphate-Elevating Agents: Impact on Interleukin-2 Receptor Signaling Pathway" *Blood* m, April 1 **1999** Vol 93, No 7 pp 2308-2318.
35. Konig D, Weinstock C, Keul J, Northoff H, Berg A. "Zinc, iron, and magnesium status in athletes--influence on the regulation of exercise-induced stress and immune function". *Exerc Immunol Rev* **1998** 4: 2-2.
36. Krachler M, Rossipal E and Micetic-Turk "Trace element transfer from the mother to the newborn investigations on triplets of colostrum, maternal and umbilical cord sera" *European Journal of Clinical Nutrition* **1999**, 53:486-494
37. Krebs NF "Zinc transfer to the breastfed infant" *journal of mammary gland biology and neoplasia*, **1999** Vol. 4, 3:259-268.
38. Lastra M D, Pastelín R, Camacho A, Monroy B, Aguilar A E, "Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response" *J Trace Elem Med Biol* **2001**;15:5-10.
39. Lastra M D, Aguilar A E, Cabañas M A, Hernández R, Húmanez K, Pastelín R "Interleukin-1 $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-12 secreted by macrophages in vivo and in vitro" *J Trace Elem Exp Med* **2004**, 17:123-135.
40. Lawrence, David A. and McCabe Michael J. "Immunomodulation by metals" [Review] *Jr International Immunopharmacology*, **2002**, 2:2-3:293-302.

41. Lira PI, Ashworth A, Morris SS. "Effect of zinc supplementation on the morbidity, immune function, and growth of low-birth-weight, full-term infants in northeast Brazil". *Am J Clin Nutr* **1998** Aug 68:2 Suppl 418S-424S
42. Loui A, Raab A, Obladen M, Bratter P "Nutritional zinc balance in extremely low-birth-weight infants". *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2001** Apr 32:4 438-42.
43. Luo Y, Chen X, O'Donnell MA. "Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN- $\gamma$  production: cytokine promotion and simulation of BCG effect" *Cytokine* 21 **2003**, 17-26
44. Maturano M "Efecto de la suplementación con zinc sobre las células productoras de IFN-gamma" Tesis de Licenciatura. F Q. UNAM. **2004**.
45. Miyazaki T, Takaoka A, Nogueira L, Dikic I, Fujii H, Tsujino S, Mitani Y, Maeda M, Schlessinger J and Taniguchi T. "Pyk2 is a downstream mediator of the IL-2 receptor-coupled Jak signaling pathway". *Genes And Development* March 15, **1998**, Vol. 12, No. 6, pp. 770-775.
46. Miyamoto S, Kimball SR and Safer B, "Signal transduction pathways that contribute to increased protein synthesis during T-cell activation" *Biochim Biophys Acta*, **2000** 1494: 28-42.
47. Mocchegiani E, Muzzioli M, Cipriano C y Giacconi R. "Zinc T-cell pathways, aging: role of metallothioneins" *Mechanisms of ageing and development*, **1998** vol.106, 183-204
48. Mocchegiani E, Perissin L, Santarelli L, Tibaldi A, Zorzet S, Rapozzi V, Giacconi R, Bulian D, Giraldi T. "Melatonin administration in tumor-bearing mice (intact and pinealectomized) in relation to stress, zinc, thymulin and IL-2". *Int J Immunopharmacol* **1999** Jan 21:1 27-46.
49. Mocchegiani E, Ciavattini A, Santarelli L, Tibaldi A, Muzzioli M, Bonazzi P, Giacconi R, Fabris N, Garzetti GG "Role of zinc and alpha2 macroglobulin on thymic endocrine activity and on peripheral immune efficiency (natural killer activity and interleukin 2) in cervical carcinoma". *Br J Cancer* **1999** Jan 79:2 244-50

50. Mocchegiani Eugenio and Muzzioli Mario. "Therapeutic Application of Zinc in Human Immunodeficiency Virus against Opportunistic Infections" *J.Nutr.* **2000**, 130: 1424S—1431S.
51. Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R "Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools". *Trends Pharmacol Sci* **2000** Jun 21:6 205-8.
52. Mocchegiani E, Giacconi R, Muzzioli M, Gasparini N, Provinciali L, Spazzafumo L, Licastro F "Different age-related effects of thymectomy in myasthenia gravis: role of thymoma, zinc, thymulin, IL-2 and IL-6". *Mech Ageing Dev* **2000** Aug 15 117:1-3 79-91.
53. Mocchegiani E, Giacconi R, Muzzioli M, Cipriano C "Zinc, infections and immunosenescence". *Mech Ageing Dev* **2000** Dec 20 121:1-3 21-35.
54. Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Gasparini N, Orlando F, Stecconi R, Muzzioli R, Isani G, Carpena E. Metallothioneins (I +II) and thyroid-thymus axis efficiency in old mice: role of corticosterone and zinc supply. *Mechanisms of Ageing and Development* **2002**, 123 675–694
55. Muraille O. "Revisiting the Th1/Th2 paradigm" **1998**
56. Murphy K and Reiner S L "The lineage decisions of helper T cell" *Nature review* **2002** 2: December, 933-944
57. Nussenblatt V and Semba RD. "Micronutrient malnutrition and the pathogenesis of malarial anemia" *Acta Tropica*, **2002**, 82:3:321 – 337.
58. O'Dell Boyd L. "Role of zinc in plasma membrane function" *J. Nutr.* **2000**, 130: 1432S-1436S.
59. Osendarp SJ, West CE, Black RE. "The need for maternal zinc supplementation in developing countries: an unresolved issue". *J Nutr* **2003** Mar 133:3 817S-827S.
60. Parslow T, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. **Inmunología básica y clínica.** Ed. Manual moderno 10ª. Edición México D.F. **2002**.
61. Peretz A et al. "Effects of selenium supplementation in immune parameters in gut failure patients on home potential nutrition" *Nutrition* **1991**; 7: 215-221.

62. Petanova J, Fucikova T, Bencko V "Influence of cadmium and zinc sulphates on the function of human T lymphocytes in vitro". *Cent Eur J Public Health* **2000** Aug 8:3 137-40.
63. Pinna K, Kelley DS, Taylor PC, King JC "Immune functions are maintained in healthy men with low zinc intake". *J Nutr* **2002**, Jul 132:7 2033-6.
64. Prasad AS "Zinc and immunity". *Mol Cell Biochem* **1998** Nov 188:1-2 63-9
65. Prasad AS, Beck FW, Kaplan J, Chandra P. H, Ortega J, Fitzgerald JT, Swerdlow "Effect of zinc supplementation on incidence of infections and hospital admissions in sickle cell disease (SCD)". *P Am J Hematol* **1999** Jul 61:3 194-202.
66. Prasad AS "Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts". *J Infect Dis* **2000** Sep 182 Suppl 1: S62-8.
67. Prasad AS, Bao B, Beck FW, Sarkar FH. "Zinc activates NF-kappaB in HUT-78 cells". *J Lab Clin Med* **2001** Oct 138:4 250-6.
68. Prasad AS, Bao B, Beck FW, Sarkar FH. "Zinc enhances the expression of interleukin-2 and interleukin-2 receptors in HUT-78 cells by way of NF-kappaB activation". *J Lab Clin Med* **2002** Oct 140:4 272-89.
69. Pucci S, Doria G, Barile S, Pioli C, Frasca D "Inhibition of IL-2 production by Nil-2-a in murine T cells" *Int Immunol* **1998** Oct 10:10 1435-40.
70. Quijano MR, Prats P. "Mecanismos de señalización para el IFN gamma" *BEB* **2000** 20(3): 152-157.
71. Rivera JA, Sepúlveda AJ. "Conclusions from the Mexican National Nutrition Survey 1999: Traslating results into nutrition policy." *Salud Publica Mex* **2003**;45 suppl 4:S565-S575.
72. Rink Lothar and Kirchner Holger "Zinc-Altered Immune Function and Cytokine Production" *J. Nutr.* **2003** 130: 1407S—1411S.
73. Roitt IM, Brostoff J, Male D. **Immunology** 6a. edición. Ed. Mosby, USA. **2001**
74. Rosado JL "Deficiencia de zinc y sus implicaciones funcionales" *Salud Pública México* **1998**; 40:181-188.
75. Sabater L, Ashhab Y, Caro P, Kolkowski EC, Pujol-Borrell R, Dominguez O. "Identification of a KRAB-containing zinc finger protein, ZNF304, by AU-motif-

- directed display method and initial characterization in lymphocyte activation" *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, 293:1066 - 1072.
76. Sareneva, Melén, Pelkonen Matikainen, Vanhatalo, Julkunen. "Kinetics and of cytokine NFAT gene expression in human interleukin-2-dependent T lymphoblasts stimulated via T-cell receptor" *Immunology* **1998** 93:3 350-357
  77. Sazawal S, Jalla S, Mazumder S, Sinha A, Black RE, Bhan MK. "Preschool children". *Indian Pediatr* **1997** Jul 34:7 589-97.
  78. Scott ME and Koski KG. "Zinc Deficiency Impairs Immune responses against Parasitic Nematode Infections at Intestinal and Systemic Sites" *J. Nutr.* **2000**, 130: 1412S—1420S.
  79. Selimoglu MA, Aydogdu S, Unal F, Yuce G, Yagci RV "Serum zinc status in chronic hepatitis B and its relationship to liver histology and treatment results". *Pediatr Int* **2001** Aug 43:4 396-9.
  80. Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, Avots A. "The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation". *Biochimica et Biophysica Acta* **2000** 1498:1-18.
  81. Shankar AH, Prasad AS "Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection". *Am J Clin Nutr* **1998** Aug 68:2 Suppl 447S-463S.
  82. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. "Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions" *J. Leukoc. Biol.* **2004** 75: 163–189.
  83. Solomons NW "Mild human zinc deficiency produces an imbalance between cell-mediated and humoral immunity". *Nutr Rev* **1998** Jan 56:1 Pt 1 27-8.
  84. Song A, Chen YF, Thamatrako In K, Storm TA, Krensky AM. "RFLAT-1: a new zinc finger transcription factor that activates RANTES gene expression in T lymphocytes". *Immunity* **1999** Jan 10:1 93-103.
  85. Speich M, Pineau A and Françoise B. Activity [Review article] *Clinica Chimica Acta*, **2001**, 312: 1-2:1-11.

86. Sprent J and Surh CD. "Cytokines and T cell homeostasis" [Review] *Immunology Letters*, **2003**, 85:2:145 – 149.
87. Szczurek EI, Bjornsson CS, Taylor CG. "Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats". *J Nutr* **2001** Aug 131:8 2132-8.
88. Tijssen P. "Practice and theory of enzyme immunoassays" Elsevier **1990**. Vol. 15 de la colección: *Laboratory techniques in biochemistry and microbiology*, editado por Burdon RH.
89. Tienboon P. "Effect of nutrition support on immunity in paediatric patients with beta-thalassaemia major". *Asia Pac J Clin Nutr* **2003** 12:1 61-5.
90. Turk S, Bozfakioglu S, Ecdar ST, Kahraman T, Gurel N, Erkoc R, Aysuna N, Turkmen A, Bekiroglu N, Ark E. "Effects of zinc supplementation on the immune system and on antibody response to multivalent influenza vaccine in hemodialysis patients". *Int J Artif Organs* **1998** May 21:5 274-8.
91. Villalpando S, García-Guerra A, Ramírez-Silva CI, Mejía-Rodríguez F, Matute G, Shamah-Levy T, Rivera JA. "Iron, zinc and iodide status in Mexican children under 12 years and women 12-49 years of age. A probabilistic national survey" *Salud Publica Mex* **2003**; 45 suppl 4:S520-S529.
92. Verbanac D, Milin C, Radosevic-Stasic B, Trobonjaca Z, Domitrovic R, Giacometti J, Petkovic M, Cuk M, Ciganj Z, Rupcic J, Rukavina D. "Tissue zinc dynamics during the immune reaction in mice". *Biol Trace Elem Res* **1998** Nov 65:2 97-108.
93. Wang LH, Kirken RA, Erwin RA, Yu CR and Farrar WL. "JAK3, STAT, and MAPK Signaling Pathways as Novel Molecular Targets for the Tyrphostin AG-490 Regulation of IL-2-Mediated T Cell Response". *The Journal of Immunology*, **1999**, 162: 3897–3904.
94. Wapnir RA "Zinc deficiency, malnutrition and the gastrointestinal tract". *J Nutr* **2000** May 130:5S Suppl 1388S-92S.
95. Yasui DH, Genetta T, Kadesch T, Williams TM, Swain SL, Tsui LV, Huber BT. "Transcriptional repression of the IL-2 gene in Th cells by ZEB". *J Immunol* **1998** May 1 160:9 4433-40.

## ANEXO

### RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

**Tabla 1.** Participación del zinc en moléculas biológicamente activas. Pág. 3

**Tabla 2.** Efectos del zinc sobre las funciones del sistema inmune. Pág. 10

**Tabla 3.** Comparación de la sensibilidad de diferentes técnicas. Pág. 26

**Tabla 4.** Diseño experimental. Pág. 29

**Tabla 5.** Enzimas empleadas en EIA. Pág. 73

**Figura 1.** Generación de los subgrupos CD4 Th1 y Th2. Pág. 13

**Figura 2.** Funciones de las citocinas Th1: IL-2 e IFN-gamma. Pág. 19

**Figura 3.** Producción de IFN-gamma. Pág. 23

**Figura 4.** Rutas de señalización para la transcripción de los genes de IL-2 e IFN-gamma. Pág. 24

**Figura 5.** Ensayo inmunoenzimático (ELISA) Pág.32

**Figura 6.** Efectos del zinc en la transcripción. Pág.54

**Gráfica 1:** Efecto del zinc sobre la producción de IL-2 (6s), sin estimulante. Pág. 34

**Gráfica 2:** Efecto del zinc sobre la producción de IL-2 en presencia del estimulante (6s, Con A). Pág. 35

**Gráfica 3:** Efecto del zinc sobre la producción de interleucina 2 en presencia del estimulante, concanavalina A (9s, Con A). Pág. 36

**Gráfica 4:** Efecto de la suplementación con zinc sobre la producción de IL-2 por ratones tratados durante 9 semanas. Pág. 37

**Gráfica 5:** Producción de IL-2 en grupo I (+Zn, 6s) y Con A. Pág. 38

**Gráfica 6:** Producción de IL-2 en grupo II (+Zn, 9s). Pág. 39

**Gráfica 7:** Efecto de la suplementación con zinc sobre la producción de IFN-gamma por ratones tratados durante 6 semanas. Pág. 40

**Gráfica 8:** Efecto de la suplementación con zinc sobre la producción de IFN-gamma en presencia del estimulante (6s, Con A). Pág. 41

**Gráfica 9:** Efecto del zinc en la producción de IFN-gamma, (9 semanas). Pág. 42

**Gráfica 10:** Efecto de la suplementación con zinc sobre la producción de IFN-gamma en presencia del estimulante (9, Con A). Pág. 43

**Gráfica 11:** Producción de IFN-gamma en grupo I (+Zn, 6s). Pág. 44

**Gráfica 12:** Producción de IFN-gamma en grupo II (+Zn, 9s). Pág. 45

**Gráfica 13:** Producción de IFN-gamma en grupo testigo I. (-Zn, 6s) Pág. 46

**Gráfica 14:** Producción de IFN-gamma en grupo testigo II (-Zn, 9s). Pág. 47

## ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS

Los ensayos inmunoenzimáticos se desarrollaron a mediados de los setentas para la identificación y localización de antígenos en preparaciones histológicas y para la identificación de líneas de precipitación obtenidas por inmunodifusión e inmunolectroforesis. Sin embargo, cada vez se han hecho más específicos, pues las nuevas técnicas de biología molecular han logrado la obtención de anticuerpos monoclonales que permiten el reconocimiento exclusivo de una molécula en particular.

Los ensayos inmunoenzimáticos se basan en dos fenómenos biológicos importantes, la capacidad discriminatoria de los anticuerpos, debido a su afinidad por un compuesto específico (antígeno o hapteno) y el poder catalítico, la especificidad de las enzimas y que sean fácilmente detectables.

Los principios en que se fundamenta la técnica son:

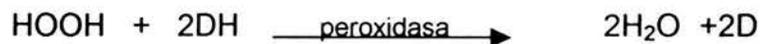
- Algunas enzimas pueden ser acopladas químicamente a un anticuerpo o a un antígeno manteniendo las propiedades biológicas de ambos: interacción con el sustrato, unión con el antígeno, antigenicidad.
- La mayoría de los antígenos (proteínas, péptidos, polisacáridos) se unen a través de interacciones electrostáticas a la superficie de plásticos tales como el poliestireno. Los anticuerpos también se unen sin perder la capacidad de unión con el antígeno.
- La enzima conjugada con un antígeno o anticuerpo retiene la capacidad de interaccionar con el sustrato cuando se une al complejo. La adición del sustrato produce un cambio progresivo en el color de la solución; la reacción se detiene en la etapa apropiada y se observa el cambio de color o se mide la densidad óptica.

Las propiedades que debe tener una enzima para poder ser utilizada en un EIA son las siguientes:

- Alto número de recambio.
- Km (constante de Michaelis-Menten) baja para el sustrato y alta para el producto.
- Estabilidad durante el almacenamiento.
- Alta pureza.
- Facilidad de preparación.
- Bajo costo.
- Actividad fácilmente detectable.
- Compatibilidad con las condiciones del ensayo (pH, fuerza iónica, composición de los amortiguadores, etc)
- La muestra no debe contener la enzima ni sustancias que interfieran con la misma.

Ninguna enzima reúne todas las características para ser un marcador ideal en los EIA y debe elegirse la más adecuada para cada tipo de ensayo. (Tabla 4)

Además deben considerarse otros aspectos, una mínima influencia de la fase sólida sobre la enzima, una conjugación sencilla del antígeno o con el anticuerpo y que los conjugados permanezcan activos y estables. Algunas de las enzimas más empleadas son: la peroxidasa de rábano y la  $\beta$ -galactosidasa, la fosfatasa alcalina que es muy estable y no se encuentra en tejidos vegetales, aunque es difícil de conjugar en forma definida (ya que se polimeriza) y la más utilizada es la peroxidasa, que cataliza la transferencia de dos protones de un donador al peróxido de hidrógeno:



En dónde DH es un donador de protones.

Los donadores de protones más utilizados en EIA son el ácido 5-aminosalicílico, la o-dianisidina, el 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), la o-toluidina, la o-fenilendiamina y la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.

Las características deseables de la fase sólida son:

- Alta capacidad para retener a los reactivos inmunológicos (alta relación superficie/volumen)
- Posibilidad de inmovilización de muchos reactivos inmunológicos diferentes.
- Disociación mínima.
- Desnaturalización no significativa de la molécula inmovilizada.
- Orientación de los anticuerpos inmovilizados con los sitios de unión hacia la solución.

También se utilizan membranas de nitrocelulosa y sustancias particuladas (agarosa, celulosa, poliacrilamida, dextrán), sin embargo, el plástico es la fase sólida más utilizada, ya que facilita la realización de los ensayos haciéndolos extremadamente simples. Sin embargo, los plásticos también tienen algunas limitaciones respecto a otros tipos de fase sólida, como el elevado requerimiento de reactivos inmunológicos y la disminución en la cantidad de interacciones antígeno-anticuerpo. Los soportes más comunes de plástico son las microplacas de poliestireno o cloruro de polivinilo (PVC) con 96 pozos cada uno con capacidad de 0.3mL. El fondo de los pozos puede ser plano, en forma de U o de V y el uso de uno u otro depende del método de lectura del EIA. Para las lecturas con espectrofotómetro, los de fondo plano dan menos variaciones, mientras que para determinaciones visuales los fondos en U son mejores. <sup>(16)</sup>

En la técnica inmunoenzimática ELISA los anticuerpos están marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa), de forma que los conjugados resultantes tienen actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno ó anticuerpo) insolubilizados sobre la placa, la reacción antígeno-anticuerpo queda inmovilizada y por tanto, puede ser fácilmente revelada mediante la adición del sustrato, que al actuar sobre la enzima, produce un color observable a simple vista o cuantificable mediante un colorímetro.

Se han adaptado varios tipos del método ELISA tanto para la determinación de antígenos como de anticuerpos. El ELISA indirecto es el método más utilizado para la determinación de anticuerpos. Básicamente, consiste en la inmovilización a la

placa de ELISA del antígeno del que queremos conocer si en el suero problema existen anticuerpos específicos. Se pueden utilizar como antígenos, proteínas virales o bacterianas e incluso virus completos. Después se adiciona del suero problema, se incuba y se lava, se adiciona el conjugado, se incuba y se lava, y finalmente se adiciona el sustrato, se detiene la reacción y se realiza la lectura. También se utiliza el ELISA de competición para la detección de anticuerpos específicos. Se parte de un anticuerpo (monoclonal o policlonal), frente a un antígeno conocido, que previamente ha sido inmovilizado en la placa. Se denomina de competencia ya que el suero problema es incubado previamente con el antígeno, antes de incubarlo con el anticuerpo fijado en la placa, y por tanto compite con él. Los pasos siguientes son la adición e incubación del conjugado, lavado y finalización con el sustrato y lectura.

Para la determinación de antígenos se emplea el modelo ELISA "Sandwich" o de doble anticuerpo. En este sistema, la placa suele ya venir con un anticuerpo fijado (monoclonal ó policlonal) frente al antígeno problema, sobre el que se añadirá la muestra en estudio, que en caso de reaccionar con el anticuerpo de la placa, será puesto en evidencia tras la adición del segundo anticuerpo marcado con la enzima. Por último, se añade el sustrato de la enzima para revelar la reacción.

<b>Ensayos basados en la amplificación de la actividad enzimática</b>	<b>Ensayos basados en la modulación de la actividad enzimática</b>
Peroxidasa $\beta$ -galactosidasa Fosfatasa alcalina Ureasa Glucosa oxidasa Glucoamilasa Anhidrasa carbónica Acetilcolinesterasa	b-galactosidasa Lisozima Malato deshidrogenasa Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa Ribonucleasa

**Tabla 5:** Enzimas empleadas en EIA. <sup>(88)</sup>