



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efectos del zinc en la respuesta Th1.
Estudio molecular del interferón gamma.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Jaime Armando Ramírez Vargas



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	Prof. Bernardo Lucas Florentino
Vocal	Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre
Secretario	Prof. Ana Esther Aguilar Cárdenas
1er Suplente	Prof. Ileana González Hernández
2do Suplente	Prof. Héctor Bourges Rodríguez

Sitio en donde se desarrolló el tema

Laboratorio de Investigación en Inmunología. Laboratorio 1D - anexo
Edificio A, 1er piso, Facultad de Química, UNAM, México, DF



Este proyecto fue apoyado económicamente por el Colegio de Profesores de la Facultad de Química y la sección 024 de la AAPAUNAM al ser ganador de la Cátedra “Fernando Orozco Díaz” en el periodo 2008-2

Asesor del tema

Dra. Ana Esther Aguilar Cárdenas

Sustentante

Jaime Armando Ramírez Vargas

Agradezco de manera especial
al Colegio de Profesores de la Facultad de Química
y a la sección 024 de la AAPAUNAM
por el apoyo brindado a mi trabajo de Tesis

Agradezco la ayuda brindada
para la realización del trabajo
a los siguientes Profesores:

Dr Rodolfo Pastelin Palacios
Jefe del Departamento de Biología

Dra Liliana Saldivar
y Q Nadia Munguía Acevedo
Departamento de Química Analítica, Posgrado

M en C Raúl Aguilar Caballero
Bioquímica, Posgrado

Doy gracias a mis padres, quienes siempre me han brindado su cariño, confianza y apoyo, por creer en mí y ayudarme a alcanzar mis metas, gracias a ustedes he podido llegar hasta aquí

A mis abuelos, pilares de esta familia, que han sido ejemplo de amor, unión y perseverancia

A mis hermanos, que están a mi lado en cada momento

También agradezco a mis amigos, con quienes compartí tantos momentos a lo largo de la carrera

ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. <i>Zinc</i>	3
2.1.1. Deficiencia de zinc	4
2.1.2. Suplementación con zinc	5
2.2. <i>Interferón gamma (IFN-γ)</i>	7
2.2.1. Clasificación	7
2.2.2. Estructura	8
2.2.3. Efectos del IFN- γ	9
2.2.4. El receptor para IFN- γ	12
2.3. <i>Linfocitos T cooperadores (Th)</i>	14
2.3.1. Respuestas Th1 y Th2	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	17
General	17
Específicos	17
6. METODOLOGÍA	18
6.1. <i>Animales</i>	18
6.1.1. Suplementación con zinc	18
6.1.2. Grupos de tratamiento	18
6.2. <i>Estudio de la expresión genética de IFN-γ por linfocitos esplénicos</i>	19
6.2.1. Obtención de los esplenocitos	19
6.2.2. Estimulación de los linfocitos	20
6.2.3. Aislamiento del RNA total	20
6.2.4. RT-PCR	21

	<i>Página</i>
6.3. <i>Determinación del zinc intracelular</i>	22
6.3.1. Obtención de la muestra	22
6.3.2. Absorción atómica	23
7. RESULTADOS	24
7.1. <i>Estandarización de los ensayos y cinética de estimulación de esplenocitos</i>	24
7.2. <i>Efectos de la suplementación oral con zinc en la expresión genética del</i> <i>IFN-γ</i>	28
7.2.1. Grupo 1	28
7.2.2. Grupo 2	29
7.3. <i>Concentración intracelular de zinc en esplenocitos</i>	31
8. DISCUSIÓN	32
9. CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXO I. Preparación de soluciones	43
ANEXO II. Reconstitución de estimulantes	44
ANEXO III. Reconstitución de cebadores	45

1. RESUMEN

El zinc es un metal muy importante ya que participa en múltiples procesos de nuestro organismo. Está involucrado en una gran variedad de funciones celulares, incluyendo la transducción de señales, la transcripción y la replicación.

Los efectos del zinc sobre el sistema inmune son muy significativos, sobre todo en las etapas de la infancia y la vejez. Favorece la proliferación en las células sin afectar los niveles de viabilidad. Influye de manera muy importante sobre diversos aspectos de los linfocitos T como su maduración, proliferación, regulación, secreción de citocinas y expresión de receptores celulares.

Las consecuencias de la deficiencia de zinc son muy variadas y tienen un gran impacto en la salud. Perturba diferentes funciones biológicas como la expresión genética, la síntesis de proteínas, el crecimiento y maduración ósea, el desarrollo gonadal, el embarazo, el sentido del gusto y el apetito. Así mismo, puede causar infertilidad, una labor de parto prolongada y aumenta el riesgo de tener partos prematuros y abortos.

Los suplementos con zinc pueden revertir muchas de las consecuencias ocasionadas por su deficiencia. Disminuye la susceptibilidad a infecciones, estimula la activación de los linfocitos T, favorece la secreción de citocinas proinflamatorias, retarda la atrofia tímica, induce la proliferación celular y mejora la producción de anticuerpos.

En este proyecto se investigan los efectos que tiene el zinc sobre la expresión genética del interferón gamma (IFN- γ), que es una citocina del tipo Th1, producto de los linfocitos T activados. El IFN- γ participa en la regulación de la respuesta inmune y en los procesos inflamatorios, incluyendo la activación de los linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, células NK, fibroblastos, etc. Tiene propiedades antivirales y antitumorales.

Se trabajó con ratones machos y hembras de la cepa BALB/c, los cuales fueron suplementados con 500 ppm de acetato de zinc en el agua de beber. Se dividieron en dos grupos; los animales del grupo 1 recibieron la dosis de zinc durante los periodos de la gestación y la lactancia, y los del grupo 2 durante los periodos de gestación, lactancia y destete; ambos con sus respectivos testigos. Se obtuvieron los linfocitos esplénicos, a partir de los cuales se aisló el RNA y por medio de RT-PCR se evaluó la expresión del IFN- γ .

Los resultados obtenidos complementan observaciones previas obtenidas de proyectos anteriores en el Laboratorio de Investigación en Inmunología, así mismo, se les puede relacionar con otros resultados reportados en la bibliografía. Además se refuerza la importancia del zinc como un elemento indispensable para el adecuado funcionamiento del sistema inmune, especialmente en etapas perinatales y podremos sugerir su uso como suplemento alimenticio en la dieta diaria durante los periodos estudiados.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Zinc

El zinc es uno de los elementos traza esenciales de mayor importancia en la nutrición humana ya que está ampliamente distribuido en los alimentos y en el cuerpo humano. Este elemento forma parte de alrededor de 120 enzimas (anhidrasa carbónica, carboxipeptidasas, fosfatasas alcalinas, ligasas, oxido-reductasas, transferasas, liasas, hidrolasas e isomerasas) (Salgueiro MJ, 2000). Además de ser cofactor de más de 300 enzimas.

El zinc es un metal muy importante ya que participa en múltiples procesos de nuestro organismo; interviene en procesos como: división celular, metabolismo de la vitamina A, almacenamiento y liberación de insulina, espermatogénesis, síntesis de proteínas, estabilización de macromoléculas, regulación de la transcripción y replicación, además de tener un papel muy importante en la respuesta inmune (Failla ML, 2003).

La ingesta recomendada de zinc es de 15 mg al día para adultos y 10 mg para niños (Salgueiro MJ, 2000); sin embargo, como suele ocurrir con otros elementos traza esenciales, no importa tanto el contenido absoluto de zinc en la dieta sino su biodisponibilidad en el organismo.

El cuerpo humano contiene entre 2 y 4 g de zinc, aunque en el plasma el zinc presenta una concentración de 12-16 $\mu\text{mol/L}$ (Ibs KH and Rink L, 2003). El zinc se transporta a las células unido a proteínas, predominantemente a la albúmina, α_2 -macroglobulina y transferrina, pero sólo los iones libres son biológicamente activos. Entra a las células en minutos y su absorción aumenta un poco durante las primeras horas (Rink L and Kirchner H, 2000).

Los efectos del zinc sobre el sistema inmune son muy significativos, sobre todo en las etapas de la infancia y la vejez. La carencia de este metal es frecuente en países en vías de desarrollo como consecuencia de una dieta pobre en proteínas y carbohidratos. Es por esto que el zinc se ha utilizado como complemento para ganar peso en niños desnutridos, controlar la diarrea, prevenir problemas gestacionales, etc. (Lastra MD *et al*, 2005).

El zinc favorece la proliferación en las células sin afectar los niveles de viabilidad (Bao B *et al*, 2003). Es un cofactor esencial para la timulina, hormona que participa en diversas funciones como la diferenciación de células T inmaduras, regulación de células T maduras en la periferia, modulación de la secreción de citocinas por las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), proliferación de células T CD8⁺ en combinación con Interleucina-2 (IL-2) y la expresión del receptor de alta afinidad para IL-2 en células T maduras (Rink L and Kirchner H, 2000).

2.1.1 Deficiencia de zinc

La deficiencia de zinc es un problema nutricional mundial que afecta a la población entera tanto de países en desarrollo como de los desarrollados y los grupos de mayor riesgo son los recién nacidos, niños, mujeres embarazadas y ancianos.

Existen dos causas principales de la deficiencia de zinc: en el primer grupo están diferentes síndromes relacionados con el metabolismo o disfunciones genéticas, en el segundo grupo están las causas nutricionales, las cuales son las más importantes y comunes tales como el consumo de alimentos con bajo contenido en zinc y la desnutrición que predomina en países tercermundistas (Salgueiro MJ, 2000).

Las consecuencias de la deficiencia de zinc son muy variadas y tienen un gran impacto en la salud. Perturba diferentes funciones biológicas como la expresión genética, la síntesis de proteínas, el crecimiento y maduración de los huesos, el desarrollo gonadal, el embarazo, el sentido del gusto y el apetito (Takagi H *et al*, 2001).

En las mujeres puede causar infertilidad, una labor de parto prolongada, crecimiento intrauterino retardado, teratogénesis, deficiencias inmunológicas severas o muerte fetal (Lastra MD *et al*, 2005). Así mismo, aumenta el riesgo de tener partos prematuros y abortos, lo que puede ser resultado de la activación de células T aloreactivas normalmente suprimidas (Rink L and Kirchner H, 2000).

Los efectos de la deficiencia de zinc en el sistema inmune incluyen una rápida atrofia tímica, linfopenia acelerada con pérdida concomitante de anticuerpos y respuestas mediadas por células, reducción en el número de linfocitos, disminución considerable en la linfopoyesis de células B en la médula ósea, pérdida importante de células precursoras de linfocitos T en el timo (King LE and Fraker PJ, 2002).

Así mismo, la actividad de células NK, la fagocitosis de los macrófagos y neutrófilos, ciertas funciones como la quimiotaxis o la generación del estallido respiratorio, se ven alteradas por una baja concentración de zinc *in vivo* (Rink L and Kirchner H, 2000). La deficiencia de zinc probablemente lleve a una citotoxicidad inespecífica, ya que es necesario en las células NK para el reconocimiento de las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad clase I (MHC-I, por sus siglas en inglés) por los receptores p58KIR que inhiben su actividad citotóxica (Ibs KH and Rink L, 2003).

La deficiencia de zinc produce un desbalance entre las funciones de las células Th1 y Th2, dando como resultado la reducción significativa en los niveles de IL-2 e IFN- γ en las células (respuesta Th1); mientras que los productos de Th2 como IL-4, IL-6 e IL-10 no se ven alterados (Rink L and Kirchner H, 2000). Además, se produce un aumento en citocinas inflamatorias como el TNF- α , IL-1, e IL-8 y disminuye la activación de factores de transcripción como NF- κ B (Bao B *et al*, 2003).

2.1.2 Suplementación con zinc

Los suplementos de zinc pueden revertir el retardo en el crecimiento, el hipogonadismo, los cambios sensoriales, las funciones cognitivas alteradas, etc. (Failla ML, 2003). También retrasan la atrofia tímica, reducen la susceptibilidad a infecciones oportunistas y reestablecen la secreción de IFN- α en adultos mayores (Rink L and Kirchner H, 2000).

La suplementación con bajas dosis de zinc resulta en una activación de la respuesta humoral después de la vacunación, mientras que la suplementación con altas dosis no favorece la producción de anticuerpos (Rink L and Kirchner H, 2000).

Durante el embarazo, se ha observado que la viabilidad de los embriones aumenta significativamente en las hembras suplementadas con zinc (Lastra MD *et al*, 2005).

Varios trabajos basados en la suplementación con zinc muestran que este metal tiene la ventaja de ser no tóxico, aunque en dosis mayores a 30 μM tiene más efectos inhibitorios que estimulantes (Rink L and Kirchner H, 2000). A una concentración de 100 μM , se suprimen las funciones de las células T y las NK mientras que se activan los monocitos; las concentraciones de zinc de 500 μM inducen actividades quimiotácticas directamente sobre leucocitos polimorfonucleares (Ibs KH and Rink L, 2003).

La suplementación con zinc *in vitro* de poblaciones puras de células T no muestra liberación de citocinas, lo que confirma que la estimulación de los linfocitos T con zinc es dependiente de la presencia de monocitos. La IL-1, IL-6 y el contacto célula-célula entre monocitos y células T son necesarios para la producción de IFN- γ y sIL-2R (receptor soluble para IL-2). La suplementación con zinc resulta en un incremento de células T (CD4^+ y citotóxicas), células NK, una producción elevada de IL-2 y sIL-2R y una mejora en la respuesta inmune mediada por células (Rink L and Kirchner H, 2000).

El zinc ha sido estudiado por sus efectos antivirales contra HIV, rinovirus y herpes virus, ya que este elemento favorece la dimerización del IFN, lo que lleva a la activación de su receptor y a una mejor respuesta antiviral (Takagi H *et al*, 2001).

2.2 Interferón gamma (IFN- γ)

Un interferón se define como una “proteína que presenta actividad antiviral no específica, a través de procesos metabólicos relacionados con la síntesis tanto de proteínas como de RNA y que es secretada en respuesta a diversos estímulos” (Pestka S *et al*, 2004). Esto significa que el interferón (IFN) ejerce una acción antiviral indirecta mediante la inducción de genes cuyos productos inhiben la replicación viral (Dawson M, 1991).

2.2.1 Clasificación

En un principio, los interferones se clasificaron de acuerdo al tipo de células que los secretaban; sin embargo, ahora se les clasifica en tipo I o tipo II de acuerdo a la especificidad de su receptor y a la homología de sus secuencias.

Los interferones del tipo I, también denominados virales, se componen de siete clases: IFN- α (14 subtipos), IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ e IFN- τ (encontrado únicamente en rumiantes); los cuales se encuentran relacionados estructuralmente. Se unen a un receptor heterodímero común (IFN- α R) y son secretados en bajas cantidades por la mayoría de las células; sin embargo, las células hematopoyéticas son las mayores productoras de IFN- α e IFN- ω ; mientras que los fibroblastos son la principal fuente de IFN- β , aunque los macrófagos también son capaces de producirlos. La expresión de los interferones tipo I es inducida por infecciones virales y los receptores TLR (Toll-like receptors) desempeñan un papel muy importante en la misma (Pestka S *et al*, 2004).

Dentro del tipo II, se encuentra al IFN- γ , o interferón inmune. No está estructuralmente relacionado con los interferones del tipo I, se une a un receptor distinto (IFN- γ R) y es codificado en un locus diferente. El IFN- γ es producido por los linfocitos T cooperadores CD4⁺ del tipo 1 (Th1), linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y las células asesinas naturales (NK)

cuando se estimulan con antígenos o con mitógenos. Recientemente se ha descrito que células como los linfocitos B, células NKT y las células presentadoras de antígenos profesionales (monocitos/macrófagos, células dendríticas) también son capaces de secretar IFN- γ (Schroder K *et al*, 2004).

2.2.2 Estructura

El gen del IFN- γ está localizado en el cromosoma 12 (12q14) en el humano y en el cromosoma 10 en el ratón. La proteína presenta una estructura altamente conservada, aún entre diferentes especies, que consiste de cuatro exones y tres intrones (Young HA and Hardy KJ, 1995). Los interferones del tipo I son codificados en el cromosoma 9 (9p21) en el humano y en el cromosoma 4 en el ratón. Todos carecen de intrones (Samuel CE, 2001).

El IFN- γ humano es una glicoproteína homodimérica formada por la asociación antiparalela de dos subunidades de 21 a 24 kD; cada subunidad tiene seis alfa-hélices, no hay hojas beta-plegadas. Las subunidades tienen una forma elíptica aplanada, mientras que la estructura general de la proteína es de un dímero globular (Ealick SE *et al*, 1991).

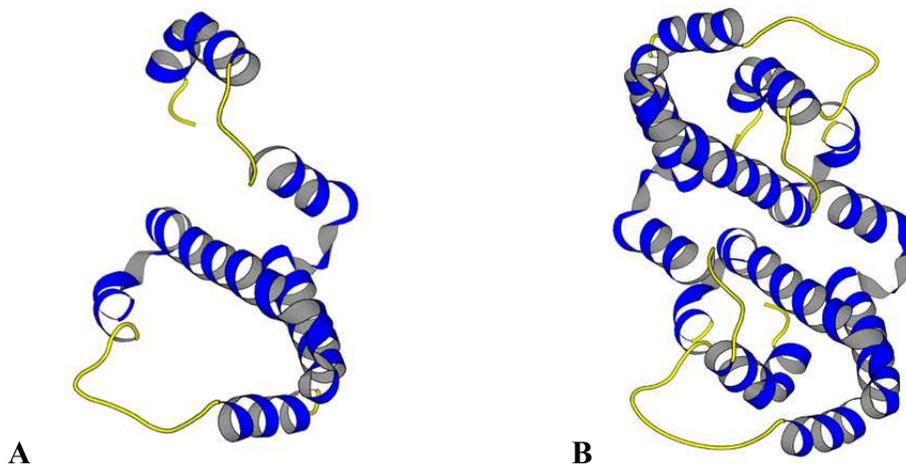


Figura 1. Estructura tridimensional del IFN- γ . **A.** Estructura monomérica. **B.** Estructura dimérica. (Tomado de Ealick SE *et al*, 1991)

El IFN- α lleva a cabo sus funciones como una molécula monomérica; mientras que los interferones IFN- β e IFN- γ actúan en forma de dímeros. Como ya se mencionó, los interferones virales son producidos en respuesta a infecciones por virus; en cambio, el IFN- γ puede ser producido por un estímulo antigénico o por uno mitógeno (Samuel CE, 2001). Algunas de las propiedades fisicoquímicas de los interferones se resumen en la Tabla 1.

<i>Propiedad</i>	<i>IFN-α</i>	<i>IFN-β</i>	<i>IFN-γ</i>
pI	5 – 6.5	7.8 – 8.9	7 – 9
Tamaño	189 aa (precursor) 166 aa (maduro)	187 aa (precursor) 166 aa (maduro)	166 aa (precursor) 143 aa (maduro)
Peso molecular	19.7 K	20 K	17.1 K
Estabilidad	Ácido resistente	Ácido resistente	Lábil al ácido y al calor

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los interferones. (modificada de Fitzgerald K, 2001)

2.2.3 Efectos del IFN- γ

La estimulación de los macrófagos con el IFN- γ induce mecanismos antimicrobianos y antitumorales, además de regular funciones como el procesamiento y la presentación de antígenos. El IFN- γ es capaz de inducir la atracción de leucocitos hacia el sitio de infección. Así mismo, dirige el crecimiento, la maduración y la diferenciación en muchos tipos de células; también mejora la actividad de las células NK y regula funciones de los linfocitos B como la producción de anticuerpos y el cambio de isotipo (Schroder K *et al*, 2004). Los principales efectos del IFN- γ se resumen en la Tabla 2.

El IFN- γ es secretado después de un estímulo apropiado y se une a receptores de superficie de las células adyacentes no infectadas. Posteriormente, promueve una serie de estímulos, donde participan algunas enzimas como proteína cinasas y la 2',5'-poliadenilato sintetasa (2-5A), que interfieren con la síntesis de las proteínas virales; aunque para un correcto funcionamiento de ellas, se requiere la presencia de RNA de doble cadena (Dawson M, 1991).

Actividad biológica	Célula blanco
Inhibición de la replicación viral	Todas las células nucleadas
Inhibición del crecimiento celular	Células normales y tumorales <i>in vivo</i>
Promoción de la diferenciación celular	Células mielomonocíticas HL60 cultivadas
Aumento de la expresión del MHC	Todas las células nucleadas (Clase I); macrófagos, monocitos, linfocitos B, células endoteliales (Clase II)
Incremento en la fagocitosis	Macrófagos
Incremento de la citotoxicidad	Macrófagos, monocitos, células NK, linfocitos T citotóxicos
Incremento en la producción de anticuerpos	Células plasmáticas
Disminución de células B	Células B en proliferación

Tabla 2. Actividades biológicas del IFN- γ (tomada de Dawson M, 1991).

Todos los interferones poseen la capacidad de inhibir el crecimiento celular, siendo el de mayor potencia el IFN- γ . Dependiendo del tipo celular, el efecto puede ser citostático, donde las células simplemente dejan de crecer, o citolítico en donde las células son destruidas, como en el caso de células transformadas.

Una característica exclusiva del IFN- γ es la de promover la diferenciación celular; por ejemplo, células pro-mielomonocíticas cultivadas *in vitro* son capaces de desarrollarse hacia monocitos o granulocitos dependiendo del estímulo; el IFN- γ promueve su diferenciación hacia monocitos.

El IFN- γ inhibe la producción de células plasmáticas completamente diferenciadas a partir de linfocitos B estimulados, ya que este proceso depende de la división celular. En ratones, el IFN- γ interviene en la diferenciación de las células B al influenciar el cambio de isotipo.

Los interferones del tipo I son capaces de aumentar la expresión de los antígenos de superficie del MHC Clase I, así como la β 2-microglobulina. El IFN- γ también incrementa dicha expresión e inclusive lo hace con una mayor actividad específica.

El IFN- γ es el único de los interferones que es capaz de inducir la expresión de la región MHC Clase II, ya que además de incrementar la producción de dichas moléculas en células que normalmente presentan estas proteínas, también puede inducir la expresión *de novo* en células que normalmente no lo hacen. Por ejemplo, en enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide en donde se libera IFN- γ como respuesta a la inflamación, en los tejidos circundantes frecuentemente se encuentran células que expresan moléculas del MHC Clase II. A la larga, esto podría desencadenar una respuesta autoinmune, ya que las células inducidas podrían presentar auto-antígenos. La expresión de moléculas del MHC en células tumorales está asociada con una disminución en la sensibilidad al ataque de las células NK (Dawson M, 1991).

Además del incremento en la expresión de moléculas del MHC, el IFN- γ es capaz de aumentar la expresión de otras proteínas de membrana como la molécula CD4 presente en los linfocitos cooperadores; los receptores para la región Fc de la IgG en neutrófilos y monocitos; así como para la proteína citoplásmica tubulina. También es capaz de disminuir la expresión de otras proteínas como el receptor de superficie para la transferrina.

El IFN- γ es el anteriormente llamado Factor Activador de Macrófagos (MAF, por sus siglas en inglés), puesto que se ha observado que cuando los macrófagos son expuestos *in vitro* al sobrenadante de linfocitos estimulados, se presenta un aumento en el metabolismo oxidativo, lo que incrementa varias veces los niveles normales de peróxido de hidrógeno; además, los macrófagos expuestos a concentraciones picomolares de IFN- γ matan e ingieren bacterias, protozoarios y levaduras en cantidades mucho mayores que las células no tratadas (Dawson M, 1991).

El efecto del IFN- γ sobre la producción de anticuerpos depende principalmente del tiempo de administración. Por ejemplo, si se administra temprano en la respuesta inmune, el IFN- γ suprime la producción de anticuerpos. Esto se debe a la inhibición de la proliferación celular. Sin embargo, si el IFN- γ es administrado tardíamente en la respuesta inmune, puede haber un incremento en la producción de anticuerpos; ya que el interferón puede favorecer las funciones específicas de las células diferenciadas. El IFN- γ puede acelerar la maduración de una célula NK inmadura a una célula completamente funcional.

El efecto antitumoral del IFN- γ está relacionado con la estimulación de las células NK, la cual ocurre a diferentes niveles, dentro de los que se incluyen:

- ✦ La citotoxicidad de las células NK aumenta dramáticamente después de la incubación con los interferones de todas las clases
- ✦ Las células NK secretan IFN- α al entrar en contacto con células tumorales
- ✦ Las células NK son capaces de producir IFN- γ , siendo el principal estímulo para su liberación la producción de IL-2 por los linfocitos T cooperadores

Todos los interferones tienen cierta toxicidad *in vivo*, pueden ocasionar síntomas como fiebre, dolor de cabeza, fatiga, pérdida del apetito y vómito, causando una disminución dramática de peso. En dosis altas los interferones pueden inducir trastornos neuronales (Dawson M, 1991).

2.2.4 El receptor para IFN- γ

Todos los interferones ejercen sus funciones a través de la vía de señalización Jak-Stat (Janus kinase – Signal transducer and activator of transcription). El IFN- γ se une a su receptor específico y activa las cinasas Jak1, Jak2 y Stat1 principalmente; aunque frecuentemente también se activa Stat3 y ocasionalmente Stat5. Adicionalmente, el IFN- γ utiliza otras vías como la de la Fosfatidilinositol 3-Cinasa (PI3K), la cinasa Akt, la del Factor Nuclear kappa B (NF- κ B) y la de la Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (MAPK) (Pestka S *et al*, 2004).

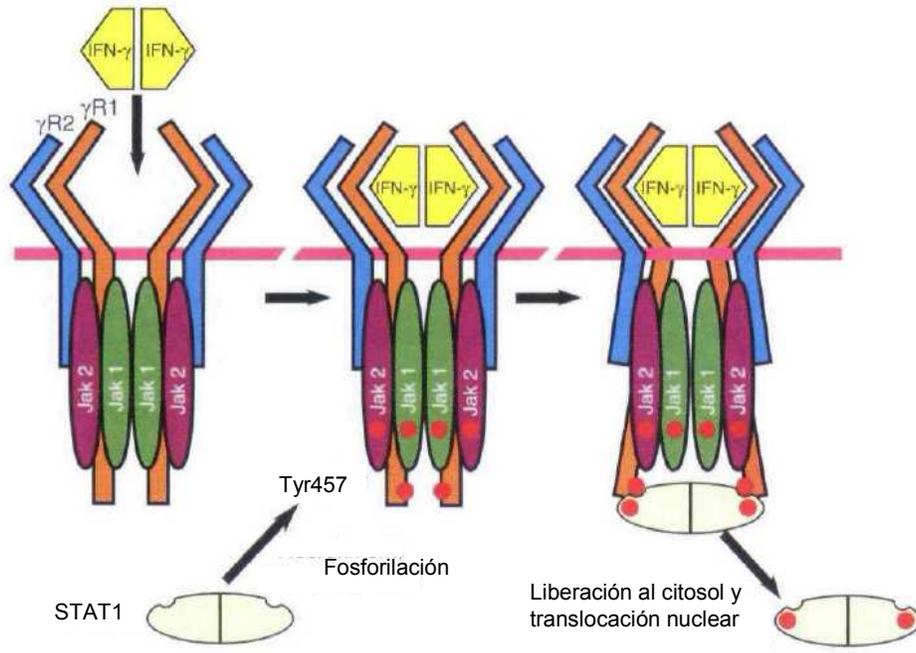


Figura 2. Vía de señalización del IFN- γ (Modificada de Pestka S *et al*, 2004).

El receptor para IFN- γ (IFN- γ R) está constituido por dos cadenas preensambladas, IFN- γ R1 y IFN- γ R2, que forman un complejo funcional de 4 cadenas. El IFN- γ se une a la cadena IFN- γ R1. Posteriormente, las cinasas Jak1 y Jak2 se fosforilan mutuamente lo que induce la fosforilación de la tirosina 457 de la cadena IFN- γ R1. En este sitio se une un dímero de la proteína Stat1, produciendo un cambio conformacional en las cadenas que activará dicha proteína mediante su fosforilación. Finalmente, Stat1 activada se libera y migra hacia el núcleo, donde se iniciará la transcripción de los genes regulados por el IFN- γ (ISRE, Interferon-stimulated response element) (Figura 2) (Pestka S *et al*, 2004).

2.3 Linfocitos T cooperadores (Th)

Como se describió anteriormente, los linfocitos T CD4⁺, mejor conocidos como cooperadores o Th (por sus siglas en inglés), son los principales productores de IFN- γ . Sin embargo, existen diferentes subpoblaciones de estos linfocitos, de las cuales dos se consideran como las principales, los linfocitos Th1 y los Th2, que se caracterizan por secretar un patrón específico de citocinas. Los linfocitos Th1 producen IL-2 e IFN- γ , así como el factor de necrosis tumoral β (TNF- β); mientras que los linfocitos Th2 liberan principalmente IL-4, IL-5 e IL-10, además de la IL-6 e IL-9. Los linfocitos Th que secretan los dos patrones de citocinas se denominan Th0 y son considerados como los precursores de los linfocitos Th1 y Th2. Existen otros linfocitos T cooperadores llamados Th3 o reguladores (Treg), que producen el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en grandes cantidades (Mossmann TR and Sad S, 1996).

2.3.1 Respuestas Th1 y Th2

Las funciones de los linfocitos Th1 y Th2 se correlacionan con el patrón de citocinas que producen. Los linfocitos Th1 están relacionados con reacciones inflamatorias mediadas por células. Además, las células Th1 participan en reacciones de hipersensibilidad tardía (DTH). En cambio, las citocinas del tipo Th2 favorecen la producción de anticuerpos, particularmente del tipo IgE relacionado con las alergias, también inducen la proliferación y favorecen la función de los eosinófilos (Figura 3).

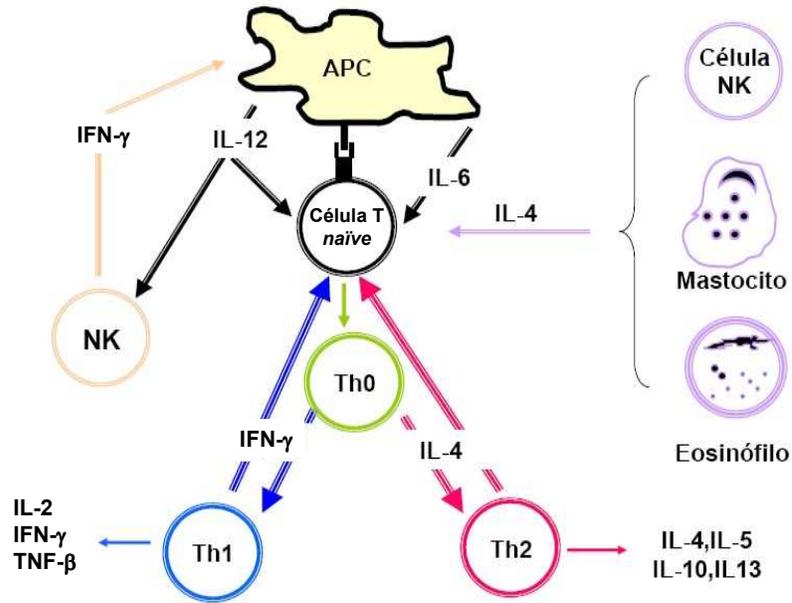


Figura 3. Respuesta Th1/Th2. Las células T cooperadoras, Th, se dividen en dos subpoblaciones principales, caracterizadas por las citocinas que produce cada una: los linfocitos Th1 secretan IL-2, IFN- γ y TNF- β (linfotoxina); mientras que los linfocitos Th2 liberan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (modificado de Kidd P, 2003).

Las respuestas Th1 y Th2 son mutuamente inhibitorias entre sí; esto es, el IFN- γ , producto Th1, inhibe la proliferación de las células Th2; y las IL-4 e IL-5 inhiben las síntesis de citocinas del tipo Th1. Es por esto que durante las infecciones, se monta una respuesta inmune encaminada hacia un tipo u otro. Sin embargo, estas respuestas pueden ser alteradas por estímulos potentes con la presencia de otras citocinas; por ejemplo, la IL-2 y la IL-12 favorecen la síntesis de IFN- γ ; mientras que la IL-10 puede inhibir su producción. Esto sirve como inmunomodulación sin cambiar permanentemente el fenotipo principal de la respuesta (Mossmann TR and Sad S, 1996).

3. JUSTIFICACIÓN

La línea principal de investigación del Laboratorio de Investigación en Inmunología, Estudio de los Elementos Traza en la Respuesta Inmune, se toma a partir de la problemática presentada en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, donde se observó una relación muy estrecha entre niños desnutridos y la alta frecuencia de infecciones.

Debido a los graves efectos que se presentan por la falta de zinc en las etapas perinatales, se decidió desarrollar un modelo experimental utilizando ratones de la cepa BALB/c, a los cuales se les suministró zinc durante la gestación, la lactancia y la post-lactancia. Esto ha permitido la observación de las variaciones inmunológicas en el modelo *in vivo* y la evaluación de dichos cambios *in vitro*, utilizando técnicas inmunológicas y moleculares.

Se ha encontrado que el zinc es capaz de incrementar la proliferación de los linfocitos T, así como la producción de citocinas, principalmente inflamatorias, como la IL-1, IL-12, y TNF- α ; además de IFN- γ e IL-2 (Aguilar AE *et al*, 2004).

Adicionalmente, nuestros estudios han demostrado que el zinc participa en otros procesos no inmunológicos. Se ha observado una mayor fertilidad en los animales y una menor mortalidad de los mismos cuando se les administra zinc durante la gestación (Lastra MD *et al*, 2005). Así mismo, se ha observado que este metal contribuye a la disminución dramática de la carga parasitaria en casos de cisticercosis, confiriendo una protección importante (Fragoso G *et al*, 2001).

Puesto que en trabajos previos hemos demostrado que el zinc induce la producción de citocinas como la IL-12 que, a su vez, favorece una respuesta Th1 caracterizada por la secreción de IL-2 e IFN- γ , en este trabajo se decidió estudiar la influencia de la administración de zinc durante las etapas de gestación, lactancia y destete sobre la expresión genética del IFN- γ en esplenocitos murinos.

4. HIPÓTESIS

Los ratones suplementados con zinc presentarán una mayor expresión de interferón gamma en comparación con los grupos testigo; lo que les permitirá responder de una manera más adecuada frente a una infección.

5. OBJETIVOS

General

- ♦ Determinar los efectos que tiene el zinc sobre la expresión genética del IFN- γ en las etapas perinatales de ratones BALB/c.

Específicos

- Estandarizar el procedimiento de RT-PCR utilizando la enzima *rTth* DNA polimerasa para la expresión de IFN- γ en ratones en etapas perinatales.
- Evaluar los efectos del zinc sobre la expresión del IFN- γ en linfocitos esplénicos murinos estimulados con Forbol-12-Miristato-13-Acetato y con Ionomicina de calcio mediante RT-PCR.
- Determinar la concentración intracelular de zinc en los linfocitos murinos mediante Absorción Atómica y relacionarla con la expresión genética del IFN- γ .

6. METODOLOGÍA

6.1 Animales

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, machos y hembras, los cuales se alojaron en cajas de plástico con cubiertas de acero inoxidable y fondo de aserrín. Las botellas de agua tuvieron tapones de polietileno y tubos bebederos de vidrio. Los animales se alimentaron *ad libitum* con alimento comercial 2018S Harlan Teklad Global Diets (Madison, Winsconsin, USA).

6.1.1 Suplementación con zinc

Con el propósito de estudiar los efectos de la suplementación con zinc en las etapas perinatales, los animales recibieron *ad libitum* agua de beber con 500 mg/L (500 ppm) de acetato de zinc (Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., México, No.Cat. 8740), el cual se les administró a partir del día de cruce de los progenitores. Los animales se dividieron en dos grupos experimentales de acuerdo con la tabla 2.

6.1.2 Grupos de tratamiento

Los animales del grupo 1 (n=20) fueron las crías que recibieron la dosis de zinc durante los periodos de la gestación y la lactancia, y que corresponden a los ratones con 6 semanas de tratamiento (ratones de tres semanas de edad). El grupo 2 (n=20) fueron las crías que recibieron la dosis de zinc durante los periodos de gestación, lactancia y post-lactancia, 9 semanas de tratamiento (ratones de seis semanas de edad). Los grupos testigo, de edades correspondientes, (cada uno n=20) se mantuvieron en las mismas condiciones pero sin recibir zinc.

<i>Grupos</i>	Periodo de tratamiento con zinc (mg/L)		
	<i>Gestación</i> F_0 --- F_1	<i>Lactancia</i> F_1	<i>Destete</i> F_1
	<i>3 semanas</i>	<i>3 semanas</i>	<i>3 semanas</i>
Grupo 1	500	500	---
Testigo 1	0	0	---
Grupo 2	500	500	500
Testigo 2	0	0	0

Tabla 2. Grupos de tratamiento con zinc. El grupo 1 son crías que recibieron 500 mg/L de zinc durante los periodos de gestación y lactancia (6 semanas de tratamiento). El grupo 2 son crías que recibieron la dosis de 500 mg/L durante los periodos de gestación, lactancia y post-lactancia (9 semanas de tratamiento). Los testigos correspondientes no recibieron zinc.

6.2 Estudio de la expresión genética de IFN- γ por linfocitos esplénicos

Se realizaron ensayos semicuantitativos mediante el ensayo de la transcriptasa reversa – reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para evaluar los efectos de la suplementación oral con zinc sobre la expresión del gen del IFN- γ en linfocitos esplénicos estimulados con Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA) (Sigma-Aldrich Co, St Louis MO, USA, No.Cat. P1585) y Ionomicina de calcio (I) (Sigma-Aldrich Co, St Louis MO, USA, No.Cat. I0634), obtenidos de las crías del grupo 1, del grupo 2 y de los grupos testigos correspondientes.

6.2.1 Obtención de los esplenocitos

En condiciones de esterilidad, se extrajo el bazo y mediante perfusión con 5 mL de medio RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad CA, USA, No.Cat. 21870) se obtuvieron los esplenocitos. Las células se lavaron por centrifugación a 250g, temperatura ambiente, durante 10 minutos, con medio RPMI 1640 en tubos para centrífuga de 15 mL (Corning Inc, Acton MA, USA, No.Cat. CLS430052). Se contó el número de linfocitos verificando una viabilidad mayor al 95% por exclusión con el colorante azul tripano (Sigma-Aldrich Co, St Louis MO, USA, No.Cat. T6146) y se ajustó la concentración de la suspensión celular a 4×10^6 células/mL en medio RPMI 1640 suplementado.

6.2.2 Estimulación de los linfocitos

Con el fin de determinar el tiempo óptimo de expresión genética, se llevó a cabo una cinética de expresión para el IFN- γ con animales testigo de 6 semanas de edad que no fueron suplementados con zinc. Se realizaron cultivos de linfocitos esplénicos en tubos de cultivo de poliestireno (Elkay Products, Inc, MA, USA, No.Cat. 000-2058-STR). En cada tubo se depositaron 4×10^6 células de las suspensiones de linfocitos en un volumen de 1 mL. Para activarlos, se adicionaron 50 ng de PMA y 0.5 μ g de I por cada 10^6 células, mientras que otros tubos control con las células sólo contenían medio de cultivo. La estimulación se realizó a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y se tomaron muestras de 1 mL a las 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 20 horas. Las células se transfirieron a un tubo estéril para microcentífuga (Corning Inc, Acton MA, USA, No.Cat. CLS3213) y se lavaron con 1 mL de PBS estéril a 750g, 4 °C durante 10 minutos (Centrífuga IEC Centra-M2, USA).

Una vez que se determinó el tiempo óptimo de estimulación de acuerdo a la cinética de expresión de la citocina, los esplenocitos provenientes de los grupos experimentales y sus testigos fueron estimulados únicamente durante este tiempo.

6.2.3 Aislamiento de RNA total

El RNA total se aisló de la suspensión de linfocitos mediante el método de Chomczynski & Sacchi, que utiliza una solución de tiocianato de guanidina/fenol (TriPure[®] Isolation Reagent, Roche, Indianapolis, USA, No.Cat. 11667157001).

Se adicionó 1 mL de TriPure[®] y se lisaron las células por agitación en vórtex durante 30 segundos. Las muestras se mantuvieron a -70°C durante 24 horas. Posteriormente se adicionaron 200 μ L de cloroformo (J.T. Baker S.A. de C.V., México, No.Cat. 9180) y se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Se incubó durante 10 minutos en hielo y se centrifugó a 12,000g durante 15 minutos a 4°C. El DNA y las proteínas permanecieron en la interfase insoluble (blanca) y en la fase orgánica (rosa); la fase acuosa (incolora) donde se encuentra el

RNA (aproximadamente 700 μL) se transfirió a otro tubo estéril. Se adicionaron 500 μL de isopropanol (J.T. Baker S.A. de C.V., México, No.Cat. 9084) para precipitar el RNA y se agitó por inversión suave. Se incubó durante toda la noche a -20°C . Al día siguiente se centrifugó a 12,000g durante 10 minutos a 4°C , se decantó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 mL de etanol 75% (J.T. Baker S.A. de C.V., México, No.Cat. 9000), agitando brevemente en vórtex. Se centrifugó a 7,500g durante 5 minutos a 4°C y se retiró completamente el sobrenadante. Se dejó secar el botón de RNA y se resuspendió en 50 μL de agua libre de nucleasas. Se determinó su pureza y concentración, 1 UA a 260 nm fue equivalente a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la relación $260/280=2$ indicó una preparación libre de proteínas (Espectrofotometro Beckman DU-650). Las muestras se almacenaron a -70°C en el ultracongelador.

6.2.4 RT-PCR

La transcripción reversa del RNA a cDNA y la amplificación del cDNA a través de la PCR de punto final, se realizó utilizando la enzima *rTth* DNA polimerasa y un equipo de reactivos comercial (GeneAmp[®] PCR Kit, Perkin Elmer, NJ, USA, No.Cat. 808-0179) bajo las siguientes condiciones de reacción:

REACTIVO	Volumen por Reacción	Concentración Final
RNA total	1 μg	1 μg
Cebadores, 25 μM	2 μL	1 μM
Amortiguador EZ 5X	10 μL	1X
dNTP's, 10 mM c/u	1.5 μL c/u	300 μM
<i>rTth</i> DNA polimerasa, 2.5 UI/mL	2 μL	0.1 UI/ μL = 5 UI
Acetato de manganeso, 25 mM	5 μL	2.5 mM
Agua libre de nucleasas	cbp 50 μL	---

El ciclo de reacción* que se utilizó fue el siguiente:

1. Transcripción	30 minutos	60 $^{\circ}\text{C}$	1x
2. Etapa inicial	30 segundos	94 $^{\circ}\text{C}$	1x
3. Desnaturalización	15 segundos	94 $^{\circ}\text{C}$	35x
4. Alineamiento y extensión	30 segundos	60 $^{\circ}\text{C}$	
5. Etapa final	7 minutos	60 $^{\circ}\text{C}$	1x

* Equipo termociclador MyCycle (BIO-RAD, Inc., CA, USA)

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, No.Cat. A6013), se aplicó una diferencia de potencial de 60 volts y el corrimiento se realizó junto con los marcadores de peso molecular (50–1000 bp ladder, Bio-Ladder, Bio-Synthesis, Lewisville TX, USA, No.Cat. 54-1002-100). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA, No.Cat. E8751) y se expusieron a la luz UV, finalmente se digitalizaron (Gel Doc 2000, BIO-RAD Inc, CA, USA). El cálculo de la concentración relativa se obtuvo por análisis densitométrico de los productos de amplificación (Software Quantity One versión 4.6.3, BIO-RAD Inc, CA, USA).

6.3 Determinación del zinc intracelular

Se determinó la concentración intracelular de zinc en los esplenocitos murinos de los animales suplementados y de sus testigos mediante Espectrometría por Absorción Atómica. Para ello, se contó con la colaboración de la Dra. Liliana Saldívar y de la Q. Nadia Munguía del Laboratorio de Espectroscopía de Absorción Atómica del Departamento de Química Analítica, Posgrado.

6.3.1 Obtención de la muestra

En condiciones libres de elementos traza, se extrajo el bazo de los ratones y se obtuvieron los esplenocitos mediante perfusión con 5 mL de medio RPMI 1640 (Gibco Laboratories, NY, USA). Se contó el número de linfocitos verificando una viabilidad mayor al 95% por exclusión con el colorante azul tripano (Flow Laboratories Inc., McLean VA, USA). La suspensión celular se centrifugó a 250g, durante 10 minutos, y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 mL de PBS estéril y se adicionó 1 mL de solución hemolítica. Se agitó suavemente durante 1 minuto y nuevamente se centrifugó a 250g por 10 minutos. La lisis se repitió cuantas veces fue necesario hasta que hubo desaparecido el botón rojo. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 mL de PBS y se calculó el número absoluto de células en la muestra (10^7 linfocitos).

6.3.2 Absorción atómica

La digestión de las células se realizó con una combinación de 1 mL de ácido nítrico concentrado (J.T. Baker S.A. de C.V., México, No.Cat. 9601) y 2 mL de peróxido de hidrógeno al 30% (Merck, Darmstadt, Germany, No.Cat. 7210), las muestras se mantuvieron en agitación a una temperatura regulada hasta que se tuvo una solución clara. La solución se llevó a un volumen final de 6 mL con agua desionizada y se dejó reposar por 24 horas a temperatura ambiente. Cada una de las muestras se filtró y posteriormente se llevaron al Laboratorio de Espectroscopía de Absorción Atómica para ser analizados cuantitativamente mediante Espectrometría de Absorción Atómica (espectrofotómetro PerkinElmer 2380, Waltham MA, USA). Las muestras fueron comparadas con un material de referencia (National Institute of Standards and Technology, Certificate of Analysis, Standard Reference Material 1577b, U.S. Department of Commerce).

Para asegurar una determinación correcta, todo el material utilizado para la preparación, manejo y almacenamiento de las muestras y el estándar, fue tratado con ácido nítrico 10% (J.T. Baker S.A. de C.V., México, No.Cat. 9601) durante 24 horas y posteriormente enjuagado con agua desionizada.

7. RESULTADOS

7.1 Estandarización de los ensayos y cinética de estimulación de esplenocitos

Se determinaron las condiciones óptimas para detectar la expresión del IFN- γ en esplenocitos murinos estimulados con Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA, 50ng/10⁶cél/mL) + Ionomicina de calcio (I, 0.5 μ l/10⁶cél/mL). Para esto fue necesario realizar una cinética de estimulación a diferentes tiempos (30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 20 horas).

A partir de las células estimuladas se aisló el RNA total y se realizó la electroforesis para verificar la integridad del ácido nucleico. En la Figura 1 se aprecian las bandas características del RNA ribosomal en un gel de agarosa al 1.5%. Las muestras corresponden al RNA obtenido de esplenocitos estimulados en diferentes tiempos.

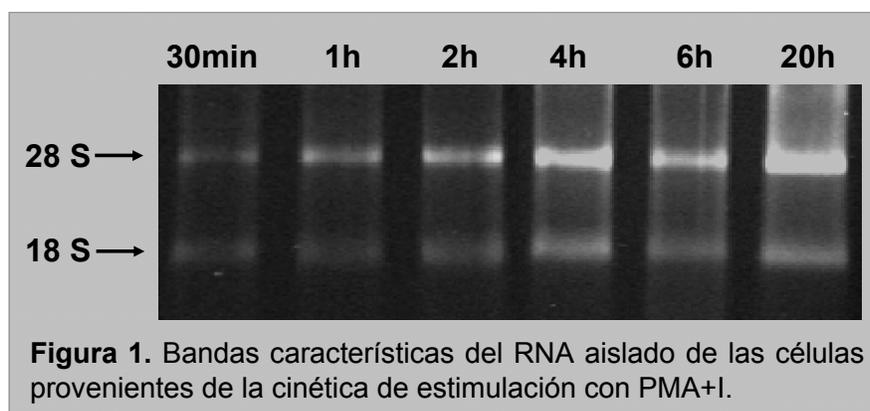
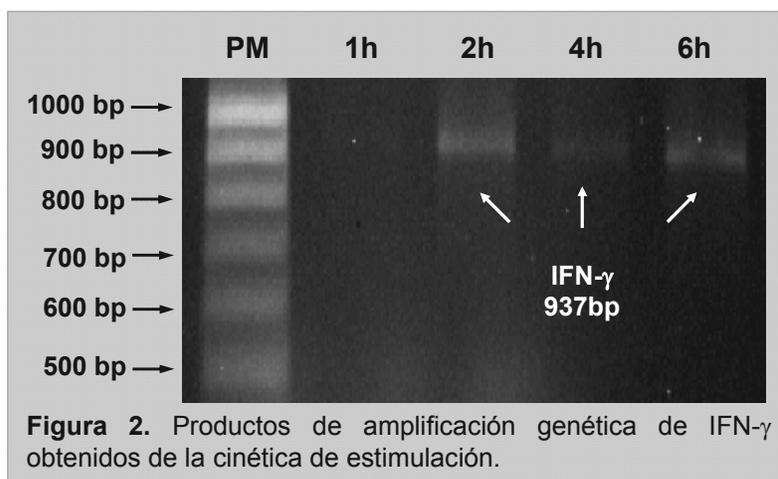


Figura 1. Bandas características del RNA aislado de las células provenientes de la cinética de estimulación con PMA+I.

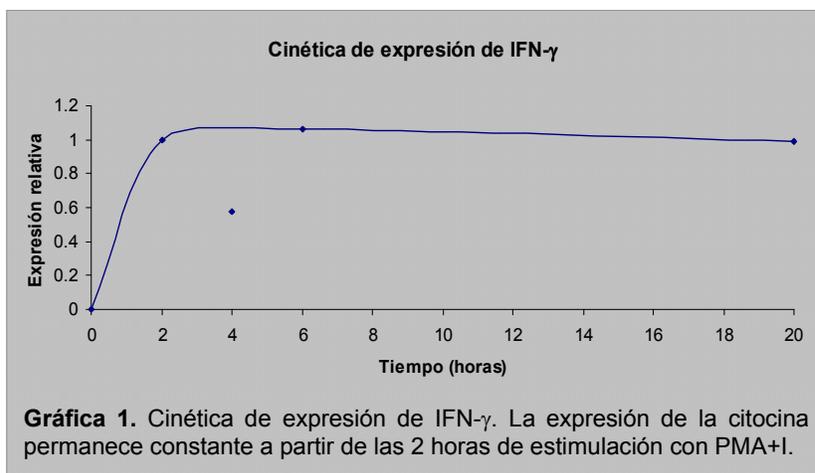
Posteriormente, se determinó la concentración de RNA de cada muestra y se ajustó la cantidad utilizada para realizar el RT-PCR (1 μ g), de esta manera se pudo comparar la expresión genética en cada muestra.

Se realizó la transcripción reversa para convertir el RNA en cDNA y a continuación se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se obtuvieron los amplificados correspondientes al IFN- γ , con un peso molecular de 937 pares de bases. Los cebadores utilizados fueron de origen comercial (PrimeScreen[®] Mouse Interferon- γ Primer Pair, BioSource International Inc, USA, No.Cat. GMC4022) y su secuencia es la siguiente:

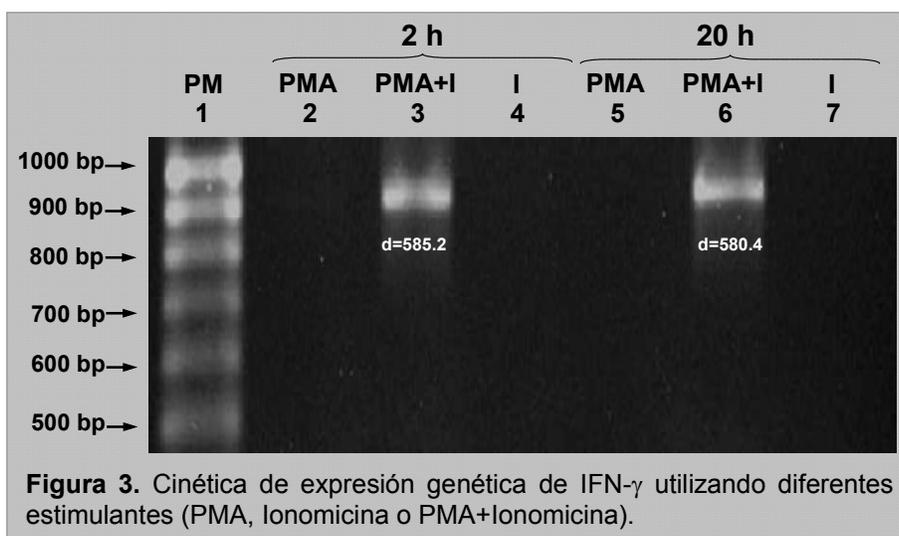
3': 5' – CCT GTT ACT ACC TGA CAC ATT CGA G – 3'
 5': 5' – GCT ACA CAC TGC ATC TTG GCT TTG C – 3'



A partir de la Figura 2 y de la Gráfica 1, se determina que la expresión del gen para IFN- γ es detectable a partir de las 2 horas de estimulación y que ésta permanece constante a lo largo del tiempo; se seleccionó como el tiempo mínimo de estimulación que se utilizaría en los futuros experimentos.



También se realizó una segunda cinética (2 y 20 horas) para ver la estabilidad del mRNA y verificar que los estimulantes utilizados fueran los adecuados, para esto se utilizaron los estimulantes por separado y en combinación. Las concentraciones utilizadas fueron para PMA 50 ng por cada 10^6 células, Ionomicina 0.5 μ g por cada 10^6 células y PMA+I en las mismas concentraciones.



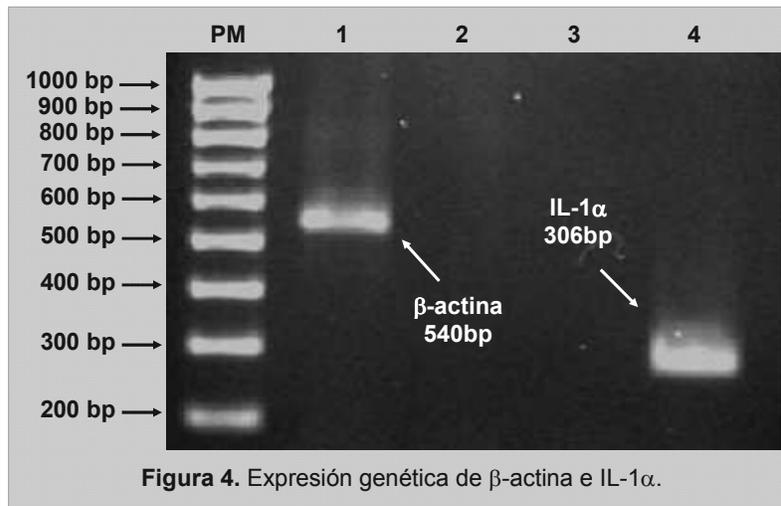
Como se observa en la Figura 3, la expresión del gen para IFN- γ sólo es posible utilizando la combinación de ambos estimulantes para activar las células. Así mismo, confirmamos la detección del mRNA específico para la citocina hasta 20 horas después del estímulo.

Utilizando un software (Quantity One versión 4.6.3, Bio-Rad Inc, USA), se midió la intensidad de las bandas para calcular la expresión relativa, y se determinó que la expresión genética se mantiene constante a lo largo del estímulo (Tabla 4).

Carril	Muestra	Densidad (int/mm ²)	Expresión relativa
3	2 h	585.20	1.00
6	20 h	580.36	0.99

Tabla 4. Análisis densitométrico de los amplificadores de RT-PCR para IFN- γ de la cinética de estimulación. El área analizada en cada banda del gel fue de 149.80 mm².

Para garantizar la validez de cada experimento se utilizaron diferentes controles; uno de ellos fue la expresión de la proteína constitutiva β -actina, la cual nos indicó que efectivamente se contaba con una muestra de RNA funcional; y un segundo control, la expresión de la interleucina 1 α (IL-1 α), que nos confirmó la integridad de los reactivos del kit para RT-PCR, ya que éste cuenta con un templado de cRNA que incluye diferentes secuencias genéticas para proteínas específicas, además de un juego de iniciadores que codifican para dicha citocina.



En la Figura 4 se aprecian las bandas correspondientes a los controles del experimento. La β -actina presenta una banda de 540 pares de bases, expresión relativa ER=1287.54, mientras que la interleucina 1 α (IL-1 α) tiene un peso de 308 pares de bases, ER=1380.47. La secuencia de los cebadores utilizados es:

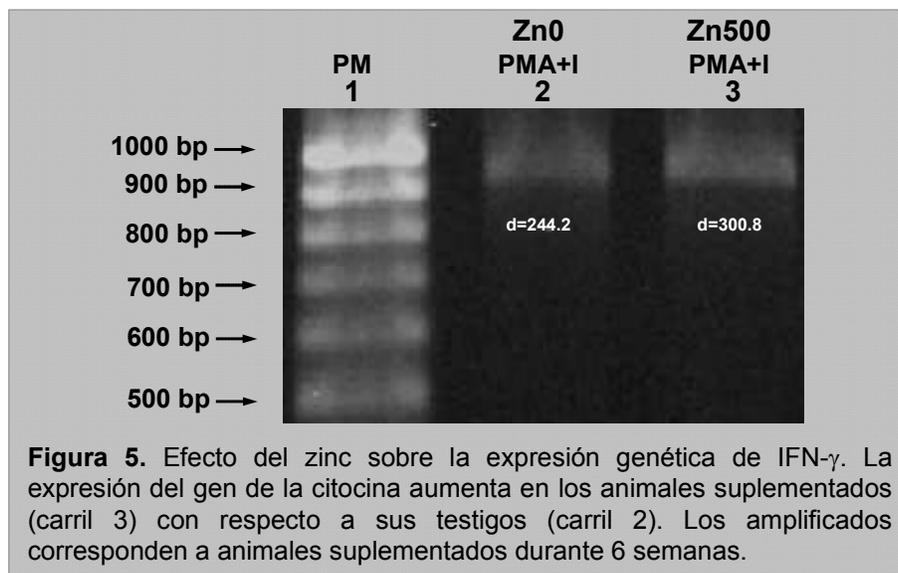
- β -actina (Bio-Synthesis, Lewisville, TX, USA, No.Cat. I266-1, H673-1)
 - 3': 5' – CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC – 3'
 - 5': 5' – GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA – 3'

- IL-1 α , pAW109 RNA (GeneAmp[®] EZ *rTth* RNA PCR Kit, PerkinElmer, NJ, USA)
 - 3' (DM151): 5' – GTC TCT GAA TCA GAA ATC CTT CTA TC – 3'
 - 5' (DM152): 5' – CAT GTC AAA TTT CAC TGC TTC ATC C – 3'

7.2 Efectos de la suplementación oral con zinc en la expresión genética del IFN- γ

7.2.1 Grupo 1

En los animales pertenecientes al Grupo 1 (Zn500, 6 semanas de tratamiento) se observó que la suplementación con zinc favorece la expresión genética del IFN- γ . En la Figura 5 se observa que la expresión de la citocina es mayor en los animales suplementados comparándolos con el grupo testigo (Zn0) y corresponde a un ensayo representativo.

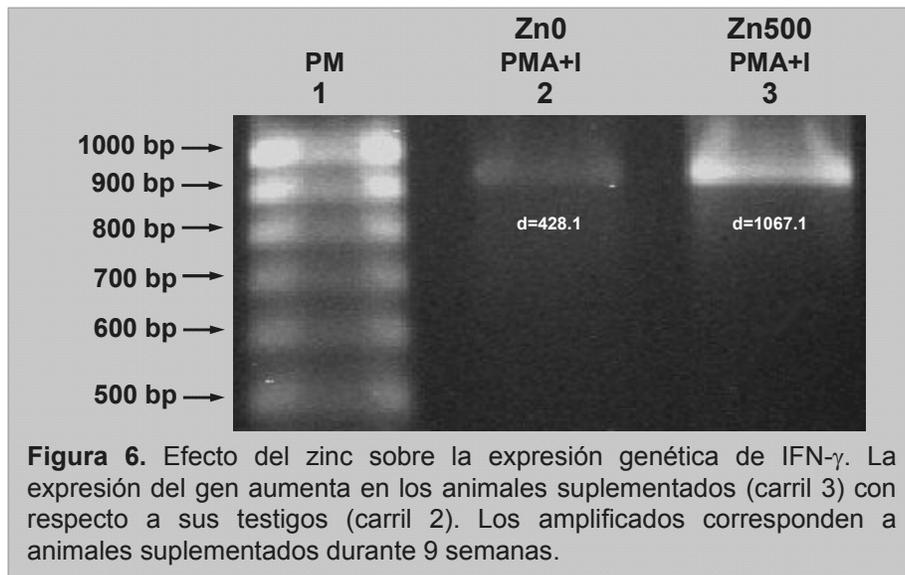


Carril	Muestra	Densidad (int/mm ²)	Expresión relativa
2	Zn0 PMA+I	244.23	1.00
3	Zn500 PMA+I	300.81	1.23

Tabla 5. El análisis densitométrico de los amplificados de RT-PCR para IFN- γ revela que el aumento en la expresión del gen es del 19% en los animales suplementados durante 6 semanas. El área analizada fue de 109.47 mm².

7.2.2 Grupo 2

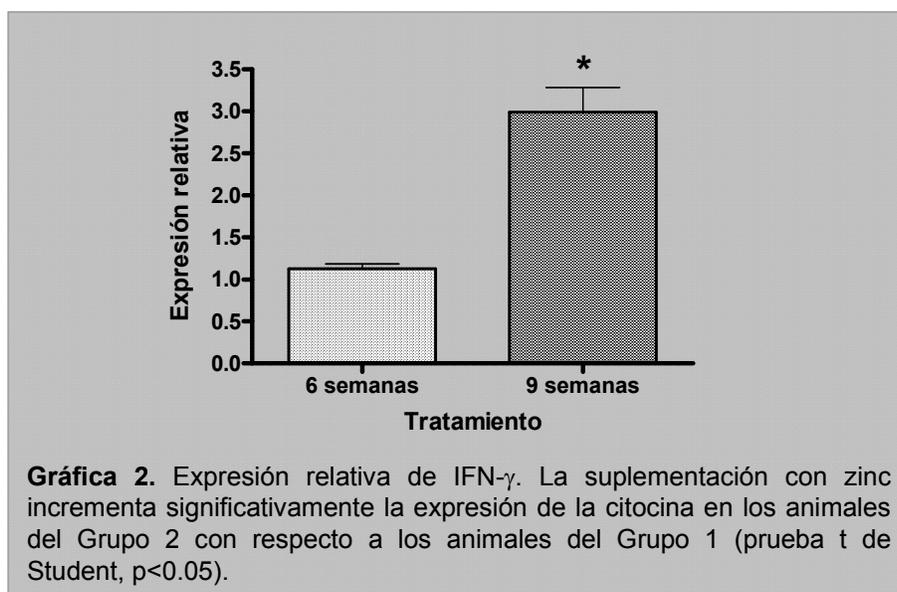
Posteriormente, se investigó el efecto del zinc en la expresión del IFN- γ en ratones del Grupo 2 (Zn500, 9 semanas de tratamiento). En el ensayo representativo de la Figura 6 se puede observar que la expresión del IFN- γ también es mayor en los animales suplementados que en el grupo testigo (Zn0).



Carril	Muestra	Densidad (int/mm ²)	Expresión relativa
2	Zn0 PMA+I	428.10	1.00
3	Zn500 PMA+I	1067.12	2.49

Tabla 6. Análisis densitométrico de los amplificados de RT-PCR para IFN- γ . Se muestran los valores densitométricos y los correspondientes a la expresión relativa del gen de IFN- γ . Se puede observar que en los animales suplementados esta expresión es notablemente mayor (60%) comparado con los animales testigo. El área analizada fue de 128.91 mm².

En la Gráfica 2 se puede apreciar el análisis global de la suplementación con zinc sobre la expresión genética del IFN- γ en esplenocitos murinos. El incremento de la expresión relativa de la citocina a las 9 semanas de tratamiento es significativamente mayor que a las 6 semanas (prueba t de Student, $p < 0.05$, \bar{X} de 3 experimentos representativos).

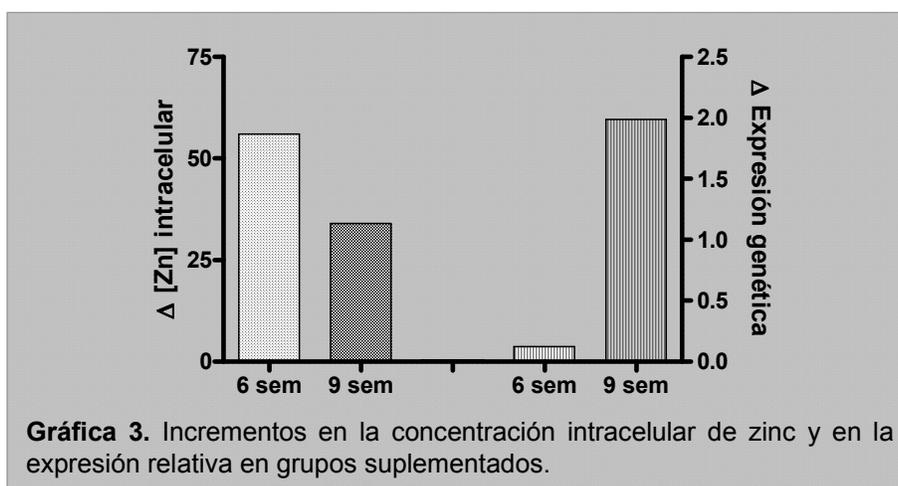


7.3 Concentración intracelular de zinc en esplenocitos

Se determinó la concentración intracelular de zinc en los linfocitos mediante Absorción Atómica utilizando 4 animales por cada grupo experimental. Como se muestra en la Tabla 7, los resultados promedio indican que la suplementación con este micronutriente produce un incremento en la concentración intracelular de zinc, tanto a las 6 como a las 9 semanas de tratamiento, comparando con los grupos testigo. Sin embargo, cabe resaltar que el aumento a las 6 semanas (Grupo 1) es más notorio que a las 9 semanas de tratamiento (Grupo 2) (Gráfica 3).

Periodo de tratamiento	Suplementación con zinc	Concentración intracelular promedio de zinc ($\mu\text{g}/10^9$ células)
6 semanas	Zn0	0.90
9 semanas	Zn0	0.91
6 semanas	Zn500	2.05
9 semanas	Zn500	1.38

Tabla 7. Concentración intracelular de zinc.



8. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios realizados respecto a los efectos del zinc han sido dirigidos a identificar las consecuencias de su deficiencia (Lukaski HC, 2005; Clegg MS *et al*, 2005; Fraker PJ and King LE, 2004; Ibs KH and Rink L, 2003; Rosado JL, 1998) puesto que es un problema prevalente en los países en desarrollo, incluyendo a nuestro país, debido principalmente a una dieta con niveles bajos de proteína animal y altos niveles de fibra y fitatos, afectando a la salud en general y particularmente al sistema inmune.

Los trabajos previos (Prasad AS, 2003; Shankar AH *et al*, 2000; Dardenne M, 2000) han demostrado que la deficiencia de zinc incrementa la susceptibilidad a una gran variedad de patógenos, reduce las respuestas humoral y celular, y afecta la capacidad del hospedero para controlar las infecciones. Diferentes grupos de investigadores, como el de Brooks WA, han visto que la suplementación con zinc es muy efectiva para reducir la susceptibilidad a infecciones respiratorias y mejorar los casos de diarrea, así como para disminuir la mortalidad ocasionada por estas enfermedades. El grupo de Castillo-Durán C y Weisstaub G han demostrado que favorece el crecimiento y reduce la morbilidad en niños con deficiencia de este metal, inclusive Hamadani JD y colaboradores tienen evidencia de que el zinc mejora el desarrollo mental.

El hecho de tener una alimentación adecuada es un factor esencial para el óptimo desarrollo del organismo. La falta de algún nutriente, como el zinc, puede ocasionar deficiencias en el sistema inmune y propiciar infecciones, especialmente en niños.

En este protocolo se demostró que la suplementación con zinc en ratones favoreció la expresión genética del IFN- γ . A través de una cinética de estimulación de esplenocitos con PMA+I se determinó que el tiempo mínimo al cual es posible detectar la expresión del gen es de 2 horas; sin embargo, la producción de mRNA específico para esta citocina perdura durante más tiempo, incluso hasta 20 horas después (Figura 2, Gráfica 1).

Cuando los ratones fueron suplementados con zinc durante 6 y 9 semanas, se mostró un aumento en la expresión del gen de IFN- γ comparándolos con aquellos que no recibieron el suplemento (Figuras 5 y 6), aunque este efecto fue mayor a las 9 semanas de tratamiento (60%, Tabla 6). Relacionando con trabajos previos de nuestro Laboratorio, también se ha demostrado que la cantidad de células productoras de IFN- γ en etapas perinatales aumentó gracias a la suplementación con zinc, utilizando la técnica de ELISpot (Aguilar AE *et al*, 2004).

Nuestros resultados sugieren que la expresión de la citocina depende de la concentración de zinc presente en la célula, puesto que la suplementación incrementó la concentración intracelular del elemento en los linfocitos en ambos grupos de tratamiento (56% y 34% en animales tratados durante 6 y 9 semanas respectivamente), sin embargo, creemos que existe un mecanismo regulador que permite llegar a una concentración intracelular de zinc óptima en donde la expresión genética del IFN- γ sea máxima, este proceso podría llevarse a cabo en cierto tiempo y explicar la expresión más notoria a las 9 semanas.

La producción del IFN- γ en linfocitos es un proceso que depende de la producción de otras moléculas, como la IL-1, el receptor sIL-2 o la IL-12 y por lo tanto de la presencia de otras células como los monocitos. A este respecto, estudios anteriores muestran que la suplementación con zinc en ratones aumenta la producción de IL-12 en macrófagos, observándose una mayor producción de la citocina a las 9 semanas de tratamiento (Lastra MD *et al*, 2004), lo que explicaría adecuadamente los resultados obtenidos en este estudio, ya que observamos que la expresión de IFN- γ , al igual que la IL-12, aumenta tanto a las 6 como a las 9 semanas de suplementación, teniendo un mayor efecto a las 9 semanas de tratamiento. Así mismo, en el Laboratorio se ha visto que el zinc induce una mayor expresión y producción de otra citocinas como la IL-1, TNF e IL-12 en ratones suplementados.

Wellington N y colaboradores han demostrado que el zinc es incapaz de inducir la producción de IFN- γ y otras citocinas en cultivos de linfocitos T libres de monocitos; lo que indica la importancia de la interacción celular en el establecimiento de una adecuada respuesta inmune, ya que los monocitos facilitan la activación de los linfocitos al menos a través de la secreción de IL-1.

En los animales suplementados con zinc posiblemente se lograron varios beneficios en su sistema inmune porque el IFN- γ es producido por distintas células, como las NK, linfocitos T $\gamma\delta$ y T CD8⁺, además de los linfocitos T activados. Algunos de los efectos más importantes del IFN- γ son la actividad antiviral directa, la polarización y activación de la respuesta de las células Th, la sobreexpresión de las moléculas MHC clase I y la inducción de la expresión de las moléculas MHC clase II mejorando la presentación antigénica, tanto en células inmunocompetentes como en células no inmunes, la regulación de la respuesta inmune humoral, la activación de las células fagocíticas mieloides y la modulación de la secreción de diversas citocinas como la IL-12 y el TNF- α . La expresión genética del IFN- γ es muy importante para la mayoría de estos efectos; sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar la manera en que se realizan estos mecanismos moleculares.

Con respecto a los efectos antivirales del IFN- γ , el grupo de Shrestha B y colaboradores han realizado estudios que demuestran que al tratar cultivos celulares con IFN- γ se reduce la carga viral como en infecciones por el virus del dengue, el virus de la encefalitis japonesa y el virus del Nilo Occidental. En un protocolo próximo será interesante evaluar los efectos del zinc con algún modelo de infección viral.

Con relación a la relevancia de nuestro trabajo, la nutrición deficiente durante la niñez puede traer graves consecuencias a futuro debido a que al nacer el sistema inmune no se encuentra en un estado de madurez (Cunningham-Rundles C *et al*, 2005). La importancia de la suplementación con zinc radica en que puede mejorar y prevenir una gran variedad de enfermedades, como infecciones respiratorias, otitis media, enfermedades diarreicas, cisticercosis, etc.; además de que es un tratamiento seguro, se puede tener una buena proporción costo-beneficio.

Actualmente, una manera de contrarrestar la deficiencia de zinc ha sido la fortificación de alimentos con vitaminas y minerales, principalmente en productos consumidos por niños, como cereales, alimentos para bebés, jugos, etc. Cabe resaltar que además es sumamente importante ingerir alimentos naturales ricos en zinc como las carnes rojas, pescados, tortillas, derivados lácteos, leguminosas (habas, lentejas, frijoles), arroz, etc. (López P *et al*, 1999).

Pero no hay que olvidar que se han realizado estudios de suplementación con zinc en niños obteniendo resultados diversos (Hamadani JD *et al*, 2002; Sur D *et al*, 2003; Black MM *et al*, 2004; Penny ME *et al*, 2004; Brooks WA *et al*, 2005); sin embargo, se cree que la variación en estos estudios, principalmente en niños menores de seis meses de edad, se deben a causas como el grado de madurez al nacer, el retardo en el crecimiento intrauterino, la leche materna como única fuente de alimentación y la morbilidad temprana (Osendarp SJ *et al*, 2002).

A pesar de los beneficios de la suplementación con zinc, se ha descrito que altas dosis de este elemento pueden ocasionar efectos adversos. Por ejemplo, en linfocitos cultivados *in vitro*, Wellinghausen N y colaboradores han observado que concentraciones mayores a 30 μM activan un mecanismo de inhibición directa del zinc sobre la cinasa asociada al receptor tipo 1 para IL-1 (IRAK, por sus siglas en inglés), lo que ocasiona la disminución en la proliferación de los linfocitos T.

También, en nuestro Laboratorio hemos observado que la prolongación en el tiempo de suplementación afecta de manera adversa la proliferación de linfocitos y la capacidad fagocítica de los macrófagos (Lastra MD *et al*, 2001) y creemos que la administración del metal durante periodos largos produce una acumulación en tejidos y la saturación de los mecanismos relacionados con la estimulación inducida por el zinc, lo que ocasiona consecuencias negativas en las funciones celulares, como la inhibición de la producción de citocinas, la desestabilización de la membrana celular, la interferencia en la señalización celular, etc.; manifestándose como una inhibición general de la respuesta inmune.

Mocchegiani y colaboradores indican que el zinc es muy importante en la fase G0/G1 del ciclo celular y que altas dosis del elemento (900 μM) ocasionan un arresto en el ciclo celular. Así mismo, Wellinghausen N y colaboradores, en 1997, demostraron que la proliferación de linfocitos disminuye de manera dependiente de la concentración de zinc en el medio. Por todo lo anterior queda demostrado que la administración del zinc debe ser cuidadosamente monitoreada para obtener efectos óptimos sobre la respuesta inmune, así como la necesidad de continuar los estudios con modelos *in vivo* e *in vitro*.

9. CONCLUSIONES

- La suplementación con zinc favorece la expresión del IFN- γ durante las etapas perinatales, observándose un mayor efecto a las 9 semanas de tratamiento que a las 6 semanas.
- La concentración intracelular de zinc en los linfocitos debida a la suplementación se correlaciona positivamente con la expresión del IFN- γ , aunque sabemos que existe un mecanismo regulador que impide tener niveles altos del metal durante periodos prolongados.
- En nuestro modelo experimental, el aumento moderado de las dosis y de la prolongación de los periodos de suplementación aparentemente no tienen repercusiones en etapas adultas.
- Hemos constatado que la prolongación excesiva de la administración del elemento puede tener efectos nocivos sobre la producción de algunas citocinas y también que las dosis deben ser monitoreadas cuidadosamente.
- Nuestros resultados sugieren que la suplementación con zinc durante 9 semanas favorece una mejor respuesta inmune debido al aumento en la expresión genética y a la producción del IFN- γ y de otras citocinas en el organismo.
- El aumento en la secreción de IFN- γ muestra el gran potencial que tienen los micronutrientes para modular el sistema inmune y así favorecer una respuesta Th1 en el combate contra los patógenos.
- El IFN- γ es un gran modulador del crecimiento celular y tiene efectos muy importantes en el sistema inmune, lo que lo hace un buen candidato en el tratamiento de enfermedades para las cuales no existe una terapia efectiva actualmente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abrams SA, Griffin IJ, and Davila PM. 2002. Calcium and zinc absorption from lactose-containing and lactose-free infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 442-446.
2. Aguilar AE, Lastra MD, Maturano A, Hernández R and Pastelin R. 2004. IFN gamma secreted by zinc induced murine spleen cells during mice perinatal stages. *Metal Ions Biol. Med.* 8: 85-88.
3. Alfaro ML and Zuckerman SH. 2005. Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm. Res.* 54: 395-411.
4. Bao B, Prasad AS, Beck FW, and Godmere M. 2003. Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: E1095-E1102.
5. Berenson LS, Ota N, and Murphy KM. 2004. Issues in T-helper 1 development--resolved and unresolved. *Immunol. Rev.* 202: 157-174.
6. Black MM, Sazawal S, Black RE, Khosla S, Kumar J, and Menon V. 2004. Cognitive and motor development among small-for-gestational-age infants: impact of zinc supplementation, birth weight, and caregiving practices. *Pediatrics* 113: 1297-1305.
7. Boccio J and Monteiro JB. 2004. Fortificación de alimentos con hierro y zinc: pros y contras desde un punto de vista alimenticio y nutricional. *Rev. Nutr., Campinas* 17(1): 71-78.
8. Bosscher D, Van Caillie-Bertrand M, Robberecht H, Van DK, Van CR, and Deelstra H. 2001. In vitro availability of calcium, iron, and zinc from first-age infant formulae and human milk. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32: 54-58.
9. Bosscher D, Lu Z, Janssens G, Van Caillie-Bertrand M, Robberecht H, De RH, De WR, and Deelstra H. 2001. In vitro availability of zinc from infant foods with increasing phytic acid contents. *Br. J. Nutr.* 86: 241-247.
10. Bosscher D, Van CR, Van der Auwera JC, Robberecht H, and Deelstra H. 2002. Calcium, iron and zinc availability from weaning meals. *Acta Paediatr.* 91: 761-768.
11. Brooks WA, Santosham M, Naheed A, Goswami D, Wahed MA, ener-West M, Faruque AS, and Black RE. 2005. Effect of weekly zinc supplements on incidence of pneumonia and diarrhoea in children younger than 2 years in an urban, low-income population in Bangladesh: randomised controlled trial. *Lancet* 366: 999-1004.

12. Castillo-Durán C and Weisstaub G. 2003. Zinc supplementation and growth of the fetus and low birth weight infant. *J. Nutr.* 133: 1494S-1497S.
13. Clegg MS, Hanna LA, Niles BJ, Momma TY, and Keen CL. 2005. Zinc deficiency-induced cell death. *IUBMB Life* 57: 661-669.
14. Cunningham-Rundles S, McNeeley DF, and Moon A. 2005. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115: 1119-1128.
15. Dardenne M. 2002. Zinc and immune function. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 Suppl 3: S20-S23.
16. Dawson M. 1991. Interferon- γ . In: *Lymphokines and Interleukins*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp. 191-209.
17. Donangelo CM, Zapata CL, Woodhouse LR, Shames DM, Mukherjea R, and King JC. 2005. Zinc absorption and kinetics during pregnancy and lactation in Brazilian women. *Am. J. Clin. Nutr.* 82: 118-124.
18. Dorea JG. 2000. Zinc in human milk. *Nutr. Res.* 20: 1645-1687.
19. Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S, Carson M, Nagabhushan TL, Trotta PP, and Bugg CE. 1991. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science* 252: 698-702.
20. Ersvaer E, Skavland J, Ulvestad E, Gjertsen BT, and Bruserud O. 2007. Effects of interferon gamma on native human acute myelogenous leukaemia cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 56: 13-24.
21. Failla ML. 2003. Trace elements and host defense: recent advances and continuing challenges. *J. Nutr.* 133: 1443S-1447S.
22. Fischer WC, Kordas K, Stoltzfus RJ, and Black RE. 2005. Interactive effects of iron and zinc on biochemical and functional outcomes in supplementation trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 82: 5-12.
23. Fitzgerald K *et al.* 2001. *The Cytokine Facts Book*. Second edition. Academic Press, San Diego, CA, pp 515.
24. Fragoso G, Lastra MD, Aguilar AE, Pastelin R, Rosas G, Meneses G, Sciutto E, and Lamoyi E. 2001. Effect of oral zinc supplementation upon *Taenia crassiceps* murine cysticercosis. *J. Parasitol.* 87: 1034-1039.
25. Fraker PJ and King LE. 2004. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* 24: 277-298.

26. Hamadani JD, Fuchs GJ, Osendarp SJ, Huda SN, and Grantham-McGregor SM. 2002. Zinc supplementation during pregnancy and effects on mental development and behaviour of infants: a follow-up study. *Lancet* 360: 290-294.
27. Ibs KH and Rink L. 2003. Zinc-altered immune function. *J. Nutr.* 133: 1452S-1456S.
28. Kidd P. 2003. Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its limitations, and implications for Health and Disease. *Altern. Med. Rev.* 8(3): 223-246.
29. King LE and Fraker PJ. 2002. Zinc deficiency in mice alters myelopoiesis and hematopoiesis. *J. Nutr.* 132: 3301-3307.
30. Krebs NF. 2000. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J. Nutr.* 130: 1374S-1377S.
31. Krebs NF, Hambidge KM, Westcott JE, Miller LV, Sian L, Bell M, and Grunwald G. 2003. Exchangeable zinc pool size in infants is related to key variables of zinc homeostasis. *J. Nutr.* 133: 1498S-1501S.
32. Ladipo OA. 2000. Nutrition in pregnancy: mineral and vitamin supplements. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 280S-290S.
33. Lastra MD, Pastelin R, Camacho A, Monroy B, and Aguilar AE. 2001. Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 15: 5-10.
34. Lastra MD, Aguilar AE, Cabañas MA, Hernández R, Humanes K, and Pastelin R. 2004. Interleukin-1 α , Tumor Necrosis Factor- α , and Interleukin-12 Secreted by Zinc-Induced Murine Macrophages in Vivo and in Vitro. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 17: 123-135.
35. Lastra MD, Saldivar L, Martínez K, Munguía N, Márquez C, and Aguilar AE. 2005. Zinc concentrations during mice gestation. *Biol. Trace Elem. Res.* 105: 205-214.
36. Lind T, Lönnerdal B, Persson LA, Stenlund H, Tennefors C, and Hernell O. 2003. Effects of weaning cereals with different phytate contents on hemoglobin, iron stores, and serum zinc: a randomized intervention in infants from 6 to 12 mo of age. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 168-175.
37. López P, Castañeda M, López G, Muñoz E, and Rosado JL. 1999. Contenido de hierro, zinc y cobre en los alimentos de mayor consumo en México. *Arch. Latinoam. Nutr.* 49: 287-294.
38. Lönnerdal B. 2000. Dietary factors influencing zinc absorption. *J. Nutr.* 130: 1378S-1383S.

39. Lukaski HC. 2005. Low dietary zinc decreases erythrocyte carbonic anhydrase activities and impairs cardiorespiratory function in men during exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 1045-1051.
40. Mocchegiani E, Giacconi R, Muzzioli M, and Cipriano C. 2000. Zinc, infections and immunosenescence. *Mech. Ageing Dev.* 121: 21-35.
41. Mosmann TR and Sad S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17: 138-146.
42. Osendarp SJ, Santosham M, Black RE, Wahed MA, van Raaij JM, and Fuchs GJ. 2002. Effect of zinc supplementation between 1 and 6 mo of life on growth and morbidity of Bangladeshi infants in urban slums. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 1401-1408.
43. Penny ME, Marin RM, Duran A, Peerson JM, Lanata CF, Lönnerdal B, Black RE, and Brown KH. 2004. Randomized controlled trial of the effect of daily supplementation with zinc or multiple micronutrients on the morbidity, growth, and micronutrient status of young Peruvian children. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 457-465.
44. Pestka S, Krause CD, and Walter MR. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202: 8-32.
45. Prasad AS. 2003. Zinc deficiency. *BMJ* 326: 409-410.
46. Prasad AS. 2004. Zinc deficiency: its characterization and treatment. *Met. Ions Biol. Syst.* 41: 103-137.
47. Raqib R, Hossain MB, Kelleher SL, Stephensen CB, and Lonnerdal B. 2007. Zinc supplementation of pregnant rats with adequate zinc nutrition suppresses immune functions in their offspring. *J. Nutr.* 137: 1037-1042.
48. Rink L and Kirchner H. 2000. Zinc-altered immune function and cytokine production. *J. Nutr.* 130: 1407S-1411S.
49. Rosado JL. 1998. Deficiencia de zinc y sus implicaciones funcionales. *Salud Pública Mex.* 40: 181-188.
50. Rosenzweig SD and Holland SM. 2005. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol. Rev.* 203: 38-47.
51. Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Cremaschi G, Goldman CG, Caro R, De PT, Hager A, Weill R, and Boccio J. 2000. Zinc status and immune system relationship: a review. *Biol. Trace Elem. Res.* 76: 193-205.

52. Samuel CE. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 778-809.
53. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, and Hume DA. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75: 163-189.
54. Shaaban SY, Aziz El-Hodhod MA, Nassar MF, Hegazy AE, El-Arab SE, and Shaheen FM. 2005. Zinc status of lactating Egyptian mothers and their infants: effect of maternal zinc supplementation. *Nutr. Res.* 25: 45-53.
55. Shankar AH, Genton B, Baisor M, Paino J, Tamja S, Adiguma T, Wu L, Rare L, Bannon D, Tielsch JM, West KP, Jr., and Alpers MP. 2000. The influence of zinc supplementation on morbidity due to *Plasmodium falciparum*: a randomized trial in preschool children in Papua New Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 663-669.
56. Shrestha B, Wang T, Samuel MA, Whitby K, Craft J, Fikrig E, and Diamond MS. 2006. Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection. *J. Virol.* 80: 5338-5348.
57. Subramanian P, Sivabalan S, Venugopal PM, and Vasudevan K. 2000. Influence of chronic zinc supplementation on biochemical variables and circadian rhythms in wistar rats. *Nutr. Res.* 20: 413-425.
58. Sur D, Gupta DN, Mondal SK, Ghosh S, Manna B, Rajendran K, and Bhattacharya SK. 2003. Impact of zinc supplementation on diarrheal morbidity and growth pattern of low birth weight infants in Kolkata, India: a randomized, double-blind, placebo-controlled, community-based study. *Pediatrics* 112: 1327-1332.
59. Takagi H, Nagamine T, Abe T, Takayama H, Sato K, Otsuka T, Kakizaki S, Hashimoto Y, Matsumoto T, Kojima A, Takezawa J, Suzuki K, Sato S, and Mori M. 2001. Zinc supplementation enhances the response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* 8: 367-371.
60. Takaoka A and Yanai H. 2006. Interferon signalling network in innate defence. *Cell. Microbiol.* 8: 907-922.
61. Tamura T, Goldenberg RL, Johnston KE, and DuBard M. 2000. Maternal plasma zinc concentrations and pregnancy outcome. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 109-113.
62. Villalpando S, García-Guerra A, Ramírez-Silva CI, Mejía-Rodríguez F, Matute G, Shamah-Levy T, and Rivera JA. 2003. Iron, zinc and iodide status in Mexican children under 12 years and women 12-49 years of age. A probabilistic national survey. *Salud Pública Mex.* 45 Suppl 4: S520-S529.
63. Wellinghausen N, Fischer A, Kirchner H, and Rink L. 1996. Interaction of zinc ions with human peripheral blood mononuclear cells. *Cell. Immunol.* 171: 255-261.

64. Wellinghausen N, Martin M, and Rink L. 1997. Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *Eur. J. Immunol.* 27: 2529-2535.
65. Young HA and Hardy KJ. 1995. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J. Leukoc. Biol.* 58: 373-381.

ANEXO I

Preparación de soluciones

Amortiguador para electroforesis

Para preparar 1 L de solución amortiguadora para electroforesis es necesario pesar los siguientes reactivos:

Tris base	10.8 g
Ácido bórico	5.5 g
EDTA disódico	0.744 g

En aproximadamente 800 mL de agua desionizada estéril se disuelve cada reactivo, uno por uno, en un ambiente bajo en nucleasas. Al final, se afora a 1L con agua desionizada estéril y la solución se transfiere a un frasco ámbar estéril. Almacenar a TA. Podrá utilizarla 5 veces.

Amortiguador TE para cebadores

Se crea un ambiente bajo en nucleasas y se disuelven las siguientes cantidades de reactivos en 40 mL de agua desionizada estéril:

Tris-HCl	39.4 mg
EDTA disódico	1.8 mg

Se lleva a 50 mL con agua desionizada estéril y se esteriliza por filtración (filtro 0.22 μ m). Almacenar a TA. La concentración final para el Tris-HCl es 5 mM y para el EDTA disódico es 0.1 mM.

ANEXO II

Reconstitución de estimulantes

Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA)

En un ambiente libre de nucleasas, el vial con el liofilizado (1 mg, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany, No.Cat. P1585) se reconstituye en 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO). La concentración es de 1 mg/mL. A partir de este stock se realizan alícuotas de 50 μ L en tubos estériles para microcentrífuga, los cuales se almacenan a -70 °C. Se toma una alícuota y a partir de ella se hacen 4 alícuotas más de 10 μ L cada una, las cuales se almacenan a -20 °C. Para preparar la solución de trabajo, se toman 2 μ L y se transfieren a otro tubo estéril de microcentrífuga que contenga 198 μ L de medio RPMI suplementado (dilución 1:100). La concentración final es de 10 μ g/mL.

Nota: Se utilizan 20 μ L de la solución de trabajo de PMA 10 μ g/mL (5 μ L PMA / 10^6 células) lo que equivale a 50 ng de PMA por cada 10^6 células. Cada alícuota debe tener ciclos de congelación-descongelación de máximo 5 veces.

Ionomicina de calcio

En un ambiente libre de nucleasas, el vial con el liofilizado (1 mg, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany, No.Cat. I0634) se reconstituye en 1 mL de alcohol etílico absoluto. La concentración es de 1 mg/mL. A partir de este stock se realizan alícuotas de 50 μ L en tubos estériles para microcentrífuga, los cuales se almacenan a -20 °C. Para preparar la solución de trabajo, se toman 2 μ L y se transfieren a otro tubo estéril de microcentrífuga que contenga 18 μ L de medio RPMI suplementado (dilución 1:10). La concentración final es de 100 μ g/mL.

Nota: Se utilizan 20 mL de la solución de trabajo de Ionomicina 100 μ g/mL (5 mL Ionomicina / 10^6 células), que equivalen a 0.5 μ g de Ionomicina por cada 10^6 células. Cada alícuota puede tener un ciclo de congelación- descongelación de máximo 5 veces.

ANEXO III

Reconstitución de cebadores

Cebadores para β -actina

En un ambiente libre de nucleasas, el vial con el liofilizado (200 nmol, BIO-SYNTHESIS No.Cat. I266-1, H673-1) se reconstituye en 200 μ L de amortiguador TE (ver Anexo I) para tener un stock con concentración de 1M. Para tener el vial de trabajo, se transfieren 2.5 μ L a un tubo estéril de microcentrífuga y se llevan a 100 μ L con agua para biología molecular. La concentración final es de 25 mM. Almacenar a -20 °C. Para cada reacción de PCR se utilizarán 2 μ L.

Cebadores para IFN- γ

En un ambiente libre de nucleasas, el vial con el liofilizado (2.5 nmol, BioSource International Inc, USA, No.Cat. GMC4022) se reconstituye en 100 μ L de amortiguador TE (ver Anexo I). La concentración final es de 25 mM. Almacenar a -20 °C. Para cada reacción de PCR se utilizarán 2 μ L.