



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ZINC EN
LA PRODUCCIÓN DE IL-17**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
MÓNICA TODD CURIE SÁNCHEZ TAPIA**



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



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: **Profesor: SILVIA BELLO GARCÉS**

VOCAL: **Profesor: ABEL GUTIÉRREZ RAMOS**

SECRETARIO: **Profesor: ANA ESTHER AGUILAR CÁRDENAS**

1er. SUPLENTE: **Profesor: MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO**

2° SUPLENTE: **Profesor: LILIANA ROCÍO GONZÁLEZ OSNAYA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, LABORATORIO 1-D (ANEXO).

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOLOGÍA

ASESOR DEL TEMA: DRA. ANA ESTHER AGUILAR CÁRDENAS

SUSTENTANTE: SÁNCHEZ TAPIA MÓNICA TODD CURIE

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	GENERALIDADES.....	2
2.1	El zinc.....	2
2.1.1	Importancia del zinc en la nutrición.....	3
2.1.2	Deficiencia y suplementación con zinc.....	4
2.1.3	El zinc y el sistema inmune.....	5
2.2	Interleucina 17 (IL-17).....	6
2.2.1	Estructura.....	7
2.2.2	Efectos de la IL-17.....	8
2.2.3	Receptor para IL-17.....	9
2.2.4	Vía de señalización de la IL-17.....	10
2.3	Linfocitos T cooperadores (T _H).....	11
2.3.1	Linfocitos T _H 17.....	13
3.	JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	15
4.	OBJETIVOS.....	16
4.1	General.....	16
4.2	Específico.....	16

5.	METODOLOGÍA	17
5.1	Animales de experimentación	17
5.1.1	Suplementación con Zinc	17
5.1.2	Grupos experimentales	17
5.2	Detección de IL-17 mediante EIA de doble anticuerpo	18
5.2.1	Efecto de la suplementación con zinc en la producción de IL-17.	21
6.	RESULTADOS.....	23
6.1	Estandarización del método y curva estándar	24
6.2	Cuantificación de la IL-17 en grupos de tratamiento	26
7.	DISCUSIÓN.....	29
8.	CONCLUSIONES	38
9.	BIBLIOGRAFÍA	39
	Anexo I Esquema de Microplaca de ELISA	44
	Anexo II Reconstitución de reactivos	45
	Anexo III Abreviaturas.....	49

1. INTRODUCCIÓN

El aporte subóptimo de micronutrientes puede dañar la respuesta inmunológica. En el caso particular del zinc hemos demostrado su participación en diversos procesos inmunológicos alrededor de las etapas perinatales. En los ancianos, el consumo de cantidades menores de alimento puede causar un balance negativo en la concentración del zinc y posibles efectos en su inmunidad. A este respecto, en esta etapa es interesante conocer el impacto que el zinc pueda ejercer sobre citocinas proinflamatorias como la IL-17 por su papel efector en la hipersensibilidad tardía y su posible participación en la inducción de autoinmunidad, ya que en etapas tempranas de la vida ocurre el proceso de maduración de timocitos hacia linfocitos T, durante dicho proceso se deben presentar antígenos propios para poder mostrar tolerancia hacia los mismos, sin embargo, una sobreestimulación del sistema inmunológico podría generar la creación de clonas autoinmunes generando un problema importante de salud.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos de la suplementación con zinc sobre la producción de IL-17 en las etapas perinatales, para ello se usó un modelo experimental de ratones BALB/c AnN y se evaluó la concentración de la citocina en suero mediante un ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo.

Finalmente se llegó a la conclusión de que la suplementación con zinc tiene como efecto principal la disminución de la producción de IL-17 por las células T_H17, lo que lejos de inducir un problema de autoinmunidad disminuye las posibilidades de presentar un trastorno de esa naturaleza, lo cual representa una respuesta positiva para los individuos suplementados.

2. GENERALIDADES

2.1 El zinc

La nutrición es la base de los procesos fisiológicos humanos. Una nutrición inadecuada puede inducir a la disfunción en eslabones de la cadena metabólica. Todos los nutrientes esenciales son imprescindibles y el déficit o exceso de cualquiera de ellos conlleva a efectos adversos en la salud. El zinc es un micronutriente extensamente demandado en el organismo, como lo demuestra la amplia diversidad de funciones biológicas que muestra (Florea DI, *et al*, 2012)

El Zn es uno de los elementos traza esenciales de mayor importancia, ya que está ampliamente distribuido en los alimentos y en el cuerpo humano. Este elemento forma parte estructural de alrededor de 120 enzimas y además es cofactor de más de 300 enzimas. (Salgueiro MJ, *et al*. 2000). Un desbalance en la concentración de este micronutriente en el cuerpo humano, puede tener diversos efectos relevantes en el funcionamiento de los sistemas nervioso, reproductor e inmunológico, causando un grave impacto en la salud (Lothar R, 2000).

El zinc es un elemento traza fundamental para la proliferación y diferenciación celular. Como se mencionó, es un constituyente estructural de muchas enzimas y proteínas, incluyendo enzimas metabólicas, factores de transcripción y proteínas que juegan un papel fundamental en la señalización celular. Además este micronutriente, tiene una gran importancia en la protección de las diversas estructuras biológicas, ya que impide la formación de radicales libres, además la presencia del zinc en la membrana plasmática contribuye a la preservación de su integridad así como para la estabilidad de la misma (Stefanidou M., 2006).

2.1.1 Importancia del zinc en la nutrición

La importancia de la alimentación y los micronutrientes en la salud es indiscutible, el zinc es un elemento esencial cuya relevancia para la salud es cada vez más mayor, ya que su deficiencia puede jugar un papel importante en la aparición de ciertas enfermedades. Como se mencionó, el zinc es uno de los elementos traza más importantes en el organismo, y desempeña tres papeles biológicos fundamentales: como cofactor enzimático, estructural y como ion regulador (Chasapis CT. *et al*, 2012).

A este respecto, las consecuencias provocadas por una enfermedad de carácter contagioso no dependen solamente de la naturaleza y la duración de la infección, también dependen en gran medida del estado nutricional del individuo, así como de su alimentación durante el curso de la enfermedad (Shengying B. *et al*, 2010).

El zinc tiene un papel importante en el sistema inmunológico y se ha demostrado que en las personas con deficiencia de este elemento existe un aumento de susceptibilidad a diversos agentes patógenos, además de que el periodo de recuperación es más prolongado (Peroni DG, *et al*, 2012).

El Zn es crucial para un desarrollo y funcionamiento adecuado de las células mediadoras de la inmunidad innata, los neutrófilos y las células NK. Este elemento también tiene un impacto considerable para la fagocitosis mediada por macrófagos,

así como en la producción de diversas citocinas. Una deficiencia en este elemento traza afecta la proliferación, diferenciación y maduración tanto de células T como B (Prasad AS, 2008).

El zinc desempeña un papel importante en el sistema inmune, ya que entre otros efectos, es de vital importancia para un adecuado funcionamiento del timo, existen hormonas tímicas dependientes de zinc, como la llamada timulina que es requerida para la maduración y diferenciación de los linfocitos T (Stefanidou M, 2006).

La regulación de la absorción por los transportadores de zinc en el enterocito, así como la cinética de saturación en el proceso de absorción son los principales medios por los cuales se mantiene la homeostasis del zinc en todo el cuerpo. Sin embargo, existen varios factores fisiológicos que afectan el equilibrio de dicho micronutriente como son la cantidad de zinc que se ingiere y la cantidad absorbida además de la eficiencia de absorción. Otros factores de impacto en este balance son la edad y el tiempo durante el que el zinc se ingiere (Hambidge KM *et al*, 2010)

2.1.2 Deficiencia y suplementación con zinc

Otros estudios han demostrado un efecto positivo de la suplementación con zinc en el tratamiento de la diarrea infantil, la acrodermatitis enteropática, así como para enfermedades relacionadas a estrés oxidativo. Debido al papel del zinc como antioxidante y estabilizador de membrana, se ha empleado la suplementación con este micronutriente de manera importante en la prevención del proceso inflamatorio mediado por radicales libres (Prasad AS, 2008).

Otros estudios han mostrado los beneficios de la suplementación con zinc en padecimientos infecciosos en humanos, principalmente en niños que presentaban cuadros crónicos de diarrea o enfermedades del tracto respiratorio. También se ha demostrado que en pacientes anémicos, la suplementación con este elemento provoca un decremento en la incidencia de infecciones respiratorias por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, así como padecimientos en el tracto genitourinario, provocadas por *E. coli*. (Morgan, *et al*, 2011). Sin embargo algunos estudios *in vitro* parecen indicar que el consumo excesivo de zinc, en ciertas condiciones, puede causar efectos tóxicos mediados por daño a la función mitocondrial (Eve AR, 2011).

La deficiencia de zinc en los pacientes se ha traducido como varias disfunciones en el organismo, principalmente en el sistema inmunológico también se ha documentado una disminución en los niveles séricos de testosterona y una importante afectación al sistema inmune, principalmente en lo que respecta a las células T helper, también se han reportado diversos trastornos neurosensoriales así como casos de hiperamonemia (Martin AC, 2011).

2.1.3 El zinc y el sistema inmune

El zinc tiene diversos efectos en el sistema inmunológico, actúa sobre la maduración de los linfocitos T CD4+ y T CD8+, además las concentraciones en suero de este elemento se modifican en padecimientos autoinmunes y en el caso de deficiencia causa un desequilibrio en las funciones de las poblaciones celulares T_{H1} y T_{H2} en la periferia debido a que la producción de IFN- γ e IL-2 se ve reducida y la producción de citocinas por células T_{H2} como IL-4, IL-6 e IL-10, no se ve afectada. (Kitabayashi C, *et al*, 2010)

2.2 Interleucina 17 (IL-17)

Las interleucinas son proteínas solubles de bajo peso molecular que ejecutan múltiples funciones vinculadas al crecimiento celular, inmunidad, diferenciación tisular, inflamación, entre otras. Son producidas por células del sistema inmune, así como por diferentes tipos celulares durante la activación de la inmunidad innata y adaptativa. Las interleucinas son un conjunto de proteínas que actúan como mensajeros químicos, siendo el principal medio de comunicación intracelular ante una invasión microbiana. Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmunitaria específica. Su principal función es regular los eventos que pertenecen a las funciones de las diferentes poblaciones de células del sistema inmune, como la activación, diferenciación o proliferación de diferentes tipos celulares, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis y la regulación de otras citocinas y factores (Kuby, 2007).

La IL-17A y la familia IL-17 fueron originalmente descritas y clonadas por Rouvier *et al* (1993) y nombrada CTLA8 y subsecuentemente se denominó IL-17, y más recientemente, IL-17A. (Kolls JK, 2004). La IL-17 fue reconocida inicialmente debido a su alta homología con una secuencia que pertenece al ORF-13 del virus del herpes. (Kawaguchi *et al*, 2004). El gen responsable para la codificación de la citocina IL-17A es el 6p12 (Kolls JK, 2004).

La familia de citocinas IL-17, tiene diferentes miembros, siendo tres los de mayor trascendencia en la regulación de la respuesta inmunitaria, se trata de IL-17A, IL-17E y IL-17F, las cuales ya han sido caracterizadas tanto *in vitro* como *in vivo* y se ha mostrado su naturaleza proinflamatoria, dicha naturaleza se denota en su participación en el reclutamiento de neutrófilos así como su capacidad de inducir la producción de citocinas por células T_H2 y eosinófilos (Kawaguchi *et al*, 2004).

La familia de la interleucina 17 incluye siete proteínas con una estructura similar entre sí, siendo característicos cuatro residuos de cisteína altamente conservados en su estructura tridimensional. Cabe mencionar, que estas proteínas filogenéticamente son altamente conservadas en los mamíferos. Entre los humanos y los ratones se ha encontrado que se tiene un porcentaje de 62-88% de homología, dependiendo del tipo de IL-17 (Kolls JK, 2004).

2.2.1 Estructura

La IL-17A es una proteína homodimérica constituida por 155 aminoácidos. Cada subunidad del homodímero tiene un peso de 15-20kDa. (Kolls JK, 2004). La estructura de la IL-17 se compone de un péptido señal de una longitud de 23 aminoácidos, seguido por una característica región de la familia de IL-17 de 123 aminoácidos (Aggarwal S, 2002).

Como se mencionó posee cuatro residuos de cisteínas conservadas que forman dos puentes disulfuro, sin embargo esta molécula no muestra semejanza en sus dominios estructurales con otras interleucinas (Nasr YA *et al*, 2010).

Cabe mencionar que la estructura cristalina de la IL-17F comparte un 50% de homología con la IL-17A y es estructuralmente similar a la familia de las neurotrofinas. El puente de cisteína se caracteriza por dos conjuntos de β -plegadas estabilizadas por tres interacciones disulfuro. Sin embargo, la IL-17F carece del tercer enlace disulfuro. En su lugar, una serina sustituye a la cisteína en esta posición. Esta característica única se conserva en los miembros de la familia de la IL-17. La IL-17F

también dimeriza en una forma similar a la del factor de crecimiento nervioso (NGF) y otros neurotrofinas (Kawaguchi *et al*, 2004).

2.2.2 Efectos de la IL-17

Los estudios realizados sobre la IL-17 han demostrado que el sistema IL-17/IL-17RA es esencial para la defensa del hospedero en diversas infecciones bacterianas extracelulares, así como fúngicas, en este último caso la activación de las células T_H 17 se da por polisacáridos constituyentes de la pared celular de los hongos. Además, la producción de IL-17 parece ser necesaria para la formación de abscesos (Louten *et al*, 2009).

Otro punto importante es que en ausencia de la señalización de la IL-17, la afluencia y la activación de los neutrófilos en los órganos infectados sufre de un grave retraso, lo que implica que no se pueda controlar de manera adecuada la infección (Korn, 2007).

Sin embargo, la sobreproducción de esta citocina puede desencadenar trastornos autoinmunes como la artritis reumatoide, la encefalomiелitis autoinmune. La esclerosis múltiple y la psoriasis (Nasr YA *et al*, 2010).

2.2.3 Receptor para IL-17

Los receptores para la IL-17A, denominados IL-17R, son una familia de proteínas transmembranales de aproximadamente 130 KDa distribuida en gran cantidad de tejidos (Vélez VM, 2007)

La familia de IL-17R comprende cinco subunidades del receptor de IL-17RA/IL-17RE. A pesar de que la secuencia diverge de manera considerable, muchos de los genes que codifican para la familia de IL-17R están relacionados con clusters en el cromosoma humano 3 (para IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE) y el cromosoma 6 del ratón (IL-17RA, IL-17RC e IL-17RE) y el 14 (IL-17RB e IL-17RD) (Gaffen SL, 2009).

Todos son receptores transmembranales con dominios, que varían en tamaño desde 499 hasta 866 aminoácidos. Las subunidades del receptor contienen ciertos sitios conservados estructuralmente, incluyendo un dominio de fibronectina III con dominio extracelular y un “SEFIR” con dominio intracelular. (Gaffen SL, 2009).

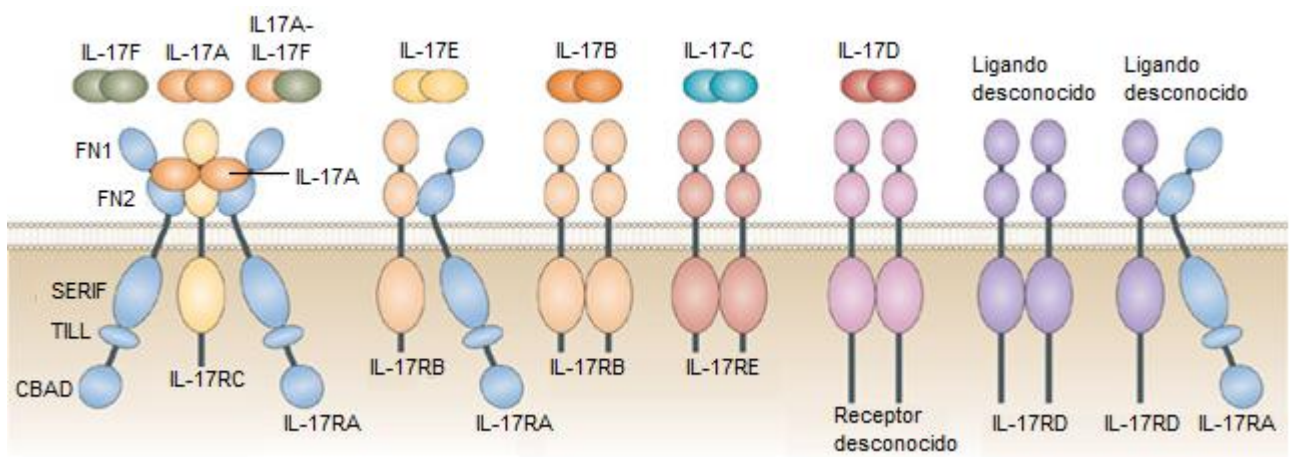


Fig 1. Receptores para IL-17. Tomado de Gaffen Sarah L. Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily. *Nat Rev Immun.* 2009. Vol 9. Issue 8

2.2.4 Vía de señalización de la IL-17

Debido a que el receptor IL-17RA carece de homología con otros receptores conocidos, no fue posible dilucidar la transducción de señal por simple comparación. Sin embargo, varios estudios mostraron que la IL-17A activa la expresión génica proinflamatoria, como lo hacen receptores de respuesta inmune innata. Dicha citocina activa el factor nuclear κ B (NF- κ B) el cual es un factor de transcripción asociado con la inflamación (Yao Z, *et al*, 1995).

Se ha demostrado que la IL-17A activa a p50 y p65, los cuales son componentes de la vía clásica de NF- κ B. Además la citocina también induce la expresión de I κ B ζ , que es un regulador positivo de la transcripción en las vías mediadas por los TLR y el IL-1R (Gaffen SL, 2009).

Un elemento clave en la señalización del IL-17R surgió de un análisis de la bioinformática donde se identificó un “motif” conservado en los dominios citoplásmicos de los miembros de la familia IL-17R, el cual presentaba homología con el dominio Toll / IL-1R (TIR), los cuales a su vez proporcionan sitios intracelulares de anclaje esenciales y específicos, tales como adaptadores MyD88. Este estudio, mostró que la región SEFIR puede activar la cascada de señalización de NF- κ B (Kyoung *et al*, 2004).

Otro caso típico inducido por mediadores pro-inflamatorios es la activación de MAPK, lo que conduce a la activación de la transcripción de factores AP1. La IL-17A tiene sitios de unión en promotores de AP1 así como en diferentes MAPKs y ERK, lo que tiene un papel importante en la vía de señalización de la IL-17, así como en el control de la estabilidad del mRNA resultante de la transcripción, dicha estabilización

es realizada por MAPK que inhibe a proteínas desestabilizadoras como TTP, la cual se une a sitios ricos en uracilo y adenina (Gaffen SL, 2009).

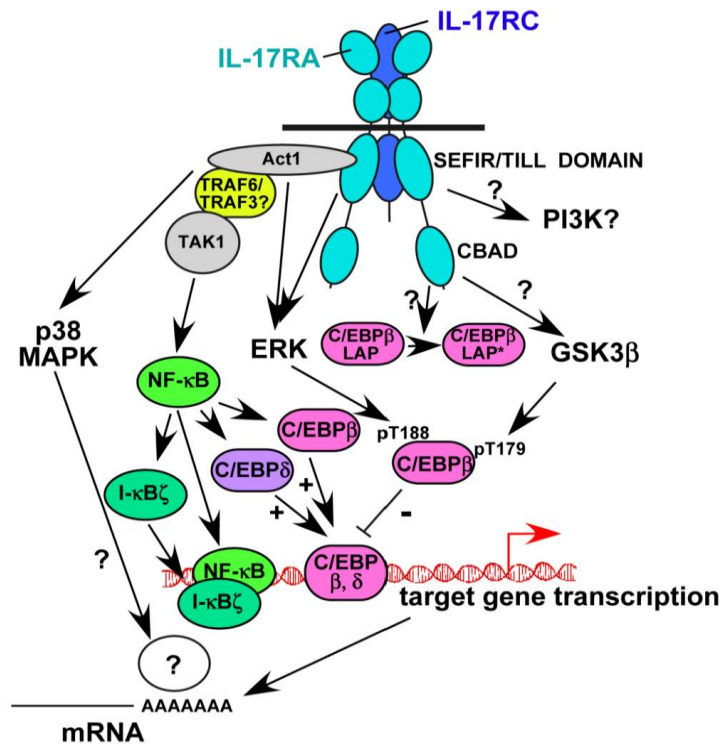


Fig 2. Señalización de IL-17

2.3 Linfocitos T cooperadores (T_H)

Las funciones de los linfocitos T y linfocitos de B, son fundamentales para la existencia y eficacia de la respuesta inmune adaptativa. En lo que respecta al papel de las células de B en la respuesta inmune, este es determinado por las funciones efectoras de la subclase de inmunoglobulina producida, mientras que las funciones de las células de T_H son determinada por la habilidad de producir combinaciones específicas de citocinas que cooperan para montar una reacción apropiada y así actuar frente a agentes patógenos o una lesión (Louten *et al*, 2009).

Durante la década de los 80 se profundizó en el conocimiento de la funcionalidad de los linfocitos T y se identificaron dos tipos de respuestas colaboradoras: la T_H1 (inmunidad celular) y la T_H2 (inmunidad humoral). Las células T_H1 son altamente efectivas en la eliminación de patógenos intracelulares mientras que las denominadas T_H2 son de gran importancia en la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos (Serrano, 2009).

Esta división en 2 subtipos se basó en el panel de citocinas que estos eran capaces de secretar una vez activados y con las que modulaban a diversos tipos celulares (Louten *et al*, 2009). Se denominó T_H1 a los linfocitos secretores de IFN- γ e IL-2 y se denominó T_H2 a los linfocitos que liberan IL-4 e IL-13 (Serrano, 2009).

En la siguiente tabla se muestra la clasificación de las células T cooperadoras y las citocinas relacionadas con las mismas:

TABLA 1. Células T cooperadoras.			
Tipo celular	Agente estimulador	Factor de diferenciación	Citocinas secretadas
T _H 1	Bacterias intracelulares y virus	IL-12	IL-2, IFN- γ
T _H 2	Helmintos	IL-4	IL.4, IL-5, IL-13
T _H 17	Bacterias extracelulares y hongos	TGF- β , IL-6	IL-17, IL-6

2.3.1 Linfocitos T_H17

El descubrimiento de un nuevo tipo celular cooperador surgió tras el tratamiento de células con péptidos microbianos en presencia de *Borrelia burgdorferi*, observándose la producción de IL-17; citocina no elaborada por células T_H1 ni T_H2, lo que implicaba la existencia de un nuevo subgrupo de linfocitos T (CD4+) que secretan IL-17 y que coordinan la respuesta inmune de un modo diferente a las TH1 o a las TH2. A estas células se les denominó T_H17 y son el tercer tipo de células colaboradoras que desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos. Asimismo, se ha descrito para ellas un efecto proinflamatorio que les permite conectar la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Serrano, 2009).

Diversos estudios han definido los factores importantes esenciales para establecer un linaje de células T_H17, dichos factores son muy similares entre humanos y ratones. En cuanto a la diferenciación juegan un papel fundamental, el TGF-β, la IL-6 y la IL-21 (Veldhoen, 2006). Respecto a la estabilización se ha descrito la importancia de la IL-23 y finalmente a nivel transcripcional son fundamentales STAT3 y el ácido retinoico relacionado con los receptores nucleares ROR-γ y ROR-α (Nasr YA *et al*, 2010).

La diferenciación de las células T vírgenes hacia T_H17 se favorece por la combinación de la IL-6 y el TGF-β1, donde la IL-6 producida en la fase aguda de un proceso inflamatorio inhibe la generación de las células reguladoras inducida por TGF-β1, lo cual permite el desarrollo de las células T_H17, pues esta última citocina inhibe la producción de IFN-γ junto con la generación de células efectoras T_H1 y favorece la expresión del receptor para Interleucina-23 (IL-23) (Mangan PR, 2006).

La respuesta a IL-23 es importante porque esta molécula heterodimérica, perteneciente a la familia de las citocinas IL-12 y que comparte con IL-12 la subunidad p40 y el receptor IL-12Rβ1, es necesaria *in vivo* para el desarrollo de enfermedades

mediadas por células T_H17 , a pesar de no llevar a la diferenciación de *novο* de células T CD4+ vírgenes. Estas evidencias sugieren que la respuesta a IL-23 inducida por IL-6 y TGF- β 1 sobre las T_H17 sirve como un factor que favorece la supervivencia de esta línea celular. (Batten M, 2006).

Diversos investigadores han presentado evidencia de que la diferenciación de las células T_H17 , como la de las células T_H1 y T_H2 , requiere la presencia de la coestimulación de CD28 e ICOS luego del estímulo inicial por el reconocimiento que el complejo TCR (TCR, CD3, cadenas ζ) hace del péptido antigénico asociado al MHC, lo cual es un paso primordial en la diferenciación y activación de las células T CD4+ vírgenes (Park H, 2005).

No se han identificado totalmente los factores de transcripción requeridos para la diferenciación de las células de tipo T_H17 . Sin embargo algunos investigadores han sugerido que el receptor nuclear ROR- γ t es el factor transcripcional clave en la diferenciación del linaje T_H17 (Ivanov II *et al*, 2006).

Se ha evidenciado que la producción de IL-17A no se limita sólo a las células T CD4+, sino que involucra a otros tipos de células T entre las que se encuentran las T CD8+, las $T\gamma\delta$ y otras células $T\alpha\beta$ no convencionales como las células NKT, lo cual hace aún más complejo su papel en el escenario inmunológico (Stark M, 2005).

Cabe mencionar que hiperfunción de las células T_H17 está asociada a procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes, promovidos fundamentalmente, por el efecto proinflamatorio de la IL-17, por lo que se ha implicado a la IL-17 de modo directo en el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes (Korn, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Como se mencionó en el capítulo 1, la nutrición es la base de los procesos fisiológicos humanos. Una nutrición inadecuada puede inducir a la disfunción en eslabones de la cadena metabólica. Todos los nutrientes esenciales son imprescindibles y el déficit o exceso de cualquiera de ellos conlleva a efectos adversos en la salud. El zinc es un micronutriente extensamente demandado en el organismo, como lo demuestra la amplia diversidad de funciones biológicas que presenta, siendo de vital importancia para un adecuado funcionamiento del sistema inmunológico.

Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmunitaria específica. Su principal función es regular los eventos que pertenecen a las funciones de las diferentes poblaciones de células del sistema inmune, como la activación, diferenciación o proliferación de diferentes tipos celulares, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis y la regulación de otras citocinas y factores. En el caso particular de la IL-17 se ha demostrado que el sistema IL-17/IL-17RA es esencial para la defensa del hospedero en diversas infecciones bacterianas extracelulares, así como fúngicas. Sin embargo, la sobreproducción de esta citocina puede desencadenar trastornos autoinmunes como la artritis reumatoide, la encefalomiелitis autoinmune, la esclerosis múltiple y la psoriasis.

Por lo anteriormente expuesto es necesario realizar estudios que nos muestren el efecto de la suplementación de un micronutriente como el zinc, en la producción de IL-17, ya que de sobreactivar al sistema inmunológico y provocar una sobreproducción de esta citocina, lejos de mejorar la calidad de vida y ayudar

a mantener un buen funcionamiento del sistema inmunológico podría provocar una afectación a la salud muy grave.

HIPÓTESIS

Los grupos de ratones suplementados con zinc, en comparación con los grupos testigo, presentarán una disminución de la concentración de IL-17 en suero, la cual es producida por los linfocitos Th17; lo que implica que son menos susceptibles a presentar un padecimiento de tipo autoinmune

4. OBJETIVOS

4.1 General

- Determinar los efectos de la suplementación con zinc sobre la producción de IL-17 en las etapas perinatales de ratones BALB/c.

4.2 Específico

- Evaluar los efectos de la suplementación con zinc sobre la producción de IL-17 por linfocitos T_H 17, midiendo la concentración en suero

5. METODOLOGÍA

5.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c AnN, machos y hembras del bioterio del Laboratorio de Investigación en Inmunología. Dichos animales se mantuvieron en cajas de plástico con cubiertas de acero inoxidable y fondo de aserrín estéril. Para la ingesta de agua se usaron botellas de vidrio con tapones de polietileno y tubos bebederos de vidrio. Los animales se alimentaron *ad libitum* con alimento comercial 2018S HarlanTeklad Global Diets (Madison, Wisconsin, USA)

5.1.1 Suplementación con Zinc

Para poder estudiar el efecto de la suplementación con zinc en la producción de IL-17, se suministró acetato de zinc a los animales (Mallinckrodt-Baker, México, Cat. 8740) en el agua de beber, en una concentración de 500 µg/mL, dicho suministro se realizó desde el día de la cruce de los progenitores, hasta la generación F1 (Tabla 2)

5.1.2 Grupos experimentales

Los animales F1 se dividen en grupos de acuerdo con la suplementación recibida y la edad, Zn 0, Zn500 y 21, 42 días de edad, respectivamente

Los animales del grupo 1 (n=15) son crías que reciben 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 21 días de edad). En el grupo 2 (n=15) son las crías que recibieron la dosis de zinc durante los periodos de gestación, lactancia y post-lactancia, 9 semanas de tratamiento (ratones de 42 días de edad). Los grupos testigo, de edades correspondientes (21 y 42 días, n=15 cada uno) se mantuvieron en las mismas condiciones pero sin recibir zinc. Se realizaron 3 experimentos en las condiciones y n indicados.

Tabla 2. Grupos de tratamiento con zinc			
Grupo	Periodo de tratamiento con zinc (mg/L)		
	Gestación F ₀ ---F ₁	Lactancia F ₁	Destete F ₁
	3 semanas	3 semanas	3 semanas
Grupo 1	500	500	---
Testigo 1	0	0	---
Grupo 2	500	500	500
Testigo 2	0	0	0

5.2 Detección de IL-17 mediante EIA de doble anticuerpo

Las técnicas inmunoenzimáticas (EIA) se fundamentan en el uso de reactivos inmunológicos, como antígenos o anticuerpos, los cuales se encuentran marcados con una enzima (conjugado). La enzima actúa sobre su sustrato y como resultado de esta interacción, se forma un producto

fácilmente medible espectrofotométricamente, lo que demuestra de manera indirecta la presencia del anticuerpo o antígeno respectivamente.

Estas técnicas fueron descritas por primera vez en 1971 por Engvall & Perlmann y en la actualidad existen una gran variedad de protocolos para determinar antígenos y anticuerpos en los más diversos campos de aplicación. En el área clínica, debido a la disponibilidad de reactivos estables, una medición colorimétrica simple de los resultados y la posibilidad del procesamiento de una gran cantidad de muestras, han hecho de estas metodologías una herramienta útil para pruebas en banco de sangre y en encuestas epidemiológicas.

Las principales ventajas del uso de los marcadores enzimáticos son:

1. Sensibilidad elevada debido al efecto amplificador de la enzima, ya que puede actuar sobre una gran cantidad de moléculas de sustrato ($10^3 - 10^4/\text{min}$)
2. El tiempo de vida media prolongado
3. Ausencia de riesgos en su manejo cuando se compara con el uso de marcadores radiactivos

Las características que debe cumplir una enzima para usarse en los inmunoensayos se enlistan a continuación:

- a) Actividad enzimática elevada a concentraciones bajas de sustrato
- b) Alta actividad y estabilidad al pH óptimo para la unión antígeno-anticuerpo

- c) Medición de la actividad enzimática en forma económica y sensible
- d) Pérdida mínima de la actividad enzimática al acoplarse al reactivo inmunológico para formar el conjugado
- e) Estabilidad del conjugado en las condiciones de almacenamiento
- f) Pura a bajo costo
- g) Soluble
- h) Ausencia de la enzima o de sus factores inhibidores en los fluidos biológicos (principalmente en ensayos homogéneos)
- i) Evitar al mínimo el uso de substratos o la formación, durante la reacción enzimática, de compuestos con alto riesgo para la salud

Las técnicas inmunoenzimáticas se agrupan de manera general en ensayos homogéneos y heterogéneos. Los primeros se realizan en una sola fase y no requieren etapas de separación, mientras que en los heterogéneos son necesarios varios lavados para separar los reactivos unidos de los libres.

En nuestro caso se empleó un EIA de tipo heterogéneo y se realizó con el método conocido como del sándwich o de doble anticuerpo; este método es uno de los más empleados para la determinación de antígenos y consiste en cubrir la fase sólida con un anticuerpo al que se unirá el antígeno presente en la muestra durante el periodo de incubación. Después del lavado se adiciona un segundo anticuerpo unido a una enzima, el que reconoce un epítoto diferente del antígeno; finalmente, se elimina el exceso de reactivo, se adiciona el sustrato y se cuantifica el color desarrollado, el cual es directamente proporcional a la concentración del antígeno (Aguilar AE, 1992)

5.2.1 Efecto de la suplementación con zinc en la producción de IL-17.

Para la detección de la interleucina en suero, se usó un EIA de doble anticuerpo, (PeproTech 900-M392), dichos anticuerpos anti- IL-17, fueron producidos en conejo, y el usado como anticuerpo de detección fue biotinilado; como agente revelador se empleo ABTS (Sigma Cat. A3219) y las lecturas fueron realizadas en un lector Behring EL

1. Fijar en una placa para ELISA de 96 pozos con 1 μg del anticuerpo α -IL-17 por pozo en un volumen de 100 μL de PBS. Incubar toda la noche a temperatura ambiente
2. Desechar el contenido de los pozos, mediante inversión. Lavar 4 veces con 300 μL de la solución de lavado (0.05% Tween-20 en PBS).
3. Diluir el estándar de IL-17 murina a una concentración de 1ng/mL
4. Adicionar a cada pozo 100 μL de la muestra del grupo a estudiar o del estándar, por triplicado. Incubar a 25°C durante por lo menos 2 horas
5. Desechar el contenido de los pozos, mediante inversión y lavar 4 veces con la solución de lavado (0.05% Tween-20 en PBS).

6. Diluir el anticuerpo de detección hasta una concentración de 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y añadir 100 μl por pozo e incubar a 25°C durante 2 horas. Desechar el contenido de los pozos y lavar 4 veces con la solución de lavado.
7. Diluir el conjugado 1:2000 y adicionar 100 μL a cada pozo. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Desechar el contenido de los pozos y lavar 4 veces con la solución de lavado.
8. Adicionar 100 μL de la solución de sustrato e incubar a 25°C para el desarrollo del color.
9. Monitorear el desarrollo del color con un lector para ELISA a 405 nm con la corrección de longitud de onda puesta en 650nm.
10. Realizar análisis estadístico (ANOVA y t-student) con software GraphPad Prism versión 6.01

6. RESULTADOS

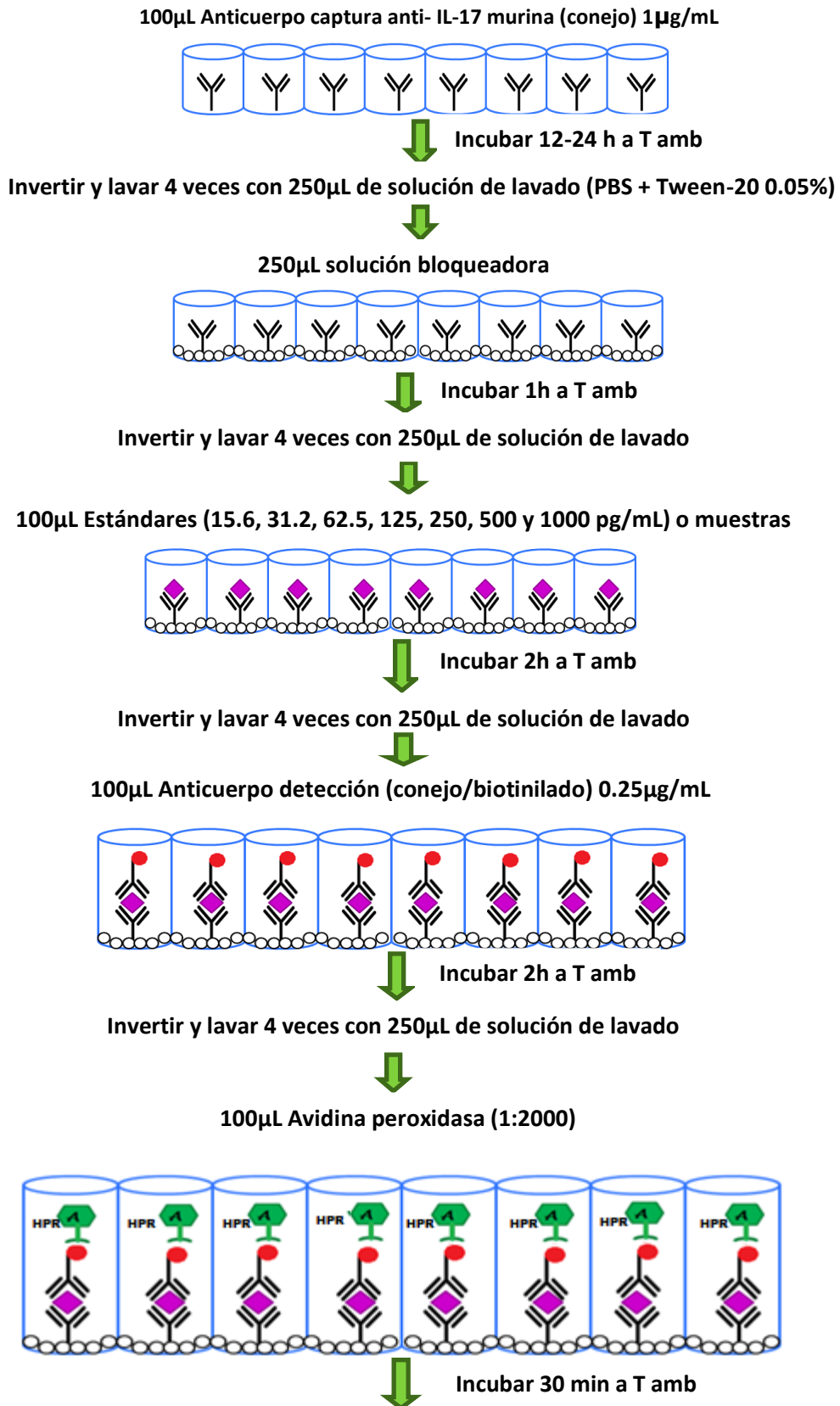
Al momento de realizar la cruce de los animales de experimentación (ratones singénicos de la cepa BALB/c AnN), se registró la masa corporal de los animales de experimentación, previamente separados en grupos de experimentación según el tratamiento empleado.

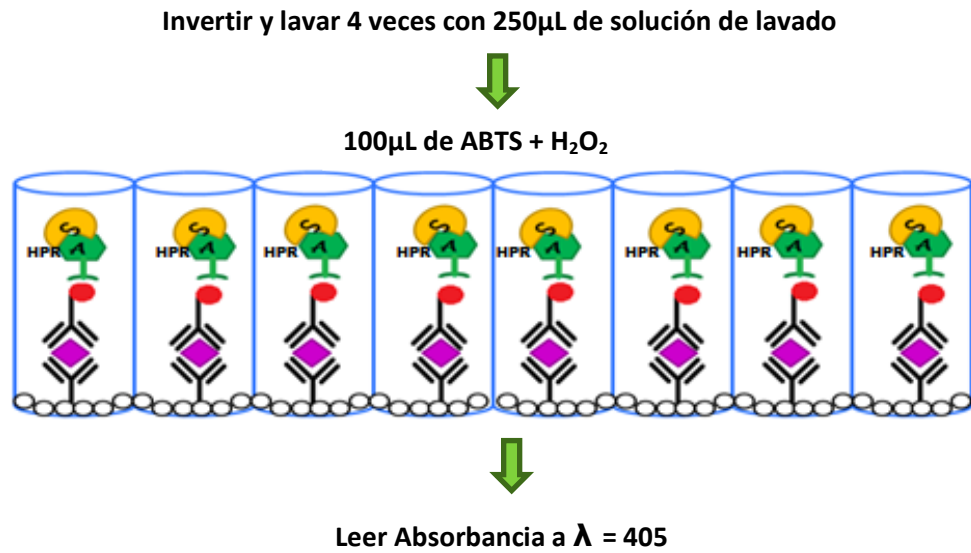


Fig 3. A-Determinación de la masa corporal de los animales de experimentación. B- Tratamientos aplicados a los grupos de experimentación. C- Condiciones de mantenimiento en bioterio (de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio)

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de la citocina, tales resultados están divididos por grupo experimental, considerando la edad y género de los animales. En la determinación de la IL-17 en suero, la cual como ya se mencionó, se realizó mediante un EIA, se obtuvo que en los grupos suplementados con el micronutriente hay una disminución de la citocina, siendo esta disminución más notoria en el caso de los ratones de género macho.

6.1 Estandarización del método y curva estándar





A continuación se muestran los resultados obtenidos en la lectura de las soluciones estándar de IL-17 murina

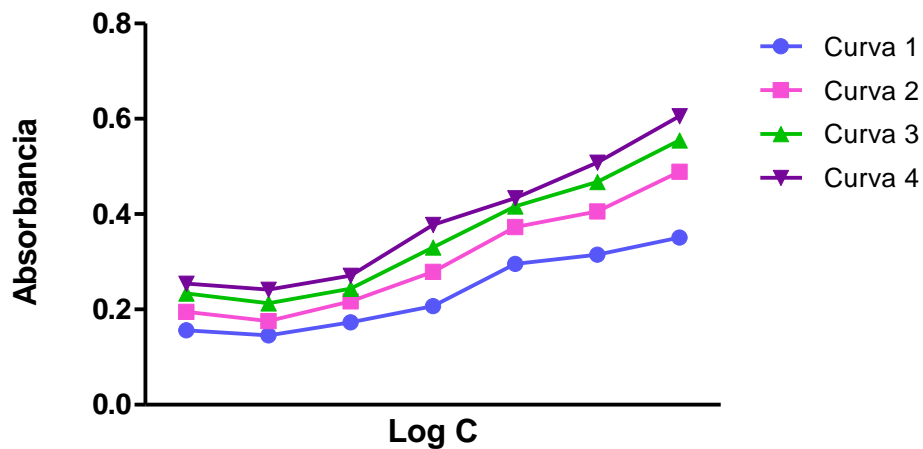


Fig 4. Curvas estándar realizadas en cada experimento. Los estándares se utilizaron en concentraciones de 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 pg/mL. Se presentan las absorbancias vs el logaritmo base 10 de las concentraciones

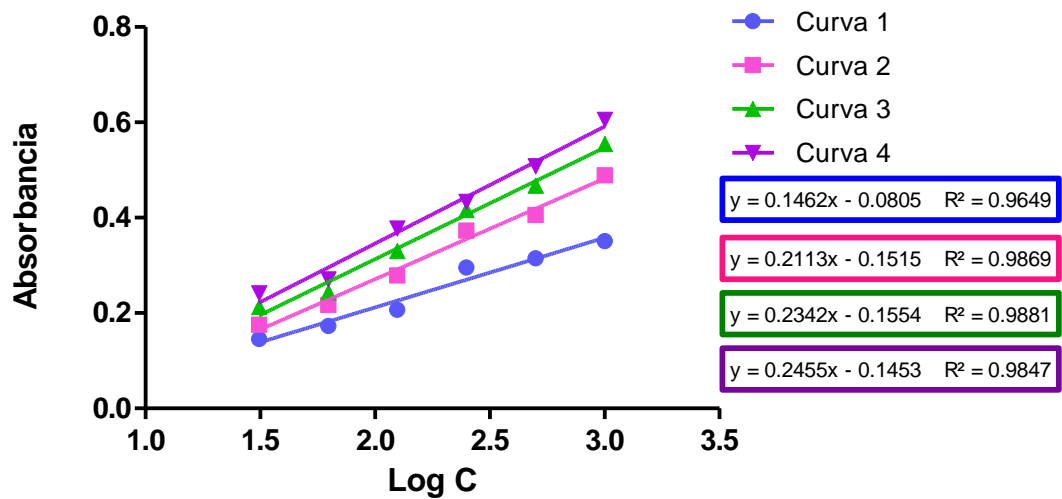


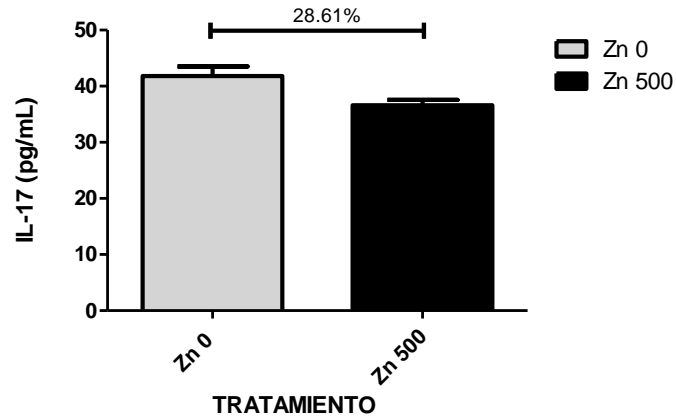
Fig 5. Curvas estándar para la detección de IL-17 en suero y su linearización por el método de mínimos cuadrados

6.2 Cuantificación de la IL-17 en grupos de tratamiento

A continuación se resumen los resultados obtenidos de la cuantificación de la citocina en suero, tanto en los grupos suplementados como en los grupos control

A)

IL-17 en ratones BALB/c, género hembra de 21 días de edad.
Duración del tratamiento con Zn: 6 semanas



B)

IL-17 en ratones BALB/c, género macho de 21 días de edad.
Duración del tratamiento con Zn: 6 semanas

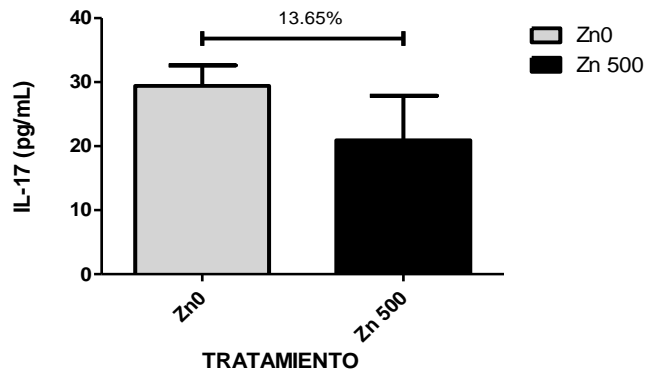
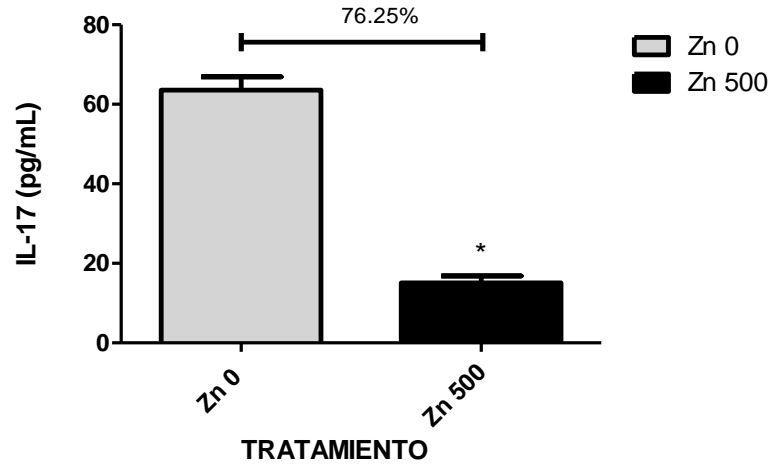


Fig 5. IL-17 en etapas perinatales (21 días) en ratones BALB/c AnN. Los ratones que fueron suplementados con acetato de zinc dihidratado, vía oral a una concentración de 500 µg/mL mostraron una disminución en la concentración de la citocina en suero, siendo esta de un 28.61% en los ratones machos y 13.65 % en el caso de las hembras. ANOVA $p > 0.05$

**IL-17 en ratones BALB/c, género macho de 42 días de edad.
Duración del tratamiento: 9 semanas**



**IL-17 en ratones BALB/c, género hembra de 42 días de edad.
Duración del tratamiento: 9 semanas**

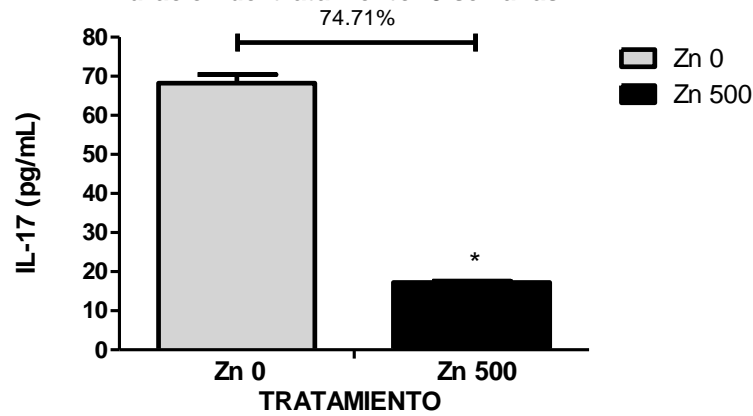


Fig 6. IL-17 en etapas perinatales (42 días) en ratones BALB/c AnN. Los ratones que fueron suplementados con acetato de zinc dihidratado, vía oral a una concentración de 500 µg/mL mostraron una disminución en la concentración de la citocina en suero, siendo esta de un 76.25% en los ratones machos y 74.71% en el caso de las hembras. ANOVA y t-student $p < 0.05$

7. DISCUSIÓN

Tener una alimentación adecuada es un factor esencial para el desarrollo óptimo del organismo. La falta de algún nutriente, como el zinc, puede ocasionar deficiencias en el sistema inmunológico, propiciando infecciones, especialmente en niños. Diferentes grupos de investigadores, han demostrado que la suplementación con zinc es muy efectiva para reducir la susceptibilidad a enfermedades respiratorias, y mejorar los casos de diarrea, además de que favorece el crecimiento e incluso mejora el desarrollo cognoscitivo (Prasad AS, 2008; Morgan, *et al*, 2011; Eve AR, 2011).

La deficiencia severa de zinc durante la gestación, tiene un efecto devastador sobre el resultado del embarazo. Los estudios en humanos y animales experimentales muestran que la deficiencia de zinc en esta etapa puede causar infertilidad, trabajo de parto prolongado, retraso del crecimiento intrauterino, teratogénesis, deficiencias inmunológicas graves e incluso la muerte fetal. La necesidad adicional de zinc durante el embarazo puede ser satisfecha por un aumento en la ingesta de zinc; sin embargo, se ha demostrado que un aumento en los suplementos de zinc, cuando es excesiva, puede causar efectos adversos como una disminución importante en el índice de cobre. (Lastra MD *et al*. 2005). Por lo tanto, ha sido importante determinar el efecto de una suplementación con zinc en etapas perinatales en modelos experimentales respecto a mensajeros químicos, como lo son las citocinas, ya que estudios anteriores demuestran que la suplementación con Zn puede modificar de manera significativa la respuesta inmune (Lastra MD *et al*, 1997)

La suplementación con zinc tiene un efecto positivo en el tratamiento de diversas enfermedades de carácter infeccioso así como las relacionadas a estrés oxidativo (Prasad Ananda S, 2008). Sin embargo, se debe evaluar si el

efecto de la suplementación con dicho nutrimento no sobrestimule al sistema inmunológico, dando como resultado un proceso inflamatorio crónico o bien una serie de reacciones de hipersensibilidad, pudiendo llegar incluso a desencadenar una enfermedad de carácter autoinmune o bien un shock anafiláctico que podría incluso llegar hasta la muerte del individuo. Además otros estudios han demostrado que la sobreproducción de ésta citocina (IL-17), puede tener un impacto importante en el desarrollo de tumores de tipo cancerígeno (Vélez VM, 2007)

Anteriormente, en el Laboratorio de Investigación en Inmunología, se demostró que la suplementación con zinc en ratones, favorece la expresión génica de IFN- γ (Ramírez JA, 2008), además de producir una mayor cantidad de células productoras de IFN- γ en etapas perinatales (Aguilar AE, 2004), es decir, favorece una respuesta de tipo T_H1. Además se ha visto que una suplementación con zinc induce mayor expresión y producción de otras citocinas como la IL-1, TNF- α e IL-12.

Se ha comprobado que una deficiencia de zinc en el organismo, puede generar un desbalance importante entre respuestas de tipo T_H1 y T_H2 debido a que la producción de citocinas como IFN- γ e IL-2 se ve reducida de manera importante mientras que citocinas características de células T_H2 como IL-4, IL-6 e IL-10, no se ve afectada (Kitabayashi C, *et al*, 2010). Sin embargo, no se han hecho muchos estudios sobre el efecto del zinc sobre una respuesta de tipo T_H17, siendo esta población celular importante ya que las células T_H17 se caracterizan por la capacidad de producir la citocina denominada interleucina 17 (IL-17). Dichas células son conocidas como mediadores patogénicos de la inflamación en un gran número de enfermedades autoinmunes, incluyendo esclerosis múltiple y artritis reumatoide (Roşu A *et al*, 2012). En estudios previos en el Laboratorio (Cruz M, 2008), ya se ha visto mediante un análisis histológico, que una suplementación con zinc tiene un efecto positivo en la maduración y diferenciación celular en timo, sin embargo, es importante ver que este

efecto no promueva el desarrollo de padecimiento autoinmunes, como los ya mencionados o reacciones de hipersensibilidad tardía, por lo que consideramos necesario que se realizara dicha evaluación mediante la cuantificación en suero de la IL-17.

Se ha descrito por diversos autores como Gaffen SL que la IL-17 actúa a través de su receptor IL-17R, el cual está ampliamente expresado. Este actúa activando la vía de señalización del factor nuclear κ B (NF- κ B), produciendo citocinas (incluyendo entre otros al factor estimulante de colonias de granulocitos [G-CSF]), para de esta manera inducir la inflamación (Gaffen SL, 2009).

Aunque la señalización de la IL-17 no está bien establecida y aún no se comprenden claramente los estímulos que favorecen la activación de la vía IL-23/IL-17 contraria a la de la IL-12/IFN- γ , se sabe que las APC producen tanto IL-23 como IL-12, por lo cual se cree que debe existir un mecanismo para regular su expresión diferencial, lo que pudiera depender de ciertas condiciones del medio y de su modificación por parte de los estímulos específicos responsables de la respuesta inmunológica específica (McKanzie BS, *et al*, 2006)

Sin embargo, se considera por hallazgos sugestivos que el aumento del AMPc intracelular favorece la respuesta de la vía IL-23/IL-17 sobre la vía IL-12/IFN- γ . El aumento del AMPc puede deberse a la mayor producción por activación de los receptores acoplados a proteínas G activadoras que unen PGE2 o ATP, o a la activación de las vías que inhiben su salida de la célula, como en el bloqueo de los receptores acoplados a proteínas G inhibitoras inducido por la toxina pertussis (McKanzie BS, *et al*, 2006). Otros estudios evidencian que la activación de la vía IL-23/IL-17 se ve favorecida por productos bacterianos presentes en lisados celulares, mientras que la bacteria completa activa de preferencia la vía IL-12/IFN- γ (Dong C, 2006).

La unión de la IL-17 con su receptor en la membrana de las células estromales, endoteliales y ciertas subpoblaciones de monocitos, activa la vía de las MAP cinasas por medio de las proteínas cinasas reguladoras de señales extracelulares ERK, c-jun, N-terminal cinasa, JNK y p38 (Moseley TA *et al*, 2003), llevando a la activación de los factores de transcripción NF- κ B, AP1, TNFR y TRAF-6, los cuales regulan positivamente la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-17F, IL-8, TNF- α , LIF, los factores de crecimiento como GM-CSF y las quimiocinas CXC-quimiocinas ligando (CXCL)1, 2, 5 y CC-quimiocinas ligando(CCL) 2, 5, 7 y 20 (Shalom BT *et al*, 1998)

Además esta cascada de señales lleva a la producción de las metaloproteinasas de matriz 3 y 13, moléculas de adhesión y PGE2, ésta última por medio de la activación de COX-2 (Moseley *et al*,2003). Estos eventos parecen promover el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de la infección aguda y favorecer los efectos inflamatorios en ciertas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la psoriasis (Dong C, 2006)

La IL-17A se ha caracterizado como una citocina proinflamatoria que actúa en gran variedad de tejidos dentro del organismo y se ha relacionado, como ya se mencionó, con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, osteoartritis, cáncer, rechazo a aloinjertos (Vélez MV, 2007) y procesos inflamatorios crónicos de la vía aérea, identificándose como su principal papel biológico la activación y expansión rápida de neutrófilos durante procesos infecciosos u otro tipo de daños tisulares (Kawaguchi, 2004)

Los estudios realizados en ratones sobre el papel de la IL-17A en las enfermedades autoinmunes han sugerido que es primordial en el desarrollo de la encefalomiелitis autoinmune experimental (Batten M *et al*, 2006) que es similar a la

esclerosis múltiple de los seres humanos, y la artritis inducida por colágeno. (Kitabayachi C *et al*, 2010).

En el caso de la artritis reumatoide se ha encontrado evidencia que vincula los altos niveles de producción de IL-17A en el fluido sinovial por parte de las células T activadas, con la degradación de cartílago articular y erosión del hueso subyacente, lo cual pudiera deberse a la capacidad de la citocina de regular positivamente la expresión de IL-6, un potente mediador de la inflamación articular que contribuye a la degradación del cartílago; también se ha demostrado que la IL-17A aumenta sinérgicamente los efectos destructivos de IL-1 y TNF- α en cartílago y sinovial. (Roşu A. *et al*, 2012). Además, las evidencias en ratones "knockout" para IL-1 β señalan a la IL-17A como promotora de la artritis de forma independiente de IL-1 β (Moseley TA *et al*, 2003). Más aún, el incremento de los niveles de IL-17A en el tejido y fluido sinovial podría regular la osteoclastogénesis por medio de la regulación positiva de factores de diferenciación para los osteoclastos (Shalom BT, 1998). También existen datos de que IL-17A induce la producción de óxido nítrico y aumenta los niveles de RNAm de la sintasa inducible de NO en condrocitos de cartílago osteoartrítico y en enfermedades similares, llevando a destrucción de la matriz extracelular y daño en el condrocito contribuyendo a una reducción total de la función articular (Moseley TA *et al*, 2003). Igualmente, parece que la IL-17A promueve la degradación de la matriz por la liberación de fragmentos de colágeno y proteoglicanos tipo glicosaminoglicanos (GAGs) en el cartílago, liberando metaloproteinasas de la matriz e inhibiendo la síntesis de nuevos proteoglicanos y colágeno (Shalom BT, 1998). Se ha encontrado que la IL-17F y la IL-17E tienen efectos similares sobre el cartílago articular tanto en artritis reumatoide como en osteoartritis.

Otros aspectos importantes de la IL-17 se discuten a continuación y fundamentan el trabajo de tesis.

Con respecto al papel de la IL-17A en cáncer, los datos proporcionados por el grupo de investigación del Dr. Kato sugieren una alta expresión de esta citocina en una proporción considerable de pacientes con cáncer ovárico, al mismo tiempo que mostraron cómo promueve la angiogénesis tumoral; sin embargo, no encontraron correlación de estos hallazgos con las características clinicopatológicas del tumor (estado, tipo histológico, grado, metástasis o sobrevida) (Kato T, 2001). Apoyado en estos resultados el grupo encabezado por el Dr. Tartour demostró que la IL-17A aumenta la tasa de crecimiento de tumores humanos cervicales trasplantados en ratones atímicos, lo que podría deberse al incremento de los niveles de IL-6 y al reclutamiento de macrófagos en el sitio del tumor, situación relacionada con mayor invasividad a los tejidos adyacentes (Tartour E. *et al*, 1999). Sin embargo, los estudios posteriores de este grupo sugieren una actividad pleiotrópica de esta citocina, pues fue necesaria para el control de tumores inmunogénicos en ratones inmunocompetentes por un mecanismo dependiente de las células T. Esta actividad ambivalente en los tumores se ha demostrado con otras citocinas como la IL-6 y la IL-4. (Benchetrit F, *et al*, 2002)

Con relación a los trasplantes de órganos, la presencia de altos niveles de IL-17A tanto en individuos con trasplante cardíaco como renal, parece ocasionar una disminución de la sobrevida del injerto asociada con la capacidad de esta citocina para aumentar la infiltración de macrófagos y células CD4+ y, en menor proporción, de células T CD8+ en el órgano trasplantado, al mismo tiempo que incrementa la producción de IL-1 β , TGF- β , TNF- α y otros mediadores inflamatorios como IL-6 e IL-8. (Antonyssamy MA, *et al*, 1999)

En los procesos inflamatorios crónicos del tracto respiratorio como el asma alérgica, las IL-17A, IL-17F e IL-17E, han mostrado tener un papel importante (Kawaguchi M *et al*, 2004). Hay evidencia que sugiere que la IL-17A y la IL-17F participan en la fibrosis subepitelial que lleva a la remodelación de la vía aérea,

proceso relacionado con la gravedad de la enfermedad; además, la IL-17A parece tener la capacidad de inducir la expresión de genes de mucina en las células epiteliales del bronquio (Llindén A, 2006) mientras que la IL-17E, favorece la eosinofilia y degranulación de mastocitos (Kawaguchi M *et al*, 2004). Se cree que estos efectos deletéreos son secundarios a la falta de regulación de la vía de la IL-17, pues hay evidencias a favor de que IL-17A e IL-17F están relacionadas en el reclutamiento de neutrófilos, mientras la IL-17E favorece el desarrollo de respuestas tipo T_H2 (McKanzie BS *et al*, 2006)

La producción de la IL-17A parece inducir la granulopoyesis y el flujo de neutrófilos durante la infección aguda. La IL-23 producida pocas horas después de la exposición a los productos microbianos, por las APC, dispara una rápida respuesta de IL-17 en las células T residentes en el tejido, que parecen ser principalmente T $\gamma\delta$ y otros tipos de células T $\alpha\beta$ no convencionales, lo cual estimula la producción de citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento que permiten reclutar neutrófilos en el sitio de la infección (Stark M *et al*, 2005). Posteriormente, las células T_H17 residentes en los tejidos proveen IL-17A para el continuo reclutamiento de neutrófilos. La importancia de esta vía radica en que los ratones sin una rápida respuesta IL-23/IL-17, son más susceptibles a las enfermedades tipo sepsis o necrosis comparados con los que responden rápidamente, lo que indicaría un papel clave de esta ruta inmunológica en la sobrevida a daños catastróficos. Esta respuesta parece ser la primera línea que actúa mientras pasa el tiempo adecuado para el desarrollo de la respuesta Th1-IFN- γ (McKanzie BS *et al*, 2006)

De acuerdo con lo anterior, se ha demostrado la inducción de la IL-17A en la respuesta a varios patógenos extracelulares como *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* entre otros (McKanzie BS *et al*, 2006). En la infección pulmonar por *Klebsiella pneumoniae*, la inducción de IL-17A dependiente de IL-23

en el pulmón, lleva a eventos que movilizan células T CD4+ y CD8+ favoreciendo la infiltración tisular, lo que ha demostrado jugar un papel importante en el control de la infección (Happel K, *et al*, 2003)

Para limitar la infección por *Bordetella pertussis* también se requiere activación de la vía IL-23/IL-17, lo que podría explicarse por la inhibición de la toxina pertussis sobre los canales acoplados a proteínas G inhibitorias que, como se mencionó, favorece el aumento del AMPc intracelular, llevando a la activación de la vía (McKanzie BS *et al*, 2006). En el caso de *S. aureus*, su peptidoglicano estimula de forma potente la respuesta por la vía IL-17, aunque esta parece no ser específica (McKanzie BS *et al*, 2006).

En un estudio en modelos murinos, Wu y colaboradores mostraron un papel importante de la familia de citocinas IL-17 en el control de la infección por *Mycoplasma pneumoniae*. Este trabajo ha comprobado como la producción de las IL-17A e IL-17F por las células T CD4+ de forma dependiente de la IL-23, inducida por las APC residentes en el pulmón, favorece el reclutamiento de neutrófilos y parece tener un papel en la eliminación y control del crecimiento de este microorganismo. Estos autores encontraron también una producción de IL-17C en este modelo, la cual no se veía afectada con el bloqueo de la actividad de la IL-23, como si le sucedía a la IL-17A e IL-17F, sugiriendo una vía alterna de producción para esta citocina (Wu Q, *et al*, 2007)

Adicionalmente el grupo del investigador Infante sugieren que *Borrelia burgdorferi*, la espiroqueta causante de la enfermedad de Lyme, estimula en células T murinas la producción de IL-17A en forma dependiente de las APC, posiblemente por una vía que involucra a los TLRs. Estos datos se correlacionan con los hallazgos que obtuvieron luego de estudiar seres humanos con artritis de Lyme y artritis inducida por *Chlamydia trachomatis* (bacteria intracelular

obligada), en cuyos líquidos sinoviales, comparados con los de los controles, encontraron altos niveles de IL- 17A. (Infante DC, *et al*, 2000)










Además de estas respuestas tempranas, la producción de IL-17A y las respuestas inmunológicas específicas de antígeno provenientes de las células T_H 17 en los ambientes tisulares locales, podrían ser importantes para mantener por largo tiempo respuestas antimicrobianas como en el caso de la formación del granuloma o durante infecciones bacterianas crónicas, aunque existe poca evidencia al respecto (Louten J *et al*, 2009).












Como se pudo apreciar en nuestros resultados obtenidos para la concentración en suero de la citocina, en todos los casos hay un decremento importante en la concentración de la molécula en cuestión, en los grupos experimentales que fueron suplementados con el micronutriente, lo cual concuerda con la disminución de la población celular de linfocitos T_H17 reportado por el grupo del Dr. Kitabayashi (Kitabayashi C *et al*, 2010). Lo que nos indica que la suplementación con Zn tiene un impacto importante en la diferenciación hacia linfocitos T_H17 y con ello sobre la disminución en la producción de citocinas proinflamatorias, lo cual podría tener un efecto benéfico al evitar posibles enfermedades de carácter autoinmune o bien hipersensibilidades, e incluso podría tener un efecto positivo en pacientes con cáncer o que han sido receptores de algún trasplante. Sin embargo, es necesario, evaluar si dicha suplementación no afecta la respuesta inmunológica frente a diversos agentes patógenos.

8. CONCLUSIONES

- ❖ La producción de IL-17 se ve notoriamente disminuida en animales suplementados con zinc durante 9 semanas
- ❖ El decremento en producción de IL-17 fue mayor en el caso de los machos, posiblemente por efectos hormonales
- ❖ La suplementación en ratones por un periodo de 6 semanas, causó un decremento en la producción de IL-17, este no fue significativa, esto puede indicarnos que se requiere de un mayor tiempo de exposición para producir este efecto
- ❖ La suplementación con zinc lejos de inducir un problema de autoinmunidad disminuye las posibilidades de presentar un trastorno de esa naturaleza, lo cual representa una respuesta positiva para los individuos suplementados
- ❖ En etapas perinatales la suplementación con zinc favorece la respuesta inmune, sin inducir un trastorno de hipersensibilidad tardía
- ❖ La disminución de la producción de IL-17 en etapas perinatales no disminuye la capacidad del individuo de tener un control temprano de infecciones
- ❖ La suplementación con zinc favorece la proliferación celular de linfocitos T, en tимо, sin inducir la producción de clones autorreactivos
- ❖ Es importante una regulación adecuada en cuanto al consumo de suplementos que contengan zinc, ya que su ingesta impacta de manera notoria la producción de diferentes componentes del sistema inmunológico

9. BIBLIOGRAFÍA

-  Aggarwal S. y Austin LG. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol.* 2002; 71, 1-8
-  Aguilar AE, *et al.* IFN- γ secreted by zinc induced murine spleen cells during mice perinatal stages. *Metal ions in Biology and Medicine.*2004; 8:85-88
-  Aguilar AE, *et al.* *Manual de practicas de inmunología aplicada.* División de Bioquímica y farmacia. Departamento de biología. Facultad de Química, UNAM,1992
-  Antonysamy MA, *et al.* Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of Dendritic Cell progenitor. *J Immunol.* 1999; 162: 577-584.
-  Batten M. *et al.* *Interleukin 27* limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of Interleukin 17-producing T cells. *Nature Immunol.* 2006; 7: 929-936
-  Benchetrit F, *et al.* Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood.* 2002; 99: 2114-2121
-  Chasapis CT. *et al.* Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol.* 2012. 86:521–534
-  Cruz MI. *Efectos de la suplementación con zinc sobre la distribución de subpoblaciones de linfocitos en el timo.* Facultad de Química, UNAM, 2008
-  Dong C. Diversification of T-helper-Cell lineages: Finding the family root of IL-17-producing cells. *Nature Rev Immunol.* 2006; 6: 329-333

-  Eve AR. Zinc Toxicity: From “No, Never” to “Hardly Ever”. *Gastroenterology*. 2011; 140,4: 1132-1135
-  Florea ID. *et al.* Nosotros y el cinc. *Nutr Hosp*. 2012; 27:3, 691-700.
-  Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:8, 556-580
-  Hambidge KM. *et al.* Zinc bioavailability and homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2010; 91(Suppl): 1478S–1483S.
-  Happel K, *et al.* Cutting Edge: Roles de Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to Klebsiella pneumonie Infection. *J Immunol*. 2003; 170: 4432-4436
-  Infante DC, *et al.* Microbial Lipopeptides induce production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*. 2000; 165: 6107-6115.
-  Ivanov II. *et al.* The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the differentiation program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*. 2006; 126: 1121-1133.
-  Kato T. *et al.* Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 282: 735-738.
-  Kawaguchi M. *et al.* IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:6,1256-1273
-  Kindt TJ. *et al.* *Kuby immunology*. USA, San Francisco, 2007. pp 236-247
-  Kitabayashi C. *et al.* Zinc suppresses T_h17 development via inhibition of STAT3 activation. *Int Immunol*. 2010; 22:5, 375–386.

- 📖 Kolls JK y Linden A. Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity*. 2004; 21, 467–476
- 📖 Korn T. *et al.* Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol*. 2007; 19:362–371
- 📖 Kyoung WK. *et al.* Increased interleukin-17 production via a phosphoinositide 3-kinase/Akt and nuclear factor κ B-dependent pathway in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2004; 7:1, R139- R148
- 📖 Lastra MD *et al.* Increment of immune responses in mice perinatal stages after zinc supplementation. *Arch Med Res*. 1997; 28:1, 67-72.
- 📖 Lastra MD *et al.* Zinc concentrations during mice gestation. *Biol Trace Elem Res*. 2005; 105 (1-3): 205-214
- 📖 Llindén A. Interleukin-17 and airway remodelling. *Pulm Pharmacol*. 2006;19: 47-50
- 📖 Lothar R y Philip G. Zinc and the immune system. *Proc Nutr Soc*. 2000; 59: 541–552
- 📖 Louten J. *et al.* Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123:5, 1004-1011
- 📖 Mangan PR. *et al.* Transforming growth factor- β induces development of the Th17 lineage. *Nature*. 2006; 441: 231-234.
- 📖 Martin AC. *et al.* Zinc deficiency. *Nutrition*. 2011; 27: 1085–1086

- 📖 McKenzie BS, *et al.* Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* 2006; 27:17-23
- 📖 Morgan CI *et al.* Zinc supplementation alters airway inflammation and airway hyperresponsiveness to a common allergen. *J Inflamm.* 2011, 8:36
- 📖 Moseley TA, *et al.* Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14: 155-174.
- 📖 Nasr YA *et al.* Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity. *Autoimmunity.* 2010; 9, 785–792.
- 📖 Park H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing Interleukin-17. *Nature Immunol.* 2005; 6: 1133-1141
- 📖 Peroni DG *et al.* How changes in nutrition have influenced the development of allergic diseases in childhood. *Ital J Pediatr.* 2012, 38:22, 1-7
- 📖 Prasad AS. Zinc in Human Health: Effect of Zinc on Immune Cells. *MOLMED.* 2008, 14 (5-6): 353-357
- 📖 Ramírez JA. *Influencia del Zinc en la respuesta Th1. Estudio molecular del IFN-γ.* Facultad de Química, UNAM, 2008
- 📖 Roşu A. *et al.* IL-17 patterns in synovium, serum and synovial fluid from treatment-naïve, early rheumatoid arthritis patients. *Rom J Morphol Embryol.* 2012; 53:1, 73–80
- 📖 Salgueiro MJ. *et al.* Zinc Status and Immune System Relationship. *Biol Trace Elem Res.* 2000; 79:105-205.
- 📖 Serrano HA. Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH₃, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatol. Clin.* 2009; 5:S1, 1-5.

- 📖 Shalom BT, *et al.* Interleukin-17 induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of Mitogen- activated Protein Kinases and NF- κ B. *J Biol Chem* 1998; 273: 27467-27473.
- 📖 Shengying B. *et al.* Zinc modulates the innate immune response in vivo topolyicrobial sepsis through regulation of NF- κ B. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010; 298:L744-L754
- 📖 Stark M, *et al.* Phagocytosis of apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity.* 2005; 22: 285-294
- 📖 Stefanidou M. *et al.* Zinc: a multipurpose trace element. *Arch. Toxicol.* 2006; 80: 1–9
- 📖 Tartour E. *et al.* Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res.* 1999; 59: 3698-3704
- 📖 Vélez VM. *et al.* Interleuquina-17: características, vías de diferenciación, señalización y funciones biológicas. *Lateir.* 2007, 20:2; 186-195
- 📖 Vidlak D y Kielia T. Differential effects of interleukin-17 receptor (IL-17R) signaling on innate and adaptive immunity during central nervous system bacterial infection. *JNI.* 2012, 9:128
- 📖 Wu Q, *et al.* IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory Mycoplasma Pneumoniae infection. *Microb Infect.*2007; 9: 78-86.
- 📖 Yao Z. *et al.* Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity.* 1995 ;3: 811–821

Anexo I
Esquema de Microplaca de ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Anexo II

Reconstitución de reactivos

⇒ Anticuerpo de captura

En un área temporal aséptica, el vial con el liofilizado (21µg, de anticuerpo de alta afinidad por IL-17 murina purificado en conejo + 0.5mg de D-manitol, Pepro-Tech, México, No.Cat. 900-M392) se centrifuga y se reconstituye en 210µL de agua estéril. La concentración a la que se llega es de 100µg/mL. A partir de este stock se hacen alícuotas de 20µL en tubos estériles para microcentrífuga, los cuales se almacenan a -70°C. Se toman una alícuota y se transfiere 2000 µL de PBS (dilución 1:100). La concentración final es 1µg/mL.

Nota: Para cada pozo de la placa de ELISA se utilizan 100µL de la solución de trabajo del anticuerpo de captura 1µg/mL

⇒ Anticuerpo de detección

Se centrifuga, el vial con el liofilizado (6µg, de anticuerpo biotinilado de alta afinidad por IL-17 murina purificado en conejo + 0.5mg de D-manitol, Pepro-Tech, México, No.Cat. 900-M392) y se reconstituye en 60µL de agua estéril. La concentración a la que se llega es de 100µg/mL. A partir de este stock se hacen alícuotas de 6 µL en tubos estériles para microcentrífuga, los cuales se almacenan a -70°C. Se toma una alícuota y se toman 4µL para preparar la solución de trabajo, se transfiere un volumen de 1600 µL del diluyente (dilución 1:400). La concentración final es 0.25µg/mL.

Nota: Para cada pozo de la placa de ELISA se utilizan 100µL de la solución de trabajo del anticuerpo de detección 0.25µg/mL

⇒ Estándar de IL-17 murina

Se centrifuga el vial con el liofilizado (1µg de IL-17 murina recombinante + 2.2mg BSA + 11mg de D-manitol, Pepto-Tech, México, No.Cat. 900-M392) y se reconstituye en 1mL de agua estéril. La concentración a la que se llega es de 1µg/mL. A partir de este stock se hacen alícuotas de 100µL en tubos estériles para microcentrifuga, los cuales se almacenan a -70°C. Para preparar la solución de trabajo se toman 2µL y se transfiere a otro tubo estéril para microcentrifuga que contenga 2000µL del diluyente (dilución 1:1000). La concentración final es de 1ng/mL.

Nota: Para cada pozo de la placa de ELISA se utilizan 100µL de la solución de trabajo del estándar de IL-17 murina 1ng/mL. Una vez reconstituido el reactivo es estable por 6 meses almacenado a -20°C y por 2 semanas si es almacenado a una temperatura de 2-8°C.

⇒ Conjugado avidina-HRP

Abrir el vial con el reactivo en un área aséptica (60µL de conjugado avidin-HRP, Pepto-Tech, México, No.Cat. 900-M392) y hacer alícuotas de 5 µL en tubos estériles para microcentrifuga y almacenar a una temperatura máxima de -20°C. Para preparar la solución de trabajo tomar una alícuota y transferir 2.5 µL a otro tubo estéril para microcentrifuga con 5000 µL del diluyente (dilución 1:2000).

Nota: Para cada pozo de la placa de ELISA se utilizan 100µL de la solución de trabajo del estándar de IL-17 murina 1ng/mL. Una vez reconstituido el reactivo es estable por dos años almacenado a -20°C. Se debe evitar más de un ciclo de congelación descongelación.

⇒ Amortiguador salino de fosfatos (Solución de trabajo)

Para preparar 1 litro de la solución de buffer de fosfatos (PBS) es necesario medir:

Na_2HPO_4 (0.15 M)	161.5 mL
KH_2PO_4 (0.15 M)	338.5 mL
NaCl (0.15 M)	500.0 mL

Mezclar las cantidades antes indicadas de las soluciones concentradas y ajustar el pH a 6.4. La solución resultante se trasfiere a un frasco ámbar estéril. Almacenar a temperatura ambiente.

★ Soluciones concentradas ★

◇ Na_2HPO_4 (0.15 M)

Pesar con exactitud 10.65 g de Na_2HPO_4 (Baker, No. Cat. 3828) y aforar a 500 mL con agua desionizada

◇ KH_2PO_4 (0.15 M)

Pesar con exactitud 5.1 g de KH_2PO_4 (Técnica Química, No. Cat. 1890) y aforar a 250 mL con agua desionizada

◇ NaCl (0.15M)

Pesar con exactitud 4.4 g de Na_2HPO_4 (Baker, No. Cat. 3629) y aforar a 500 mL con agua desionizada

⇒ Solución de lavado

Para preparar 1 litro de la solución de lavado es necesario medir:

Tween-20 500 μ L

En aproximadamente 800 mL de agua estéril disolver el reactivo, en un área aséptica. Al final, se afora a 1L con PBS para obtener una concentración de 0.05% de Tween-20. La solución se trasfiere a un frasco estéril a temperatura ambiente.

⇒ Diluyente

Para preparar 1 litro de la solución de lavado es necesario medir:

Tween-20 500 μ L

Albumina sérica bovina (BSA) 1g

En aproximadamente 800 mL de agua desionizada estéril disolver cada reactivo, uno por uno, en un área aséptica. Al final, se afora a 1L con PBS para obtener una solución con Tween-20 al 0.05% y BSA al 0.1%. La solución se esteriliza por filtración y se almacena a 4°C. Se puede utilizar hasta por una semana

Anexo III

Abreviaturas.

- ◇ **AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico
- ◇ **APC:** Célula presentadora de antígeno
- ◇ **ATP:** Adenosín trifosfato, molécula energética
- ◇ **COX:** Enzima, ciclooxigenasa
- ◇ **CTLA:** Antígeno asociado a linfocito T citotóxico
- ◇ **CXC /CCL:** Quimiocinas
- ◇ **EIA:** Ensayo inmunoenzimático
- ◇ **ERK:** Cinasa extracelular reguladora
- ◇ **GAG:** Protoglicanos tipo glicosaminoglicanos
- ◇ **IFN- γ :** Interferón gamma
- ◇ **IL:** Interleucina,
- ◇ **JNK:** Cinasa Jun N-terminal
- ◇ **kDa:** Kilo Daltones, unidad de medida de peso molecular
- ◇ **MAPK:** Proteína cinasa, activada por mitógenos
- ◇ **NF- κ B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- ◇ **NK:** Célula citotóxica “Natural Killer”
- ◇ **NO:** Oxido nítrico
- ◇ **ORF:** Marco de lectura abierto
- ◇ **PGE:** Prostaglandina E
- ◇ **T CD 8+:** Linfocito T citotóxico
- ◇ **T CD4+:** Linfocito T cooperador
- ◇ **TGF- β :** Factor de crecimiento transformante
- ◇ **TH:** Célula T cooperadora
- ◇ **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alpha