



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Efectos del exceso de zinc *in vitro* sobre la producción de  
Interleucina 17

T E S I S

Que para obtener el Título de

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

Presenta

FERNANDO EGUIARTE SOLOMON



México, D.F.

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE: Profesor: INÉS FUENTES NORIEGA**

**VOCAL: Profesor: ANA ESTHER AGUILAR CÁRDENAS**

**SECRETARIO: Profesor: PATRICIA SEVERIANO PÉREZ**

**1º SUPLENTE: Profesor: SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA**

**2º SUPLENTE: Profesor: MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOLOGÍA**

**LABORATORIO 1-D (ANEXO).**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. ANA ESTHER AGUILAR CÁRDENAS**

**SUSTENTANTE: EGUIARTE SOLOMON FERNANDO**

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Generalidades sobre el zinc</b>	<b>3</b>
2.1.1	Función biológica del zinc	3
2.1.2	Absorción, transporte y excreción del zinc	6
<b>2.2</b>	<b>El zinc en la salud</b>	<b>9</b>
2.2.1	Deficiencia de zinc	10
2.2.2	Evaluación del status del zinc	12
2.2.3	Uso de suplementos	15
2.2.4	Exceso de zinc	16
<b>2.3</b>	<b>El zinc y el sistema inmunológico</b>	<b>19</b>
2.3.1	El zinc “in vitro”	23
2.3.2	La subpoblación celular Th17 y la interleucina-17	29
2.3.2	Estudios del Laboratorio de Investigación en Inmunología	37
<b>3</b>	<b>Objetivos, Hipótesis y Justificación</b>	<b>40</b>
3.1	Objetivos	40
3.2	Hipótesis	40
3.3	Justificación	41
<b>4</b>	<b>Material y Métodos</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>Resultados</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Discusión</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>62</b>
	<b>Anexo I</b>	<b>65</b>
	<b>Anexo II</b>	<b>66</b>
	<b>Anexo III</b>	<b>70</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>72</b>

## **1 Introducción**

La siguiente información es una parte esencial de la estrategia de desarrollar, dar estructura y habilitar un protocolo experimental de detección de interleucinas por citometría de flujo como alternativa de análisis y experimentación para los estudios sobre el impacto que tiene el zinc en el sistema inmunológico realizados en el Laboratorio de Investigación en Inmunología (LII) de la Facultad de Química de la UNAM.

Entre los contenidos de los antecedentes se pretendió incluir metodologías y resultados de estudios previos realizados en el LII, una renovada versión de los antecedentes relacionados al zinc en la salud, las circunstancias correspondientes a la suplementación con este metal y su participación en mecanismos inmunológicos que se investigan en estos trabajos. También dentro de esta introducción se encuentra una compilación de información relacionada con diferentes resultados de los modelos experimentales *in vitro* utilizados actualmente en el campo de la inmunología.

El estudio de los efectos que tiene la nutrición sobre el sistema inmunológico representa un factor muy importante en el logro de la prevención y tratamiento de enfermedades. Los metales traza se obtienen de la dieta para aprovecharse en distintas funciones fisiológicas, principalmente por que son cofactores de numerosas enzimas fundamentales para la función inmunológica y otros mecanismos de defensa de los seres vivos.

El zinc es un elemento traza esencial que participa en procesos como el metabolismo de ácidos nucleicos y de proteínas, así como también para el crecimiento, proliferación, división y función celulares.

Los niveles fisiológicos de zinc se ven afectados no sólo por deficiencia de zinc sino por múltiples factores que van desde la ingestión en la dieta , variación diurna, concentración de albúmina, hasta embarazo y falla renal. En casos de deficiencia de zinc la producción de citocinas de Th1 (IFN- $\gamma$  , IL-2 y TNF- $\alpha$ ) se encuentra disminuida. Los síntomas provocados por la falta de metal pueden ser revertidos con una suplementación adecuada. La suplementación *in vitro* con zinc tiene como consecuencia el incremento en la respuesta primaria de anticuerpos, en los niveles de interleucina-1 y en la actividad de la interleucina-4, entre otros efectos.

Se ha observado que las cantidades elevadas del elemento por periodos prolongados pueden provocar alteraciones en estimulación de la respuesta linfocitaria, la quimiotaxis, la fagocitosis de PMN y la función de monocitos. En diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se ha descrito que el exceso de zinc es capaz de reducir los distintos tipos de toxicidad mediada por células y también puede afectar el desarrollo del sistema inmunitario. En cultivo celular, las concentraciones muy altas de zinc (superior a 100  $\mu$ M) estimulan a los monocitos a secretar citocinas proinflamatorias pero se inhiben funciones de las células T.

Ya que la estimulación de las citocinas y de los TLR afecta la expresión de transportadores de zinc, se cree que las proteínas involucradas en inflamación y enfermedades autoinmunes pueden modificar su expresión ante un exceso intracelular del metal.

Las células Th1 son importantes en la protección a patógenos, en un ambiente proinflamatorio pueden causar daño tisular y consecuencias

relacionadas con inflamación crónica. Se ha comprobado que las variaciones en concentración de zinc afectan a las poblaciones de Th1. Asimismo, el zinc afecta el desarrollo de la población Th17 quien está asociada a procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes. Se considera que los efectos proinflamatorios de la IL-17 se deben a la acción de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ . La influencia tan importante del exceso de zinc en la función de células T ha sido observada en distintos estudios *in vitro*. La generación de microambientes de citocinas tan complejos indican que al relacionar datos experimentales sobre los efectos del exceso de zinc, se mejorará el conocimiento sobre las afecciones linfocitarias potenciales, principalmente sobre la subpoblación Th17 y la autoinmunidad.

## **2 Antecedentes**

### **2.1 Generalidades sobre el zinc**

#### **2.1.1 Función biológica del zinc**

El zinc es un bioelemento cuyas características químicas lo hacen sumamente versátil para ser empleado en múltiples procesos bioquímicos por una gran cantidad de sistemas biológicos. Este metal participa en la mayoría de procesos de síntesis y degradación de macromoléculas gracias a su función como cofactor enzimático y activador químico. Este micronutriente es el segundo metal traza más abundante en humanos después del hierro. Es el único metal que es coenzima para todas las clases de enzimas (Rink 2000). Es un componente de más de 300 enzimas y aun de un mayor número de proteínas de suma importancia para la salud. Para lograr un óptimo

metabolismo de ácidos nucleicos y de proteínas, así como también para el crecimiento, división y función celulares, se requiere de una suficiente disponibilidad de zinc (Vallee 1993).

El zinc modifica y estabiliza las membranas celulares, por su interacción con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, con los carboxilo e hidroxilo de los ácidos siálicos y con los fosfato de los fosfolípidos; también participa en la distribución celular y en la activación de las proteínas cinasas (Bettger 1993).

Se ha visto que este elemento puede inhibir algunas funciones inducidas por la calmodulina, la cual interviene en procesos regulados por calcio (Rossowska 1993).

El zinc es crítico para el crecimiento celular, el desarrollo y diferenciación, la síntesis de ADN, la transcripción de ARN y para la división y la activación celular (Prasad 1995, 1998).

En la replicación celular, el zinc juega un papel muy importante debido a que se requieren enzimas que lo utilizan para la síntesis de ácidos nucleicos; como por ejemplo: ADN y ARN polimerasas, transcriptasa reversa y nucleósido fosforilasa. Dado que la replicación celular es clave para el funcionamiento del sistema inmunológico, la participación del zinc es primordial para que éste suceda correctamente. Sin embargo el mecanismo por el cual el zinc influye en el sistema inmunológico no sólo se limita a funciones enzimáticas sino que resulta más complejo (Rink y Gabriel 2000).

El zinc es un componente esencial de muchas proteínas involucradas en la defensa ante el estrés oxidativo y en la reparación de daño al ADN

involucrando a p53 y a la poli ADP ribosa polimerasa (Ho 2004). El zinc tiene esta función de defensa ante radicales libres a través de la superóxido dismutasa CuZn (SOD) y en niveles bajos se presenta un mayor daño oxidativo e interferencia en la reparación del material genético. (Ho 2000 , Oteiza 2001) El elemento se involucra en la estimulación de la NADPH oxidasa a través de su papel como cofactor de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y de la fosfolipasa C, también estabiliza el ácido araquidónico contra oxidación por complejos de hierro (Chandra 1997).

Debido a que no todas las manifestaciones clínicas ocasionadas por la falta de zinc pueden explicarse por la alteración o ausencia de varias enzimas, se ha propuesto que deben existir interacciones, probablemente entre el zinc y el genoma que expliquen las manifestaciones clínicas de la deficiencia del metal.

Los efectos de la deficiencia de zinc sobre la síntesis de ADN y ARN de varios tejidos indican una estrecha relación entre el metal y el metabolismo de los ácidos nucleicos, lo cual se ha visto reforzado con la demostración de que varios factores de transcripción requieren al zinc como factor. Se calcula que más de 2000 factores de transcripción tienen requerimientos estructurales de zinc para unión de ADN, lo que le da un papel crítico en la expresión génica (Vallee 1995).

Los denominados “dedos de zinc” o “zinc fingers” son dominios constituidos por 30 residuos de aminoácido que interaccionan con el ADN en secuencias de base específica promoviendo el inicio de la transcripción. Algunas proteínas con “zinc fingers” son por ejemplo las que participan: a) en señales

de transducción, las proteínas CRAF-1 y CAP-1 a través de su unión a CD40 en linfocitos B; b) en transporte, las proteínas transportadoras de zinc, CRIP; c) como factores de transcripción, el factor para metalotioneínas, MTF-1; d) en malformaciones fetales, la mutación sobre el gen murino Krox 20 que codifica para una secuencia “zinc finger” genera defectos en el desarrollo del cerebro (Williams 1995).

### **2.1.2 Absorción, transporte y excreción del zinc**

La ingestión diaria recomendada es de 8 a 11 mg/día de zinc elemental. (*Food and Nutrition Board, IOM 2001*). Sólo se absorbe un 30% a 40% del zinc ingerido, esta absorción depende de la fuente de obtención del micronutriente. El zinc que proviene de alimentos de origen animal es absorbido mejor que los de origen vegetal por que los fitatos y las fibras que contiene estos últimos capturan el metal en el lumen intestinal. La capacidad de absorción del elemento disminuye también con la edad y se ve alterada por relación con otros metales como hierro y cobre (Cousins 1985, Boukaiba 1993).

La ingesta oral de zinc lleva a una absorción a lo largo del intestino delgado y una subsecuente distribución a través del suero, donde se encuentra unida principalmente a albúmina,  $\alpha$ -microglobulina y transferrina (Scott, 1983).

El zinc se absorbe a nivel del yeyuno, se ha propuesto que se transporta por medio de proteínas conocidas como CRIP (Proteínas intestinales ricas en cisteína). Estas proteínas contienen 77 residuos de aminoácido con 7

cisteínas y dos dedos de zinc, se localizan en el lumen intestinal y en células mononucleares (Bremner, 1995).

Los valores de zinc se ven afectados no sólo por deficiencia de zinc sino por múltiples factores que van desde la ingestión en la dieta, variación diurna, concentración de albúmina, hasta embarazo y falla renal (Brown 1998).

La eficiencia de la absorción también se modifica por la concentración del elemento en el organismo, cuando el nivel intracelular del metal aumenta, se activa el promotor de los genes para metalotioneínas (MT), quienes ligan al metal. En humanos se ha identificado una familia de multigenes de MT de alrededor de 15 miembros (Brambilia 1999).

Las MT son proteínas ubicuas, caracterizadas por un peso molecular bajo (6-7kDa), alto contenido de cisteína y habilidad acomplejante de metales. Éstas son proteínas de 61 residuos de aminoácido con un contenido de 25 a 30% de cisteínas, capaces de unir metales como cadmio, cobre, mercurio y zinc, por lo que se les ha atribuido la función de detoxificación y la de posibles reguladoras de los niveles intracelulares de zinc (Mesna, 1995). Así mismo, la oxidación de los residuos de cisteína puede alterar el número de tioles que unen iones metálicos, relacionando el metabolismo del zinc con las reacciones de óxido-reducción (Maret 2006).

Las metalotioneínas juegan un papel significativo en la homeostasis del zinc al acomplejar hasta el 20% del zinc intracelular (Tapiero 2003). Una MT puede unir hasta 7 iones de zinc. La regulación dinámica del zinc celular por las MT resulta de la síntesis de la apoproteína (MT sin cationes metálicos), en

respuesta a niveles elevados de zinc mediante la activación del MTF-1 (Factor de transcripción de unión a metales) (Laity 2007).

El contenido total de zinc en el cuerpo de un adulto sano es de aproximadamente 1.4–2.3 g de los cuales una gran cantidad se almacena principalmente en músculo y médula ósea (Prasad 2009). El zinc se encuentra en el suero en concentraciones de 10 a 24  $\mu\text{mol/L}$  (0.7-1.6ppm), 10 veces más concentrado en eritrocitos y hasta 250 veces más en leucocitos. En el plasma este metal se encuentra unido principalmente a la albúmina, a  $\alpha$  2-macroglobulina y una pequeña cantidad a aminoácidos en forma de quelatos (Beisel 1992).

La concentración de zinc como ión libre modula el grado de saturación de sus sitios de unión tanto para acciones catalíticas como estructurales. Esta concentración en sistemas biológicos se encuentra en un rango entre  $10^{-9}$  M en el citoplasma de muchas células hasta  $10^{-3}$  M en algunos organelos celulares (Mills, 1989).

El zinc intracelular está regulado por un eficiente control homeostático que evita la acumulación en exceso del metal. Este equilibrio está mediado por dos familias de proteínas: la familia de 14 proteínas importadoras de zinc (Zip; Zrt-, Irt-like proteins) y la familia de transportadoras de zinc (ZnT), 10 proteínas que expulsan zinc fuera del citosol. (Lichten y Cousins 2009) Estas mismas familias de transportadores también regulan la distribución intracelular del micronutriente al retículo endoplasmático, mitocondria y aparato de Golgi. Además, muchos tipos celulares de mamíferos también contienen estructuras vesiculares unidas a la membrana, zincosomas, que

secuestran grandes cantidades de zinc y lo liberan ante un estímulo, por ejemplo, de factores de crecimiento (Haase 2003 , Taylor 2008).

## ***2.2 El zinc en la salud***

Los elementos químicos que se encuentran en muy pequeñas cantidades se conocen como elementos traza y realizan funciones esenciales en las células. El zinc es un importante elemento traza necesario para las funciones de un gran número de metaloenzimas, síntesis de ADN, división y crecimiento celular, metabolismo membranal, desarrollo cerebral, entre otros. Cuando el requerimiento de 10 a 20 mg del micronutriente por día no se cumple, se pueden presentar una variedad de desórdenes, incluyendo problemas en embriogénesis y retraso de desarrollo, cáncer, infecciones, enfermedades de la piel y relacionadas con problemas de reparación de tejidos (Barceloux 1999, U.S. Department of Health 2003.) Se estima que solamente un 40% de adultos mayores en EEUU consumen una adecuada cantidad de zinc (Briefel 2000).

En deficiencia de zinc se tienen consecuencias en el funcionamiento del sistema inmune, en la inducción de apoptosis y en la pérdida del mantenimiento de la autofagia (Lee y Cho 2009). En su estado libre, el metal se regula por 14 distintos importadores (ZIP) y transportadores (ZNT1-8) del zinc (Zhao y Eide 1996). Existe una regulación positiva de los ZIP en células cancerosas, las cuales sobreviven al contar con niveles incrementados del elemento. (Murakami 2008).

Por lo anterior, es necesario conocer más sobre la regulación de los niveles de zinc en la promoción de supervivencia inmune y también inducción de apoptosis tumoral.

### **2.2.1 Deficiencia de zinc**

Las reservas de zinc en el organismo están en un equilibrio muy precario. La falta del elemento en la dieta ocasiona una rápida disminución en el nivel plasmático. La deficiencia severa de zinc está asociada a una variedad de estados patológicos que incluyen desde pérdida de cabello y discapacidad de cicatrización hasta hipogonadismo, crecimiento retardado y deterioro de inmunidad (Prasad 1995).

Las respuestas inmunológicas más afectadas son: la inmunidad celular, la fagocitosis, el sistema de complemento y la producción de anticuerpos. Fraker et al (1986) fueron de los primeros investigadores en informar que los ratones adultos alimentados por dos semanas con dietas deficientes en zinc, tiene números reducidos de linfocitos T y B en sangre periférica y en bazo y en la cantidad de macrófagos reducidos hasta un 50%. Algunos datos basados en ensayos que miden la producción de anticuerpos *in vitro* sugieren que el efecto primario de la deficiencia de zinc es la deleción de linfocitos, sin pérdida de la funcionalidad en las células sobrevivientes (Prasad 1994).

La falta del nutriente ocurre como resultado de síndromes de malabsorción y otros padecimientos gastrointestinales, enfermedades crónicas renal y hepática, anemia falciforme, alcoholismo, fibrosis cística, insuficiencia pancreática y artritis reumatoide (Prasad 1985, Dutta 1998, Fraker et al 2000, Bhutta 2000, Brown 2002). Además se ha asociado un estado de

deficiencia secundaria de zinc a enfermedades como síndrome de Down, SIDA, anemia falciforme y algunos cánceres (Wang 1994).

La hipozinqueia puede deberse a un secuestro del metal llevado a cabo por los hepatocitos, células de la médula y glándula tímica, esto como consecuencia de su participación en la respuesta de fase aguda en un proceso inflamatorio durante infecciones generalizadas, traumas o endotoxemia. En estos órganos (hígado, médula ósea y timo) se une a las metalotioneínas, cuya síntesis a su vez se promueve por la presencia de las citocinas IL-1, IL-6 y TNF (Brambilla y Lozano 1999). De la misma manera, la pérdida de nitrógeno corporal que se presenta durante las reacciones febriles y traumatismos severos también ocasiona baja en zinc corporal (Beisel 1982).

La deficiencia severa de zinc puede no sólo ser adquirida sino heredada. La forma heredada más severa es la acrodermatitis enteropática, un desorden metabólico recesivo autosómico resultante de la mutación del transportador intestinal ZIP4 (Wang 2002).

La deficiencia severa de zinc se definió a principios del siglo pasado como una condición caracterizada por baja estatura, disfunción cognitiva, anorexia, problemas de la piel, hipogonadismo y función inmune dañada. Mediante el análisis de datos sobre disponibilidad alimentaria, la OMS estima que la deficiencia de zinc afecta a un tercio de la población mundial, mayormente en su presentación leve a moderada. En países en desarrollo se estiman más de 2 mil millones de personas que la padecen (Prasad 1991, OMS 2002, Wuehler 2005).

La falta del nutriente es responsable del 16% de las infecciones del tracto respiratorio inferior, 18% de la malaria y el 10% de enfermedad diarreica. En conjunto la cantidad de muertos que se le atribuyen se acercan a 1.4% o sea 0.8 millones (Prasad 1991, OMS 2002).

### **2.2.2 Evaluación del status del zinc**

Existen diversas maneras de evaluar el estado nutricional de zinc en una persona, entre los métodos que han sido utilizados se encuentran: la medición de la concentración de zinc en pelo y orina, la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos, la agregación plaquetaria y la más común, la determinación de la concentración en suero y plasma mediante espectrofotometría de absorción atómica. Las variaciones en la concentraciones del elemento que no dependen de la ingesta generalmente se atribuyen a: la variación diurna, post prandiales, embarazo, leucemia, falla renal o albuminemia (Grider 1990).

Se conocen pocas metodologías para el análisis de rutina de elementos traza que permitan tanto la valoración de deficiencias como el control de los niveles a o largo de un tratamiento con suplementos.

En las últimas dos décadas los índices de laboratorio más utilizados para valorar el status del zinc son la determinación sérica del elemento, la excreción urinaria, la concentración de fosfatasa alcalina sérica, el contenido de zinc en leucocitos y pelo, la prueba del gusto y metalotioneínas en glóbulos rojos. Esta última metodología se debe a que la expresión de las MT es menos sensible al estrés y la infección, comparada con las MT

plasmáticas que se ven afectadas por la presencia de endotoxinas (Grider 1990).

Pruebas de evaluación de zinc:

- Test del sabor (Prueba Oral): Se sabe que el gusto y el olfato son dependientes de una suficiente cantidad zinc en el cuerpo, por lo que al dar al paciente una solución de prueba estándar de sulfato de zinc (1mg /L) se busca deficiencia del elemento al no contar con una sensación de sabor específico. La prueba puede resultar subjetiva y hasta ser afectada, por ejemplo, por sabores de interferencia que surgen en pacientes con amalgamas de mercurio.
- Zinc sérico: Es la más simple de las pruebas pero presenta inexactitudes altas causadas por variaciones diurnas de la concentración, las fluctuaciones después de las comidas, aumento después de ayuno, el estrés, el embarazo, ciertas neoplasias, insuficiencia renal, las concentraciones bajas de albúmina. El análisis de la muestra de sangre (min 250µL) se realiza por espectroscopia de absorción atómica con un rango de referencia de 70-150 µg/dL. Una concentración por debajo de 46µg/dL es indicativa de una deficiencia severa.
- Zinc plasmático: Es la prueba principal pero es insensible a la deficiencia marginal por lo que surgen falsos negativos a la misma. Los niveles plasmáticos de zinc pueden ser influenciados por hipo o hiperproteinemia, infecciones agudas, el estrés, el tiempo de muestreo (relación a ingesta de alimento o suplementos), embarazo,

enfermedad hepática, enfermedades malignas y anemia perniciosa. El rango óptimo de zinc en plasma es 13.8 - 22.9  $\mu\text{mol} / \text{L}$  (90-150  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ). Los signos clínicos de la deficiencia de zinc puede producirse cuando las concentraciones plasmáticas de zinc se encuentran por debajo de 65  $\mu\text{g}/\text{dL}$ . Valores por debajo de 33  $\mu\text{g} / \text{dl}$  están particularmente asociados con la pérdida de los sentidos del gusto y del olfato, dolor abdominal, diarrea, erupciones en la piel y pérdida de apetito.

- Prueba de tolerancia a zinc: Esta prueba mide los cambios en el plasma después de zinc administrado oralmente. Una respuesta normal es el aumento de la concentración de zinc plasmático al doble a las 3 h, pero esto varía de persona a persona.
- Zinc en pelo: la capacidad de mantener un control estricto sobre la presencia de zinc en algunos productos para el cabello permiten hacer de este test uno con poca interferencia. Una muestra de pelo de 0.5 g arroja valores normales de 150 - 240  $\mu\text{g}/\text{g}$ . Los niveles de menos de 70  $\mu\text{g}/\text{g}$  sería indicativo de la deficiencia de zinc.
- Excreción urinaria de zinc: De nuevo, esto es una prueba poco fiable pues los resultados están influenciados por diversos factores como la quelación del metal y excreción aumentada en catabolismo generalizado. Un rango normal de excreción es de 3.3 a 21.4  $\mu\text{mol}/24$  h.
- Fosfatasa alcalina en suero (reactivación enzima): Como esta enzima contiene zinc una actividad baja es indicativa de una deficiencia de zinc.

- Contenido leucocitario de zinc: Los leucocitos podrían ser considerados mejores indicadores de los niveles de los elementos traza que los eritrocitos, el plasma o el suero, porque son células nucleadas homogéneas, además de ser metabólicamente más activas por tener un mayor intercambio de minerales que los eritrocitos y por su estrecha relación con el sistema inmunológico (Hinks 1982).

### **2.2.3 Uso de suplementos**

La frecuencia de la deficiencia marginal y moderada de hierro y zinc en humanos ha servido para el desarrollo de metodologías de suplementación con estos metales traza solos o como adyuvantes para prevenir, atenuar y tratar enfermedades infecciosas. Sin embargo, se tiene que cuidar el desbalance ante cantidades excesivas de metales redox-activos que puedan provocar daño inducido por radicales libres o servirle a microorganismos infecciosos para su supervivencia y replicación en el huésped.

En los pacientes con nutrición parenteral se recomienda utilizar suplementos de zinc y así propiciar el equilibrio de la concentración del nutrimento en suero, orina, pelo, eritrocitos, enzimas y leucocitos (Peretz 1993).

Los síntomas provocados por la falta de zinc pueden ser revertidos entre el segundo y tercer día de terapia con una cantidad adecuada del elemento. Como ejemplo significativo está la recuperación de las respuestas funcionales de los linfocitos T como la hipersensibilidad tardía y actividad citotóxica (Golden 1978).

Las dosis recomendadas para ser utilizadas en adultos son de 765 a 2100 mmol/día (aproximadamente 20mg) por vía oral y de 75 a 300 mmol/día por

vía intravenosa. El ajuste de estas dosis debe considerar la presencia de grandes pérdidas del nutrimento a través del tracto gastrointestinal o por excreción urinaria en consecuencia de un catabolismo severo. El incremento en la ingesta de zinc requiere ser acompañado de cobre (2–3 mg) y manganeso (5–10 mg) (Ladefoged 1983).

Las dosis farmacológicas indicadas en la suplementación pueden ser inmunoestimuladoras en el caso de deficiencia del zinc, pero también se ha visto que pueden producir una disminución en la concentración sérica de lipoproteínas de alta densidad (HDL), lo cual puede conllevar a un riesgo cardiovascular (Sandstead 1995).

En un estudio del efecto de la administración de dietilditiocarbamato de zinc sobre la respuesta a mitógenos de células T murinas y su inmunotoxicidad, se encontró que el compuesto es capaz de inhibir la respuesta proliferativa de células T y provocar citotoxicidad en las células esplénicas, en contraste con los efectos inmunopotenciadores ocasionados por el dietilditiocarbamato de sodio (Renoux, 1988).

Lo anterior sugiere que cantidades moderadas de zinc pueden ser utilizadas sin riesgo alguno, sin embargo la administración de cantidades elevadas por periodos prolongados puede provocar alteraciones en el sistema inmunológico del organismo expuesto.

#### **2.2.4 Exceso de zinc**

Aun cuando la frecuencia de la deficiencia de zinc y la variedad de las manifestaciones clínicas representan un problema más serio de salud

nutricional, los efectos tóxicos del elemento deben ser estudiados y prevenidos.

El zinc es considerado como un suplemento no tóxico particularmente cuando se ingiere por vía oral, sin embargo pueden presentarse síntomas de intoxicación en el organismo, como dolor abdominal, indigestión, náusea, vómito, úlceras, escalofríos, fiebre, dolor de garganta y debilidad (U.S. Department of Health and Human Services, 2003; Barceloux, 1999).

Existe poca información sobre la biodisponibilidad de los diferentes suplementos de zinc en la presencia de inhibidores de la absorción del elemento en la dieta, por lo que la cantidad y frecuencia de dosificación no está realmente controlada. Esto aunado al hecho de que los pacientes que toman suplementos por lo general no acuden a un seguimiento estricto y comúnmente consumen mayores cantidades del metal y durante periodos muy largos de tiempo.

Se han realizado estudios en humanos de los efectos producidos por dosis altas del elemento, las cuales demostraron que la administración de 300mg/día, cantidad 20 veces mayor a la ingesta diaria recomendada, producían alteraciones en la relación LDL/HDL. El uso prolongado de suplementos de zinc entre 50 y 300 mg/día ha sido a su vez asociado a leucopenia, neutropenia, anemia sideroblástica, deficiencia de cobre (afectando actividad de las enzimas SOD y ceruloplasmina), alteraciones del metabolismo de lipoproteínas y una función inmunológica afectada (Sandstead 1995).

El zinc es considerado como relativamente no tóxico para humanos (Fosmire 1990). Según la base de datos Toxnet (U.S. National Library of Medicine 2010) la LD<sub>50</sub> oral para zinc es cercana a 3 g/kg de peso, más de diez veces mayor a cadmio y 50 a mercurio. El exceso de zinc causa disfunción inmunológica y especialmente efectos adversos en la función de inmunidad celular como es la acción de las Th1 (Prasad, 1998).

Una sobrecarga de un metal traza suprime el funcionamiento de las células inmunes e incrementa el riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas. Algunos de los procesos afectados ante exceso de hierro son: las actividades bactericidas y antitumorales de células fagocíticas, la citotoxicidad de células NK, los perfiles fenotípicos de subpoblaciones de linfocitos T, la capacidad proliferativa y actividad de células CD4 y la reactividad de células T a mitógenos (Kuvibidila 1998, Walker 2000).

Reinhold et al muestran que la concentración de zinc 0.5mM (45mg de la dosis diaria de sal de zinc) puede tener un efecto tóxico sobre las células del sistema inmune. Caracterizada por alteraciones en la respuesta estimuladora de linfocitos, la quimotaxis y fagocitosis bacteriana de PMN y la función de monocitos (Chandra, 1984). Wellinghausen et al citan que la concentración tóxica para linfocitos T se encuentra entre 96 y 128  $\mu$ M y para monocitos de 38 a 512  $\mu$ M (Reinhold, 1999, Wellinghausen, 1997).

En diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se ha observado que el exceso del metal es capaz de reducir los distintos tipos de toxicidad mediada por células T y NK, y también puede afectar el desarrollo del sistema inmunitario. En modelos murinos la exposición a una ingesta excesiva de zinc

(2000ppm) ocasionó una disminución en el número de CFA, sin alterar el porcentaje de células B ni la respuesta a mitógenos. También se provocó una deficiencia secundaria de minerales, cobre sérico y hematocrito. Las cantidades elevadas de zinc (5000ppm), en la dieta de ratones provocan una reducción significativa en la respuesta citotóxica en contra de células tumorales (Mulhern, 1985).

A diferencia de otros metales, el zinc no es considerado como agente cancerígeno, pero su depleción afecta la reparación de ADN y puede formar parte de un desarrollo neoplasmático junto con cadmio, cobalto, níquel y arsénico (Beyersmann 2008).

Los niveles de zinc en adenocarcinoma prostático se observan bajos por la regulación negativa del transportador Zip1, implicando al zinc en la patogénesis y progresión de la enfermedad (Costello 1999, Franklin 2005). Se ha demostrado que la suplementación con zinc en dosis de hasta 100mg/día no aumentaron el riesgo de padecer cáncer de próstata, sin embargo la suplementación prolongada la aumenta 2.9 veces (Leitzmann et al 2003).

### ***2.3 El zinc y el sistema inmunológico***

Se han estudiado por varias décadas los mecanismos inmunológicos por los cuales el zinc modula el incremento a la susceptibilidad a infecciones y está claro que afecta múltiples aspectos del sistema inmune, desde las barreras de la piel hasta la regulación genética de los linfocitos. Muchos de los efectos del zinc sobre mediadores inmunológicos claves radican en los innumerables efectos del metal sobre las funciones celulares básicas tales como la

replicación de ADN, transcripción de ARN y división y activación celulares (Prasad 1998).

Las modificaciones en la concentración intracelular de zinc participan en la transducción de señales en células inmunológicas mediante la regulación de la actividad de importantes moléculas de señalización (Csermely 1989) .

Uno de los efectos más significativos de la deficiencia de zinc es la afección en la función de linfocitos T. La timulina es una hormona secretada por las células epiteliales del timo y es esencial para la diferenciación y función de los linfocitos T, utiliza al zinc como cofactor y por eso la forma libre inactiva de éste lleva a una expresión alterada de genes provocando un desbalance de las funciones periféricas de las poblaciones Th1 y Th2 (Haase y Rink 2009, Saha y Hadden 1995).

La influencia del zinc en el sistema inmunológico ha sido probada en el desarrollo de células T en casos de atrofia tímica (Fraker et al 1995; Osati-Ashtiani et al 1998). El zinc es un cofactor esencial de la timulina, quien induce la producción de marcadores de diferenciación en linfocitos T inmaduros (Saha y Hadden 1995). Otros modelos experimentales también han demostrado que la deficiencia de zinc está asociada a trastornos como involución tímica, disminución en la producción de timopoyetina y timosina, disminución en el número de linfocitos en órganos linfoides, principalmente en áreas T, y linfopenia (Beisel 1992).

La deficiencia del metal en animales causa atrofia tímica y linfoide así como también afecciones en las reacciones de hipersensibilidad cutánea mediada por células. En estudios realizados por Iwata et al los linfocitos aislados de

animales con deficiencia de zinc no mostraron una respuesta ante estimulación con fitohemaglutinina (PHA) ni producción de anticuerpos dependiente de células T, tampoco se apreció una función adecuada de linfocitos cooperadores, supresores, citotóxicos ni de células NK (Iwata et al. 1979).

La acrodermatitis enteropática se presenta ante una grave deficiencia de zinc y en pacientes que la padecen se han observado alteraciones en la respuesta inmunológica relacionadas con la disminución en el número de linfocitos T y B y con daño en la función de los neutrófilos. La suplementación con el mineral permite estabilizar rápidamente estas poblaciones celulares (Good, West y Fernandes 1980).

La deficiencia de zinc disminuye la producción de citocinas de células Th1 como IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$ , inhibiendo su capacidad funcional. Por otra parte, la producción de citocinas relacionadas a la población Th2, como IL-4, IL-6 e IL-10, no se ve afectada. El desbalance de la proporción Th1/Th2, la baja en el porcentaje de células T citolíticas y el reclutamiento disminuido de células T inmaduras son responsables de la desestabilización funcional inmunológica en sujetos deficientes del elemento (Beck y Prasad 1997).

La deficiencia de zinc tiene un efecto notable sobre todos los componentes del sistema inmunológico, éste puede ser funcionalmente significativo ocasionando un aumento en la susceptibilidad a infecciones por organismos oportunistas. El impacto también se refleja sobre la anatomía de los tejidos linfoides, dependiendo de la severidad y duración de la deficiencia se puede observar hipoplasia de timo, bazo, nódulos linfáticos, placas de Peyer y otros

tejidos linfoides intestinales. La progresión de las afecciones es indicativa de atrofia. En diversos modelos experimentales con ratones la falta del metal ocasiona alteraciones en la actividad de las células NK, linfocitos T citotóxicos y Thy1.2+(Beisel 1982, Fraker 1986, Sherman 1992).

La deficiencia marginal de zinc ha mostrado una relación normal de células T/B en el bazo, sin cambios notables en subpoblaciones de linfocitos que comprenden ambas células, pero con una deficiencia severa del elemento se produjeron alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos T y disminución relativa en la cantidad de células B (King y Fraker 1991).

Asimismo se encuentra una respuesta DTH disminuída, disminución de linfocitos CD4+, disminución de la actividad de células Th y NK, daño en el número y función de macrófagos y afecciones en la respuesta inmunológica humoral. La proliferación de linfocitos T inducida con mitógenos y la producción de IL-2 se encuentran disminuidas pero se mantiene una relación T/B normal (Fraker 1986, Renoux 1988).

Durante la respuesta de fase aguda inflamatoria los niveles de zinc plasmático disminuyen drásticamente, posiblemente por secuestro del elemento en órganos como hígado, médula ósea y timo, donde se une a las MT, estimuladas por la IL-1, la IL-6 y el TNF (Brambilia y Lozano 1999).

Existen evidencias que los iones de zinc son capaces de inhibir la apoptosis; se ha propuesto que se debe a la inducción de la proliferación pero se encontró que el contenido de ADN se mantiene sin progresar las células a través del ciclo celular, deteniéndose en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Treves 1994).

### **2.3.1 El zinc “*in vitro*”**

La importante participación del zinc en el sistema inmunológico incluye la habilidad de influir en la producción y señalización de diversas citocinas inflamatorias en varios tipos celulares (Kruse-Jarres 1989, Zhou 2010).

Las citocinas son mensajeros claves de las células inmunológicas y regulan múltiples actividades de sus funciones. Sus efectos son mediados a través de sus receptores correspondientes sobre las células blanco. Varios estudios en humanos y animales muestran que la malnutrición protéico-energética disminuye la producción de citocinas.

Los linfocitos T CD4+ se dividen principalmente en dos grupos funcionales dependiendo de su patrón de secreción de citocinas. Las Th1 están relacionadas con la respuesta inmunológica celular y secretan IL-2, IFN- $\gamma$  y linfoxina, y las Th2 están involucradas en la inmunidad humoral y secretan: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 y IL-13 (Shankar y Prasad 1998, Shi et al 1998).

Un gran número de estudios han medido la producción de citocinas inflamatorias en respuesta a deficiencia y suplementación con zinc en células estimuladas. La administración *in vitro* de sales de zinc ( $ZnCl_2$  principalmente) a los cultivos de células humanas de sangre periférica y de animales de experimentación, puede modificar la respuesta inmunológica celular y humoral. Se ha observado que la administración de  $ZnCl_2$  en un rango muy estrecho de concentración, resultó ser mitogénico para las células de nódulo linfático de hámster, sin embargo tuvo poco efecto sobre esplenocitos y timocitos. La estimulación máxima ocurrió con la concentración de 0.01mM y también ésta se incrementó en muestras con lipopolisacáridos (Hart 1978).

Los estudios sobre los cambios de concentración de zinc *in vitro* han proporcionado evidencias de su participación en la respuesta inmunológica. En experimentos con esplenocitos cultivados en presencia de cloruro de zinc 0.1 mM, se encuentra un aumento en la proliferación y longevidad de los linfocitos T; el análisis fenotípico ha demostrado que proliferan principalmente las células Thy 1.2+ y se induce la entrada de linfocitos L3T4+ y Lyt 2+ al ciclo celular. De igual manera, se ha demostrado que a concentraciones desde 0.1 a 1mM de zinc *in vitro* se ejerce un efecto supresor sobre la producción de CFA en linfocitos murinos (Warner y Lawrence 1986).

Las respuestas mitogénicas de linfocitos T se ven disminuidas ante la deficiencia de zinc, ya que éste se requiere para la proliferación de estas células en respuesta a la IL-1, PHA, ConA e IL-2 (Shankar y Prasad 1998).

La suplementación con dosis elevadas de zinc ( $\approx 7$  veces mayor a la IDR) *in vitro* inhiben las funciones de linfocitos T y reducen la producción de IFN- $\alpha$ . Los efectos inhibitorios del zinc pueden resultar en nuevas herramientas terapéuticas en las terapias de inmunosupresión para enfermedades autoinmunes mediadas por células T, como la artritis reumatoide o la enfermedad postransplantaria de injerto contra huésped (Kara et al 2011).

Los efectos del zinc sobre las monocinas son el resultado de la interacción directa entre el metal y estas moléculas, mientras que la estimulación linfocitaria es consecuencia de un efecto indirecto mediado por la secreción de monocinas inducida por zinc. La estimulación de linfocitos por las monocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 provoca una secreción detectable de IFN- $\gamma$  ante una interacción intercelular (Wellinghausen 1997).

En un modelo experimental humano realizado por Beck et al se informa que durante deficiencia de zinc la producción de IFN- $\gamma$  está disminuida mientras que la de IL-4, IL-6 e IL-10 no se afectan. Se propone que esta condición contribuye al desequilibrio en la funcionalidad de Th1 y Th2 resultando en la disminución en la resistencia a infecciones (Beck, Prasad y Kaplan 1997). La deficiencia de zinc ha demostrado provocar una disminución en la producción de IL-1, IL-2, IL-4 e IFN  $\gamma$  (Fraker et al 2000).

En otros modelos de deficiencia de zinc *in vitro* se ha encontrado que la integridad de la membrana celular está comprometida y también que la secreción de IL-8 y trans migración de neutrófilos está aumentada (Finamore et al 2008).

Unos estudios clínicos donde se midieron las concentraciones de citocinas en plasma y producción de citocinas en células sanguíneas humanas muestran información importante para conocer los efectos del zinc en el sistema inmunológico. Una suplementación con  $\geq 45$  mg zinc/día disminuye los niveles de proteínas mRNA de citocinas proinflamatorias en células mononucleares estimuladas *ex vivo* (Prasad et al 2004, Bao et al 2010).

Por otro lado, las concentraciones elevadas de citocinas se han mostrado en células mononucleares estimuladas aisladas de poblaciones suplementadas con  $\leq 20$  mg zinc/día sugiriendo una respuesta dosis dependiente de zinc (Aydemir 2006, Sandstead et al 2008, Kahman et al 2008).

Las mediciones de citocinas plasmáticas en respuesta a la suplementación exhiben un comportamiento dependiente de la dosis también, las concentraciones de IL-6 circulante están disminuidas con suplementación de

45 mg/día pero aumentadas cuando la dosis es de 10 mg zinc/día (Mariani et al 2008, Bao et al 2010).

Se ha observado en un modelo de trasplante *in vitro* que el zinc inhibe específicamente la aloreactividad en la reacción el cultivo mixto linfocitario (MLC) después de un tratamiento con 50  $\mu$ M de zinc (Campo y Wellingshausen 2001). Una inhibición similar fue observada cuando el MLC fue realizado *ex vivo* con células de individuos que recibieron 80 mg de zinc/día durante una semana, indicando que la suplementación elevada (7 veces mayor a la IDR) tiene el potencial de suprimir la respuesta inmunológica alogénica (Faber et al 2004).

El zinc *in vitro* es un activador policlonal de linfocitos B humanos de sangre periférica, bazo y ganglios linfáticos, sin embargo estos efectos pueden ser secundarios a la activación de linfocitos T cooperadores (Shankar y Prasad 1998). Desde 1977 Chvapil et al informaron que las concentraciones altas de zinc *in vitro* inhiben la activación de los macrófagos, la movilidad, la fagocitosis y el consumo de oxígeno (Chvapil 1977).

Se ha visto que el zinc tiene un efecto en la respuesta proliferativa de las células esplénicas frente a mitógenos policlonales: ConA (concavalina A) y PHA (fitohemaglutinina). Se encontró que la administración de 0.1mM de  $ZnCl_2$  inhibe la proliferación de linfocitos de ratones C57BL/6 (bajos respondedores); en cambio las concentraciones de 0.01 a 0.001mM no modificaron la respuesta proliferativa con dosis subóptimas de mitógeno. La adición del metal a cultivos celulares de ratones BALB/c (que son altos respondedores) no provocó alguna modificación en su respuesta a los

mitógenos (Malavé 1984).

En cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica estimulados con 0.1mM de ZnCl<sub>2</sub> se estimuló la aparición de receptores para IL-2 y para transferrina (TrR) (Malavé et al 1990). La línea de células humanas HUT-78 estimulada con PHA y con PMA mostró niveles más elevados de mRNA de IFN-γ en condiciones de suficiencia comparadas con la condición de deficiencia. En células T humanas Jurkat estimuladas con PHA y con PMA, una suplementación con 50 y 100 μM de zinc redujo significativamente la expresión de mRNA de IFN-γ sin afectar la viabilidad. Por lo anterior se concluye que en condiciones inflamatorias la expresión génica de IFN-γ se ve reducida en deficiencia y también en suplementación con el metal (Hayashi et al 2008).

En otros estudios se ha visto que los efectos inmunopotenciadores e inmunosupresores inducidos por los metales pesados, ocasionan fenómenos inmunopatológicos en numerosos tejidos. En muchos casos la alteración de la respuesta inmunológica está relacionada con la toxicidad de metales, presentándose con complejos inmunes y autoanticuerpos pero también incremento de proliferación *in vitro* (Smith y Lawrence 1986).

En otros cultivos celulares humanos de sangre periférica se ha visto la estimulación de secreción de TNF y de IL-1β por parte del zinc, sin embargo no se apreciaron modificaciones en la liberación de IL-6 (Scuderi 1990).

En células cultivadas en un medio de cultivo sin suero, las concentraciones muy altas de zinc (>100 μM) estimularon a monocitos a secretar citocinas

proinflamatorias pero también inhiben funciones de estos linfocitos (Wellinghausen 1996).

Los estudios realizados por Winchurch han mostrado que el zinc se requiere para la proliferación de los linfocitos T en respuesta a IL-1. Se ha visto que la producción y la respuesta a IL-2 por parte de las células T es inhibida por concentraciones de zinc que generalmente incrementan la producción de anticuerpos, lo que sugiere que los efectos inmunorestauradores del zinc en los cultivos de linfocitos animales son dependientes de la IL-2. Además la producción de IL-1 y la actividad de la IL-4 se vieron favorecidas con la presencia del metal (Winchurch, Togo y Adler 1987).

Al incubar las células con 15, 50 y 100  $\mu\text{M}$  con zinc, los niveles intracelulares del metal aumentan y se observa un crecimiento acelerado comparado con la condición de 1  $\mu\text{M}$ . En 50 y 100  $\mu\text{M}$  se registraron niveles menores de IL-2, IL-2R, TNF- $\alpha$  y NF $\kappa$ B (Bao 2006).

La regulación alterada de la expresión de IL-2 e IL-2R afectan la función de las células T. El TNF- $\alpha$  es una citocina proinflamatoria potente y es inducida por las células T como respuesta a un estímulo antigénico activándolas y provocando una regulación positiva de la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-2R (Porter 1990, Watts 2005).

Los iones de zinc inhiben la proliferación de la línea celular D10N de células T dependientes de IL-1 de manera dosis dependiente. A través de una técnica de inmunoprecipitación se reveló la inhibición específica de zinc sobre los receptores a IL-1 asociado a cinasa (IRAK) (Wellinghausen 1997).

Todos los estudios presentados anteriormente muestran la influencia tan importante del exceso de zinc en la función de células T observada en distintos estudios *in vitro*. La generación de microambientes de citocinas tan complejos indican que al relacionar datos experimentales de este tipo se mejorará el conocimiento sobre las afecciones linfocitarias potenciales.

### **2.3.2 La subpoblación celular Th17 y la interleucina-17**

Las células T CD4<sup>+</sup> efectoras son esenciales para inducir respuestas inmunes adaptativas eficientes mediante la producción de sus citocinas características. Existen cinco principales subpoblaciones diferenciadas de linfocitos T CD4<sup>+</sup>: Th1, Th2, Th17, Treg y TFH (células foliculares cooperadoras); cada una expresando citocinas y factores de transcripción característicos que dirigen la respuesta inmunológica y regulan la diferenciación de células implicadas (Wan 2010).

Las células Th1 son importantes para la protección en contra de patógenos intracelulares obligados, sin embargo actividades proinflamatorias exageradas por parte de esta subpoblación causan daño tisular y algunas enfermedades inflamatorias y de autoreactividad como la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad de injerto contra huésped, la diabetes insulino-dependiente y también la artritis reumatoide. Tanto el IFN- $\gamma$  como IL-12 han sido aceptadas como potentes inductores de la diferenciación de Th1.

Las células Th17 secretan interleucina 17 (IL17A e IL17F, ambos miembros de la familia de citocinas IL-17) y también IL-6, IL-21, IL-22 y TNF. Las células Th17 fueron generadas a partir de células T CD4 inmaduras en presencia de IL-6 y TGF  $\beta$ , quien induce la expresión del regulador

transcripcional ROR $\gamma$ t que se requiere para el desarrollo de la subpoblación. Estas células expresan el receptor de quimiocinas inflamatorias CCR6 y el receptor IL-23 pues su supervivencia es considerablemente promovida por IL-23 desde las células dendríticas y macrófagos (Bettelli y Korn 2007).

La IL-17 fue descrita en 1995 como una citocina proinflamatoria producida por los linfocitos T mediante su adición a fibroblastos, resultando en producción de IL-6 y otras moléculas proinflamatorias. La IL-17 participa en la inducción y maduración de neutrófilos, lo que indica su implicación en mecanismos de defensa del huésped. (Yao et al 1995). La población Th17 se caracteriza como se dijo por la producción de IL-17 y por jugar un papel crítico en la inducción y propagación de autoinmunidad. La expresión de IL-17 se asocia a enfermedades como la esclerosis múltiple, la psoriasis, la encefalomiелitis y distintas alergias (Langrish et al 2005).

La subpoblación Th17 aparece como parte de la respuesta de defensa del huésped en mucosas en modelos de ratón, protegiendo contra infecciones ocasionadas por bacterias extracelulares (Ferretti et al 2003, Romani 2011) pero bajo ciertas circunstancias también se ve involucrada en la patogénesis de desórdenes inflamatorios crónicos incluyendo algunos padecimientos de autoinmunidad. La IL-17 ha sido detectada directamente o a través de la presencia de su ARNm en el suero y el tejido de pacientes con lupus eritematosos sistémico, esclerosis sistémica, biopsias de desórdenes inflamatorios de intestino, dermatitis y psoriasis (Takabayashi y Iwamoto 2000, Fujino et al 2003).

Los datos que respaldan la participación de Th17 en la promoción de inflamación crónica y autoinmunidad son ya numerosos. Un modelo con ratón deficiente en la producción de IL-17 mostró menor infiltración de neutrófilos en infección con *Helicobacter pylori*. También se comprobó como la disminución en el receptor de IL-17 indicó susceptibilidad a neumonías bacterianas y a una incapacidad de formar abscesos abdominales. La amplia distribución del IL-17R se ha propuesto como la base para los mecanismo de inflamación y autoinmunidad causados por Th17 (Ye et al 2001, Sakamoto et al 2008).

La IL-17 tiene diversos efectos proinflamatorios, tanto de manera directa como a través de la amplificación de los efectos de la IL-1  $\beta$  y TNF- $\alpha$ . La IL-17 tiene la capacidad de inducir la expresión de otras citocinas inflamatorias y de estimular la secreción de eicosanoides de monocitos y sinoviocitos. Además, esta citocina ha sido asociada a la patogénesis en el daño inflamatorio óseo mediante la inducción de metaloproteinasas de matriz extracelular, osteoclastos y la inhibición de la síntesis de proteoglicanos (Infante-Duarte et al 2000).

Las células T de memoria productoras de IL-17 aisladas de ratón retienen su fenotipo Th17 aun cultivadas con IL-12 e IL-4. Sin embargo, se conoce que precursores de Th17 causan transición a células productoras de IFN- $\gamma$  *in vivo* en un modelo de transfección en ratones inmunodeficientes. Esto concuerda con estudios anteriores que muestran que las células polarizadas Th17 se convierten a Th1 en un modelo antígeno específico de inflamación ocular (Shi et al 2008, Lee et al 2009).

Se ha demostrado que la IL-17 activa la inducción de IL-6, IL-8 y G-CSF en células no inmunes como fibroblastos y células epiteliales. Asimismo, se sabe que los principales blancos genéticos de esta interleucina incluyen quimiocinas proinflamatorias, citocinas hematopoyéticas, genes de la respuesta de fase aguda y algunas sustancias antimicrobianas (Shen y Gaffen 2008).

La búsqueda de citocinas que estimulan *de novo* la diferenciación Th17 ha tomado gran importancia en la investigación. Aunque estudios *in vivo* indican el papel fundamental de la IL-23, se ha mostrado que *in vitro* es suficiente con la presencia de IL-6 y TGF $\beta$  para la inducción de la expresión de IL-17 en células T CD4 inmaduras (Veldehoen et al 2006, Betteli et al 2006, Mangan et al 2006).

La actividad concomitante de TGF- $\beta$  e IL-6 es necesaria para la iniciación de la diferenciación de la subpoblación Th17. Se ha demostrado que la IL-1 $\beta$  y el TNF $\alpha$  amplifican la respuesta Th17 inducida por ambos estimulantes de diferenciación, sin sustituirlos (Betteli et al 2006, Mangan et al 2006, Sutton et al 2006).

El TGF- $\beta$  y la IL-6 actúan de manera cooperativa y no redundante para promover la diferenciación, la cual lleva a una alta producción de IL-21 quien de manera autócrina promueve la proliferación de esta población. Por igual, los ROR (receptores nucleares huérfanos de ácido retinoico) son factores de transcripción clave para su diferenciación y promoción (Betteli et al 2006-2007, Nurieva 2007, Yang 2008).

El requerimiento de TGF- $\beta$  en la diferenciación de Th17 causó en un inicio controversia por la naturaleza antiinflamatoria de esta citocina al inducir y mantener a la población de células T reguladoras. (Veldhoen et al 2006) La regulación de diferenciación de Th17 depende del contexto y microambiente inmunológico, favoreciéndose en presencia de distintas citocinas inflamatorias a bajas concentraciones de TGF- $\beta$  y polarizando a Treg con altas concentraciones de éste. Con bajas concentraciones se observa también una acción inductora para la IL-17 ante la adición de IL-23 al cultivo celular murino (Zhou 2008).

Otros estudios recientes han demostrado que los linfocitos T cooperadores que requieren de la IL-23 para su diferenciación y secreción de citocinas proinflamatorias, no son células Th1 sino células mediadoras de respuesta inflamatoria en muchas de las enfermedades autoinmunes relacionadas a las Th1 (Cua et al 2003, Langrish et al 2005, Kulberg 2006).

Por otro lado la IL-23 se requiere *in vivo* para la generación de células Th17 patogénicas pero no necesaria *in vitro* para la inducción de las IL-17, IL-17F e IL-22. (McGeachy 2007) La expresión de la IL-22, considerada también como una citocina perteneciente a la población Th17, es inducida por IL-6 e inhibida por altas concentraciones de TGF- $\beta$  (Zheng et al 2007).

En los estudios sobre la regulación efectora de células Th17, se encontró que la estimulación de esta subpoblación por presencia de IL-6 y TGF $\beta$  resulta también en la producción de IL-10 concomitante a IL-17. De igual manera que sucede para las Th1, la producción de IL-10 es capaz de regular la inmunopatología de las Th17, hecho demostrado por la severidad reducida

observada al transferir células T estimuladas con IL-6 y TGF $\beta$  con células T patogénicas estimuladas con IL-23. La producción de IL-10 puede ser un mecanismo de autoregulación para controlar una respuesta potencialmente dañina por parte de las Th17 (McGeachy et al.2007, 2008).

La IL17, TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 no sólo promueven la inflamación sino que funcionan también como reguladores de las funciones de las células T. La utilización de inhibidores de la IL-17 pueden ser una manera de controlar la inflamación y de restaurar funciones regulatorias linfocitarias (Nadkarni y Mauri 2007). La aplicación de citocinas como blancos terapéuticos ha mostrado eficacia significativa como con el uso de anticuerpos monoclonales anti TNF. La eficacia de las herramientas en contra de IL-17 e IL-17R en conjunto con las de TNF han demostrado efectividad en modelos murinos y humanos de enfermedades inflamatorias (Chabaud y Miossec 2001). Los nuevos blancos de la vía intracelular de IL-17 continúan siendo también evaluados, como por ejemplo el ROR $\gamma$ t, IL-23 e IL-23R (Ivanov et al 2006, McGeachy 2008). En resumen, las funciones principales encontradas para la IL-23 son la expansión de las células Th17 diferenciadas (Oppmann et al., 2000), la producción mantenida de IL-17 (Langrish et al 2005) y también como factor de supervivencia para la población (Elson et al 2007).

Las interacciones entre el zinc y la autoinmunidad incluyen concentraciones alteradas del metal en suero en muchas enfermedades crónicas autoinmunes y la inhibición de éstas en modelos animales que utilizan la suplementación de zinc (Bhutta et al 2000, Fraker et al 2000).

Ya que la estimulación de las citocinas y los receptores TLR afecta los perfiles de expresión de los transportadores de zinc, se ha propuesto que las moléculas involucradas en inflamación y autoinmunidad, como el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), pueden estar involucrados en la señalización dirigida por zinc. EL desarrollo de las células Th17 está controlado por la activación de la STAT3 inducida por IL-6 (Ivanov et al 2006, Veldhoen et al 2006, Bettelli et al 2007) la cual cuenta con mecanismos de regulación muy sofisticados y pertinentes para muchas reacciones biológicas (Yasukawa , Sasaki y Yoshimura 2000).

Ante la estimulación de los receptores a citocinas inflamatorias, sucede la fosforilación de la STAT3, la cual ha sido demostrada como un factor importante para la inducción de ROR $\gamma$ t y de la expresión de IL-17 (Zhou et al 2007).

Se ha propuesto que la IL-23 puede estabilizar el fenotipo Th17 a través de mecanismos dependientes de STAT3 (Yang et al 2007; Zhou et al 2007), aunque IL-6 e IL-21 también comparten esta vía de señalización.

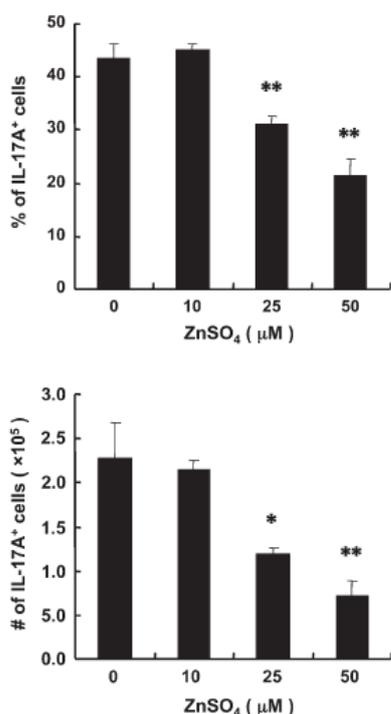
El tratamiento con zinc provoca la disminución en la concentración de IL-17 en suero mientras que las de IFN no se modificaron. Los experimentos *ex vivo* mostraron que el zinc suprime la IL-17 después de la activación de células T, al contar con menor número en células de la subpoblación Th17 y los niveles no afectados de las T reguladoras y las Th1 (Kitabayashi et al 2010).

Estudios preliminares mostraron que un medio de cultivo que contiene concentraciones menores a 120 $\mu$ M de ZnSO<sub>4</sub> no afecta la viabilidad de las células T CD4<sup>+</sup> de manera significativa. La utilización de concentraciones

mayores a 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$  para la experimentación *in vitro* resulta en una inhibición significativa del desarrollo de la subpoblación Th17 (Figura 1).

El metal inhibe la activación de STAT3 en células T CD4+ después de ser tratadas *in vivo* con IL-6. Estos resultados presentados por Kitabayashi et al muestran que la suplementación con el metal contribuye a la supresión del desarrollo de células Th17 *in vivo* desde células T CD4+ inmaduras mediante la inhibición del eje de señalización IL-6-STAT3 seguido de inhibición de desarrollo de la artritis inducida por colágeno (CIA) (Figura 2) (Kitabayashi et al 2010).

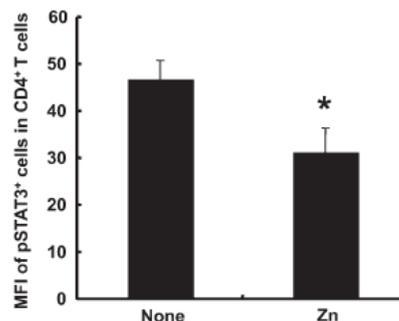
El tratamiento con zinc incrementa la inducción de la fosforilación de proteínas inducida por IL-6 (Kitabayashi et al 2010), lo cual confirma los estudios previos en donde se describe al zinc como inhibidor de tirosin fosfatasas (Haase y Maret 2005).



**Figura 1. Zn inhibe desarrollo de Th17 *in vitro*.**

Las células T fueron estimuladas con anticuerpos solubles anti-CD3, IL-6 y TGF $\beta$  en presencia o ausencia de  $\text{ZnSO}_4$ . 4 días después se tificaron las células intracelularmente después de su estimulación con PMA e ionomicina. Los histogramas representan la expresión de IL-17A en células T CD4+. El porcentaje y número de células Th17 fue menor en las células T CD4+ tratadas con Zn que en las no tratadas. (P = 0.47 para 10  $\mu\text{M}$ , P = 0.0026 para 25  $\mu\text{M}$ , P = 0.0008 para 50  $\mu\text{M}$ ).

**Figura 2.** Las células T fueron incubadas con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$  por 30 min y estimuladas con IL-6 por 5min. El histograma representa la expresión de pSTAT3 (fosforilado) en células T CD4+. El índice medio de fluorescencia (MFI) de las células pSTAT3+ fue significativamente menor en las condiciones de tratamiento con Zn. (P = 0.021) utilizando Student's t-test (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01).



### **2.3.2 Estudios del Laboratorio de Investigación en Inmunología**

En los trabajos llevados a cabo por la Dra. Ana Esther Aguilar y otros colaboradores y alumnos en el Laboratorio de Investigación en Inmunología (LII) de la Facultad de Química de la UNAM se han investigado desde hace varias décadas los efectos del zinc sobre el sistema inmunológico.

En un estudio del LII se vio que las dosis de 500 y 1000mg/L de zinc administradas por suplementación favorecen la respuesta humoral primaria incrementando CFA IgM. Estas dosis producen también incrementos en la respuesta proliferativa de linfocitos T estimulados con concanavalina A en gestación y lactancia. La exposición prolongada a estas dosis resulta en la disminución notable de la respuesta proliferativa de los linfocitos T a Con A. Concluyendo así que la administración de 500 y 1000mg/L desde gestación hasta postdestete resulta en la pérdida de la capacidad de respuesta proliferativa de linfocitos estimulados con zinc *in vitro*.

En 1994 en el LII el zinc fue probado como mitogénico con una máxima estimulación a 0.1 mM *in vitro* en animales control, pero para las muestras de animales con suplementación *in vivo* no hubo proliferación con la consecuente adición del metal *in vitro*. La concentración acumulada de la

suplementación sumada al estímulo *in vitro* puede resultar antiproliferativa por inhibición de enzimas encargadas de este proceso. Esto fue fundamentado por los resultados que muestran que con una estimulación diferente, con concanavalina A, si se presenta proliferación tras una suplementación con 500 ppm de zinc durante 21 días. Sin embargo para los animales de 42 días la suplementación si se afecta la proliferación, pero al adicionar zinc *in vitro* la proliferación se recupera.

Con una suplementación con 1000 ppm no se modifica ni recupera la proliferación. Esto sugiere que el límite toxico de zinc se ha excedido y el zinc en exceso no provoca ningún cambio. En este trabajo se concluyó que en suplementación *in vivo* con dosis moderadas del metal se presenta una baja respuesta linfoproliferativa frente a éste como mitógeno. La suplementación prolongada provocó acumulación en tejidos y aumento de la concentración de zinc a nivel plasmático.

Asimismo en el LII se han obtenido resultados que indican que la suplementación con zinc 500mg/L durante 6 semanas incrementó la concentración IL1 $\alpha$  en suero y en sobrenadante de cultivo de macrófagos estimulados con LPS. Para la suplementación de 9 semanas disminuyó la concentración de IL-1 $\alpha$  pero aumento la de TNF $\alpha$ .

En 2001, el equipo del LII publicó en el Journal of Parasitology un trabajo sobre cómo la suplementación con zinc permite el desarrollo de una respuesta inmunológica más eficiente en los primeros días después de una infección. Se estudió el efecto de la suplementación sobre cisticercosis murina en *Taenia crassiceps* en ratones susceptibles de la cepa BALB/cAnN.

Las determinaciones intracelulares de citocinas indican que con suplementación con el metal se favorece una respuesta de células T tipo 1 más fuerte y más persistente en ratones infectados con el microorganismo.

La resistencia aumentada inducida por la suplementación y la identificación de respuestas inmunes que participan en relaciones parásito-huésped fortalecen la posibilidad de obtener una respuesta de protección en contra de cisticercosis a través de la inmunización (Fragoso et al 2001).

Recientemente, en un trabajo de cuantificación de interleucina 17 con un EIA de doble anticuerpo se encontró que la suplementación con 500 mg/L de zinc por 9 semanas resulta en un decremento importante de la concentración sérica de la IL-17. Esto concuerda con la disminución de la población celular de linfocitos Th17 reportado por el grupo del Dr. Kitabayashi en 2010. Esta situación podría evitar posibles enfermedades de carácter autoinmune o de hipersensibilidad, e incluso podría tener un efecto benéfico en pacientes con cáncer y trasplantados. Al contar con un protocolo de citometría de flujo estandarizado como alternativa para experimentación y análisis de producción de citocinas, se podrán continuar e integrar los resultados e información generados en el LII.

### **3 Objetivos, Hipótesis y Justificación**

#### **3.1 Objetivos**

##### **General**

- Desarrollar un protocolo experimental que permita determinar el efecto de altas concentraciones de zinc sobre la diferenciación de las poblaciones de linfocitos Th murinos.

##### **Específicos**

- Habilitar y dar estructura a un protocolo que utilice la citometría de flujo para cuantificar la producción de interleucina 17 intracelular, IL-17.
- Estandarizar las condiciones experimentales adecuadas para lograr la identificación de la IL-17 intracelular en esplenocitos de ratones BALB/c AnN como indicador de la población de linfocitos Th17 ante concentraciones en exceso de ZnCl<sub>2</sub> *in vitro*.

#### **3.2 Hipótesis**

Al estar involucrado en diversas reacciones enzimáticas importantes para proliferación y diferenciación celular, el zinc tiene una importante influencia en el desarrollo de poblaciones linfocitarias. La adición de zinc *in vitro* ha mostrado influir en la producción de citocinas proinflamatorias en linfocitos T necesarias para la diferenciación característica de subpoblaciones Th, incluida la IL-17 para Th17. Las concentraciones elevadas del metal en estas células afectan la producción de esta interleucina, desfavoreciendo la polarización a la subpoblación Th17 y reduciendo el riesgo de autoinmunidad.

Para probar la Hipótesis, el Laboratorio de Investigación en Inmunología debe contar con un protocolo de citometría de flujo para tinción intracelular de citocinas cuyo diseño estará basado en la investigación bibliográfica recopilada, en las instrucciones del Kit BD Mouse Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit™ (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA cat. No.560758) y en las recomendaciones de los asesores de este proyecto. Al evaluar las diversas condiciones de preparación, tratamiento, tinción y análisis de muestras de cultivo primario de esplenocitos de ratón BALNc/AnN se podrá definir un diseño experimental definitivo de la técnica descrita en el Protocolo.

### **3.3 Justificación**

El presente trabajo es la parte inicial de una estrategia para implementar en el Laboratorio de Investigación en Inmunología (LII) de la Facultad de Química un Protocolo de citometría de flujo como herramienta alternativa de análisis y experimentación para los estudios sobre la influencia del zinc en el sistema inmunológico realizados en este Laboratorio, ahora mediante la tinción intracelular de citocinas.

Primeramente, la estructuración del Protocolo depende en su Etapa Preliminar de Organización de Recursos (EPOR) en donde se crearán las líneas de comunicación, contacto y colaboración que provean al LII de los materiales, los equipos, la infraestructura y la asesoría de expertos en la técnica.

Ya contando con los recursos y organización necesarios para proceder a la habilitación del protocolo se requieren estandarizar las condiciones

adecuadas para lograr la detección eficiente de la citocina intracelular, IL-17. Tanto la duración de la Estimulación para una polarización poblacional hacia Th17 como aquella de la Permeabilización para la tinción intracelular, conforman los dos puntos a ser definidos en la Primera Fase del protocolo y así establecerlos en el diseño experimental definitivo de la técnica en desarrollo. Las Fases consecuentes de Estandarización y demás etapas faltantes para la exitosa implementación de la técnica en el LII quedan abiertas a ser conformadas a partir de la información generada por este trabajo.

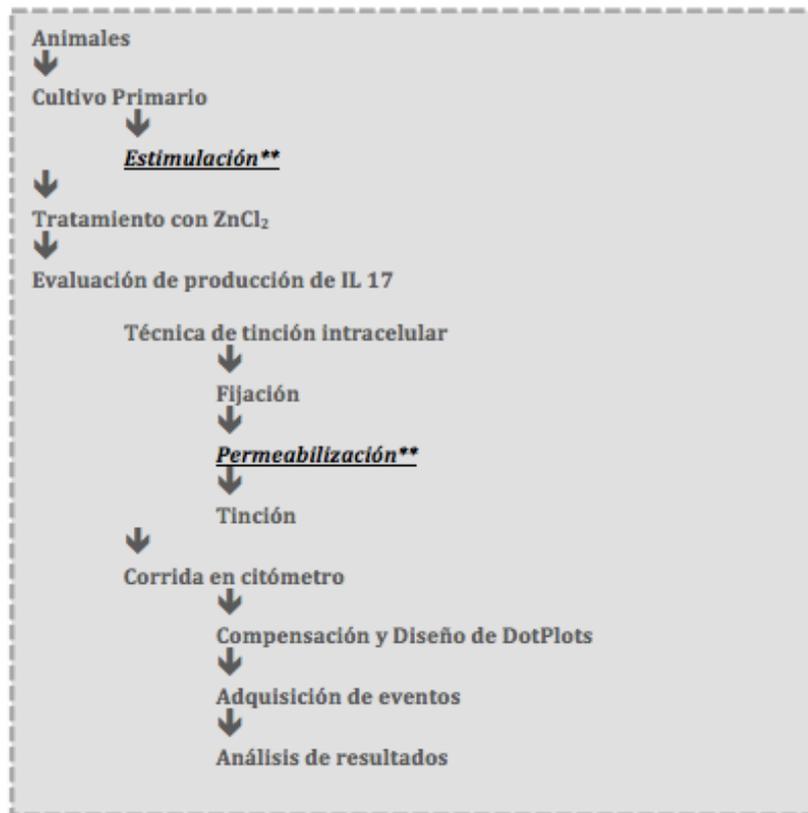
## **4 *Material y Métodos***

### **➤ Etapa Preliminar de Organización de Recursos (EPOR)**

Se buscarán los contactos necesarios para definir el presupuesto para la primera Fase de la Estandarización, elegir comprar el Kit de Tinción Intracelular más conveniente, encontrar el apoyo para la utilización de un citómetro que cumpla con los requerimientos de la técnica y el Kit, conseguir los reactivos y las moléculas necesarias para la Estimulación del cultivo primario y generar relaciones de colaboración con expertos en la técnica para aprovechar de su asesoría a través de los elementos de esta EPOR. Con el fin de dejar activos estos vínculos se creará un Directorio con la información importante correspondiente a los colaboradores.

➤ **Estandarización de las condiciones experimentales. Primera Fase.**

Figura 3. Esquema del Protocolo.



\*\*Condiciones a modificar en Primera Fase de la Estandarización.

## **Animales**

Se realizaron las cruzas adecuadas para contar con ratones de la cepa singénica BALB/c AnN, hembras adultos del bioterio del Laboratorio de Investigación en Inmunología (LII). Se mantuvieron en cajas de plástico con cubiertas de acero inoxidable y fondo de aserrín estéril. Se utilizaron botellas de vidrio con tapones de polietileno y bebederos de vidrio. Los animales se alimentaron *ad libitum* con alimento comercial 2018S HarlanTeklad Global Diets™ (Wisconsin, EEUU), en condiciones de temperatura constante (22-

25°C) y bajo un fotoperiodo de 12/12h. Los animales fueron manejados de acuerdo a lo permitido por el Comité de Bioética y fueron sacrificados en una cámara de vidrio con éter.

### **Cultivo Primario**

Medio de cultivo: Se utilizó RPMI 1640 c/ L-glutamina 200mM (cat.B0304AX, Thermo Scientific™ Lafayette, CO, EEUU ) suplementado con 10% de suero fetal bovino (cat. 16000-044, Gibco™ Life Technologies™, Carlsbad, CA, EEUU), aminoácidos no esenciales al 0.05% (Cat. R7131, Sigma-Aldrich™ St. Louis, MO, EEUU), piruvato de sodio al 0.05% (cat.S8636, Sigma-Aldrich™ St. Louis, MO, EEUU) y penicilina-estreptomicina al 0.1% (cat.15070-063, Gibco™ Life Technologies™, Carlsbad, CA, EEUU).

En la campana de flujo laminar con un juego instrumental estéril, se disectaron los ratones para exponer el peritoneo, localizar el bazo y extirparlo quirúrgicamente. El órgano se colocó en una caja de Petri con 1 mL de medio RPMI. Se perfundió cada bazo con 5mL de medio RPMI no suplementado con una aguja de 0,33 mm x 12 mm.

Lisis de los eritrocitos: se centrifugó la suspensión de esplenocitos (1500rpm por 10 min) y se resuspendió el pellet celular en 1-3 mL de buffer de lisis (**BLI**) (4°C) y se dejó en reposo durante máximo 1 minuto sobre hielo evitando dañar los linfocitos. Posteriormente se añadió 1ml de RPMI suplementado y centrifugó de nuevo.

Se contaron las células en un hemocitómetro por exclusión en azul de tripano para ajustar las muestras a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/mL.

### **Estimulación\*\***

Posteriormente se estimularon los cultivos primarios de esplenocitos para la inducción y caracterización de linfocitos productores de citocinas, con 50 ng/mL de PMA (Forbol miristato acetato) y 1  $\mu$ g/mL de ionomicina a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. Al terminar se adicionaron 1 ng/mL de TGF $\beta$  y 50 ng/mL de IL-6, esto como condición de polarización para subpoblación Th17. Debido a que en las referencias se encontraron distintas propuestas para la duración de la estimulación, para esta Estandarización Inicial dos tiempos diferentes fueron propuestos : Grupos LE= 22 h / LP= 8 h (Ver Tabla 1). Se utilizó también el inhibidor de transporte de proteínas BD GolgiStop™ (BDG) (4  $\mu$ l por cada 6 ml de cultivo) en momentos diferentes para cada grupo evitando su presencia en el cultivo por más de 12h. (Grupos LE= 11 h antes de continuar con experimento/ Grupos LP= junto con estimulantes).

Larga Estimulación (LE)	Larga Permeabilización (LP)
A) Control negativo de estimulación y tinción	E) Control negativo de estimulación y tinción
B) Control negativo de estimulación	F) Control negativo de estimulación
C) Triplicado Estimulado 22h / Permeabilizado 3h	G) Triplicado Estimulado 8h / Permeabilizado 12h
D) Triplicado Estimulado 22h / Permeabilizado 3h + Tratamiento ZnCl <sub>2</sub> 0.1mM	H) Triplicado Estimulado 8h / Permeabilizado 12h + Tratamiento ZnCl <sub>2</sub> 0.1mM
TOTAL: 8 ratones	TOTAL: 8 ratones

Tabla 1. Grupos para estandarización de condiciones experimentales Primera Fase : Larga Estimulación (LE) con mínima permeabilización y Larga Permeabilización (LP) con mínima estimulación.

## Tratamiento

La suspensión se centrifugó a 1000rpm por 10 minutos. Las células se recuperaron y lavaron 2 veces con Buffer de Tinción (**BT**). Se resuspendieron en 2mL de BT para depositar aproximadamente 1 millón de células (1/5 del total = 400µL) en tubos estériles de 12x75 (Costar™). Para esta Estandarización se adicionó 1 mL de ZnCl<sub>2</sub> 0.1mM (cat.108816, Merck KGaA™, Darmstadt, Alemania) a los grupos D y H para permitir conocer si la concentración y las condiciones utilizadas arrojan un resultado distinto comparado con los grupos no tratados (C y G).

Las muestras se incubaron con el tratamiento de ZnCl<sub>2</sub> (antes de continuar con 'Fijación' en la 'Tinción intracelular') a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C durante por lo menos 2h. Esta duración es un promedio de aquellas utilizadas anteriormente en tratamientos con zinc *in vitro*. Para las siguientes fases de estandarización del protocolo se propone adicionar por triplicado 1 mL de 1 de las 4 concentraciones de ZnCl<sub>2</sub> (Ver Tabla 2) para cada una de 3 corridas de muestras y un control negativo para cada una.

[ZnCl <sub>2</sub> ] (mM)
Control -
0.05
0.1
0.25
0.5

Tabla 2. Concentraciones propuestas para futuro tratamiento con ZnCl<sub>2</sub> en Fases siguientes del protocolo.

### **Evaluación de la producción de IL 17 para la detección de linfocitos Th17**

Las soluciones amortiguadoras fueron previamente preparadas (Ver Anexo I). Después del tratamiento se prosiguió a la tinción intracelular de las citocinas en las células con un kit BD Mouse Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit™ (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA cat. No.560758). Las células tratadas se fijaron con BD Cytifix™ (**BF**), se permeabilizaron con BD Perm/Wash™ (**BP**) 1X y se tiñeron con anticuerpos producidos en conejo en contra de CD4, IL17A (Th17), IFN-γ (Th1) e IL-4 (Th2) murinas. Los linfocitos fueron analizados por medio de forward y side scatter y por las emisiones de los disitntos fluorocromos. Las células teñidas fueron analizadas mediante el citómetro FACScan™ y el software BD CellQuest Pro™.

## **Técnica de tinción intracelular**

### **Fijación**

1. Centrifugar suspensión de células tratadas a 1000rpm por 10 minutos a temperatura ambiente (TA) y guardar sobrenadante para congelarlo
2. Resuspender el cultivo en 2mL de Buffer de Tinción (BT) para depositar aproximadamente 1 millón de células (400µL) en un tubo estéril para citómetro 12x75 Elkay™
3. Centrifugar muestra a 1000rpm por 10 minutos a TA y decantar sobrenadante con precaución
4. Resuspender en 1 mL de BD Cytofix™ frío e incubar 10 minutos a TA
5. Centrifugar muestra a 1000rpm por 10 minutos a TA y decantar sobrenadante con precaución
6. Lavar células en BT 2 veces y centrifugar a 1000rpm por 10 minutos a TA, decantando sobrenadantes

### **Permeabilización\*\***

1. Diluir BD Perm/Wash™ (BP) 10x con agua desionizada para una solución 1X. (1:10)
2. Resuspender las células en 1mL de BP 1X e incubar 15 minutos a TA
3. Incubar las muestras durante el tiempo indicado en Grupos de Estimulación a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. ( Grupos LE= 3 h / LP= 12 h )
4. Centrifugar muestra a 1000rpm por 10 minutos a TA y decantar sobrenadante con precaución

## Tinción

1. Resuspender las células en 50 µl de BP 1x y agregar 20 µl adicionales de BP a los controles negativos de tinción (A y E) y al resto de las muestras 20 µl del 'cocktail' de anticuerpos, el cual contiene:
  - Anti CD4 conjugado a PERCP-CY5.5 (*Proteína Clorofila Peridinina-Cyanine5.5*) Exc: 490.7nm, Emi: 695nm
  - Anti IL-17A conjugado a PE (*Ficoeritrina*) Exc: 480nm, Emi: 578nm.
  - Anti IFN- γ conjugado a FITC (*Isocianato de fluoresceína*) Exc: 490nm, Emi: 514nm
  - Anti IL-4 conjugado a APC (*Aloficocianina*) Exc:650nm, Emi: 660nm
2. Incubar 30 minutos en oscuridad (los fluorocromos conjugados son fotosensibles)
3. Adquirir muestra en citómetro FACScan™ con aproximadamente 10000 eventos.
4. Analizar resultados a través del software BD CellQuest Pro™ con el diseño conveniente de DotPlots y los comparativos correspondientes de controles de isotipo para las clonas utilizadas por los fluorocromos en el cocktail:
  - Isotipo CD8 para CD8-FITC = FL1
  - Isotipo CD19 para CD19-PE = FL2
  - Isotipo CD4 para CD4-PERCP = FL3

## 5 Resultados

➤ **EPOR** - *Ver Anexo II*

➤ **Estandarización de condiciones experimentales. Primera Fase.**

El mantenimiento de las cruces de animales así como su utilización en las etapas iniciales del Protocolo se llevó a cabo con mucho orden, en condiciones de esterilidad muy bien acatadas y resultando en la confiable recolección de cultivos primarios de esplenocitos de ratón BALB/c AnN con una vasta cantidad de linfocitos viables.

Se corrió un triplicado de Prueba de muestras siguiendo el Protocolo bajo las instrucciones del Kit de Fenotipificación de Th1/Th2/Th17 y con los mínimos simples recomendados por la literatura con similares productos, metodologías y propósitos. Se utilizó este primer ensayo para practicar la compensación de fluorocromos con los controles de isotipo para poder analizar las muestras. Los datos de compensación definitivos obtenidos posteriormente en la corrida junto con los grupos LE y LP pueden ser 'importados' a la plataforma de trabajo en el software BD CellQuest Pro™ para futuras cuantificaciones de las citocinas.

De acuerdo a las instrucciones del inserto del Kit, la incubación con la solución amortiguadora de Permeabilización (Buffer Perm/Wash™ - BP) debe ejecutarse por un periodo de tan solo 15 minutos, mientras que la experiencia de nuestros asesores ha sido que se necesita por lo menos 3 horas y convenientemente hasta 48 horas. En el triplicado de prueba, el tiempo recomendado por el Kit no fue suficiente, pues no se reconoció la

señal de los fluorocromos unidos a las citocinas intracelulares (IL-17A, IFN-  $\gamma$ , IL-4) . Notoriamente, la detección membranal de los anticuerpos anti-CD4 fue efectiva, indicando que la tinción se llevó a cabo con éxito. Aún así debimos proceder a modificar las condiciones de Estimulación, para encontrar las moléculas producidas, y a continuar buscando las condiciones ideales para Permeabilización, para tener acceso a las citocinas.

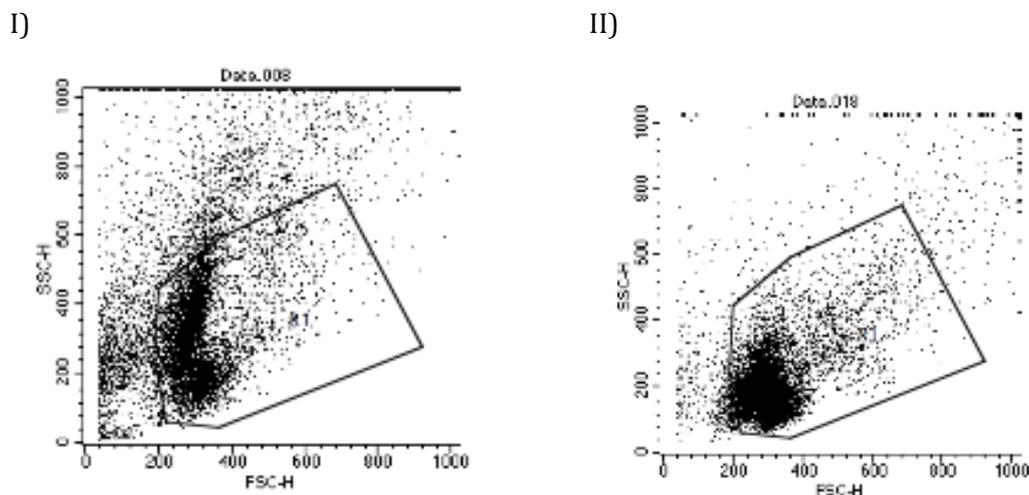
Es por esto que se diseñaron los Grupos para estandarización de condiciones experimentales Primera Fase (Larga Estimulación (LE) con mínima permeabilización y Larga Permeabilización (LP) con mínima estimulación) y sus respectivos controles negativos absolutos (estimulación y tinción) y los controles negativos de estimulación, quienes llevaron la función de poner en evidencia los estados basales de fluorescencia para poder evaluar tanto la producción de las moléculas de interés de nuestro cultivo estimulado, como asegurar que la metodología de tinción continuara siendo efectiva.

Después de estimulación y antes de Fijación se decidió guardar los sobrenadantes para congelarlos, pues en caso de que la acción de la Brefeldina A en el Buffer Golgi Stop™ (BDG) no haya logrado restringir la localización de IL-17 dentro de la célula, los niveles secretados puedan medirse y servir para futuras determinaciones que utilicen este sobrenadante (en EIA por ejemplo).

Como se mencionó anteriormente, se utilizaron las muestras Control negativo de estimulación y tinción ( A y E) y los controles de isotipo

correspondientes a cada fluorocromo para realizar la correcta compensación en el citómetro y poder tener una detección adecuado de nuestras células y de las señales de fluorescencia emitidas por ellas ante la unión anticuerpo-ligando.

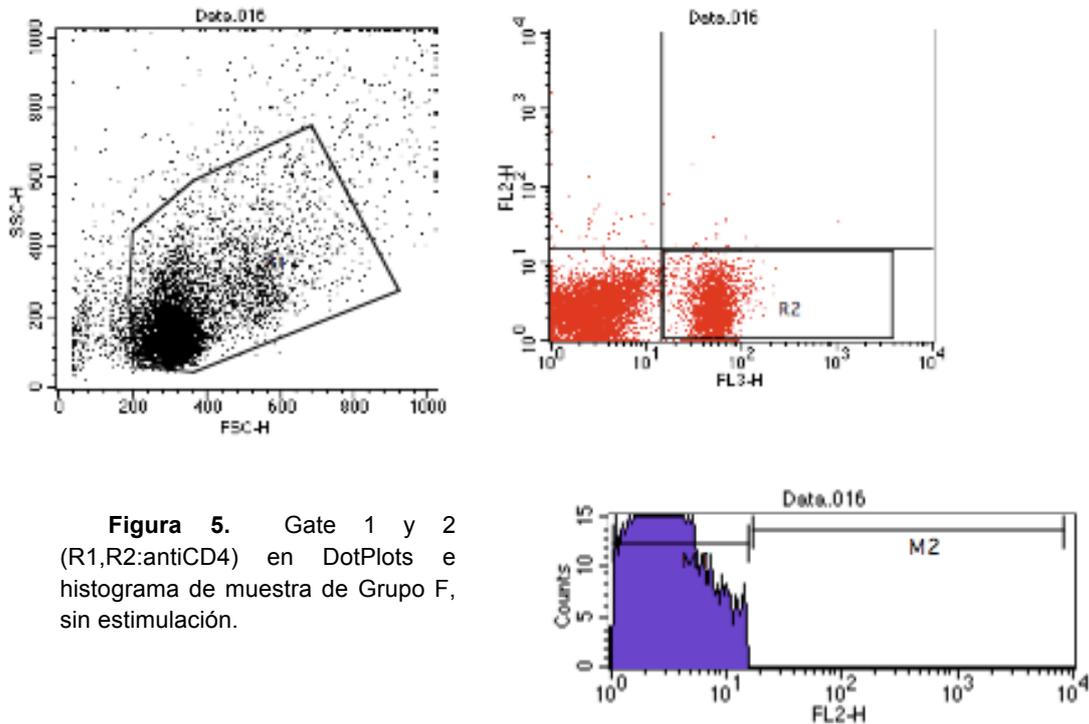
El DotPlot Forward Scatter v.s. Side Scatter nos permitió distinguir a los linfocitos respecto de otros tipos y debris celulares presenten en las muestras. Limitando esta población con el 'Gate' R1, pudimos ver en los demás DotPlots solamente linfocitos. (Figura 4).



**Figura 4.** Gate 1 (R1) de DotPlots FSC/SSC : I) muestra de Grupo B, sin estimulación y II) muestra de Grupo G, con estimulación,

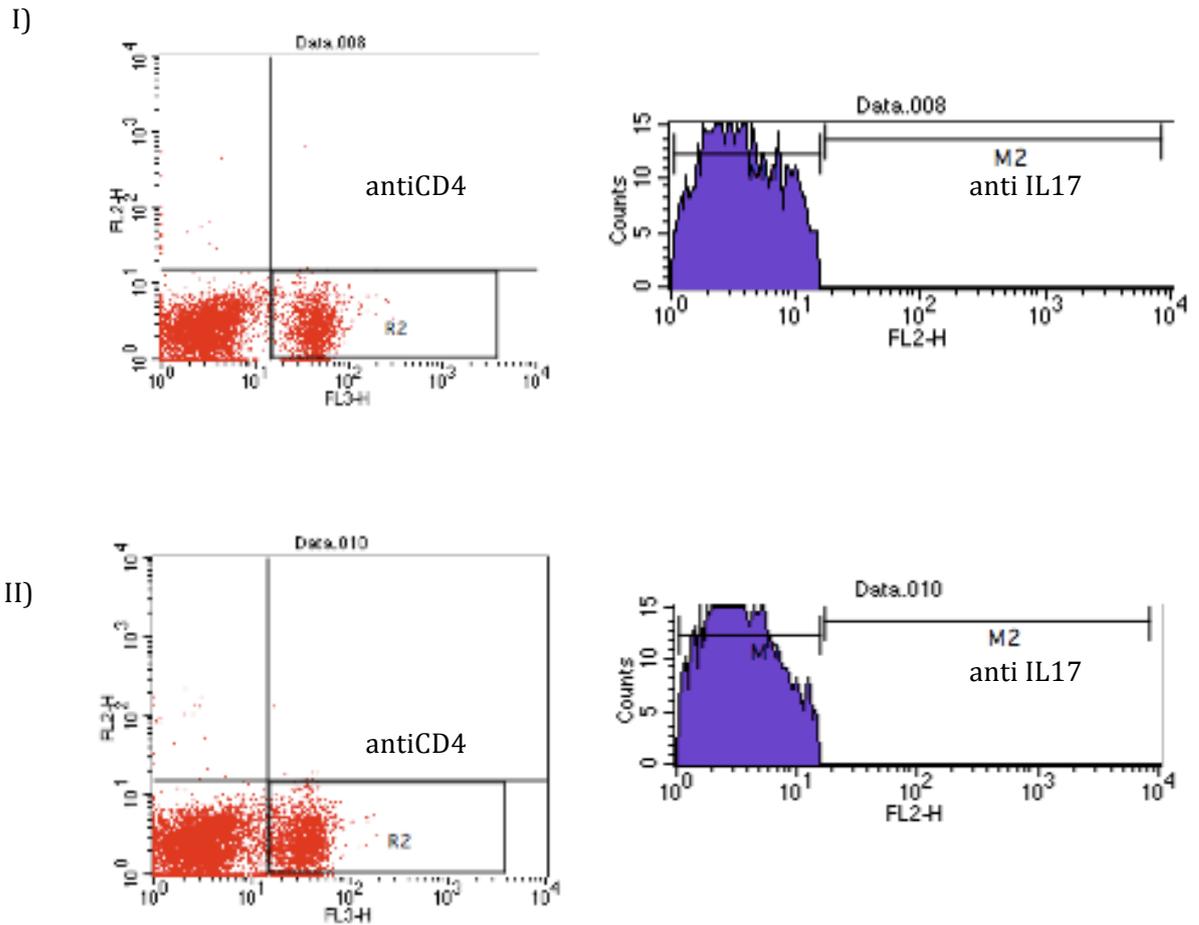
La detección de CD4 membranal conjugado a PERCP-CY5.5 y leído en el canal de fluorescencia 3 (FL3), permite la utilización de 'Gate 2' (R2, delimitando linfocitos CD4+) lo que nos asegura que estamos evaluando al grupo correcto de células y comprobando que éstas fueron teñidas correctamente. Este G2 fue utilizado como restricción en los histogramas, para los cuales se recurrió a las referencias basales de los controles

absolutos y no estimulados para lograr la identificación de muestras positivas (M2) en la detección de señales fluorescentes (Figura 5).



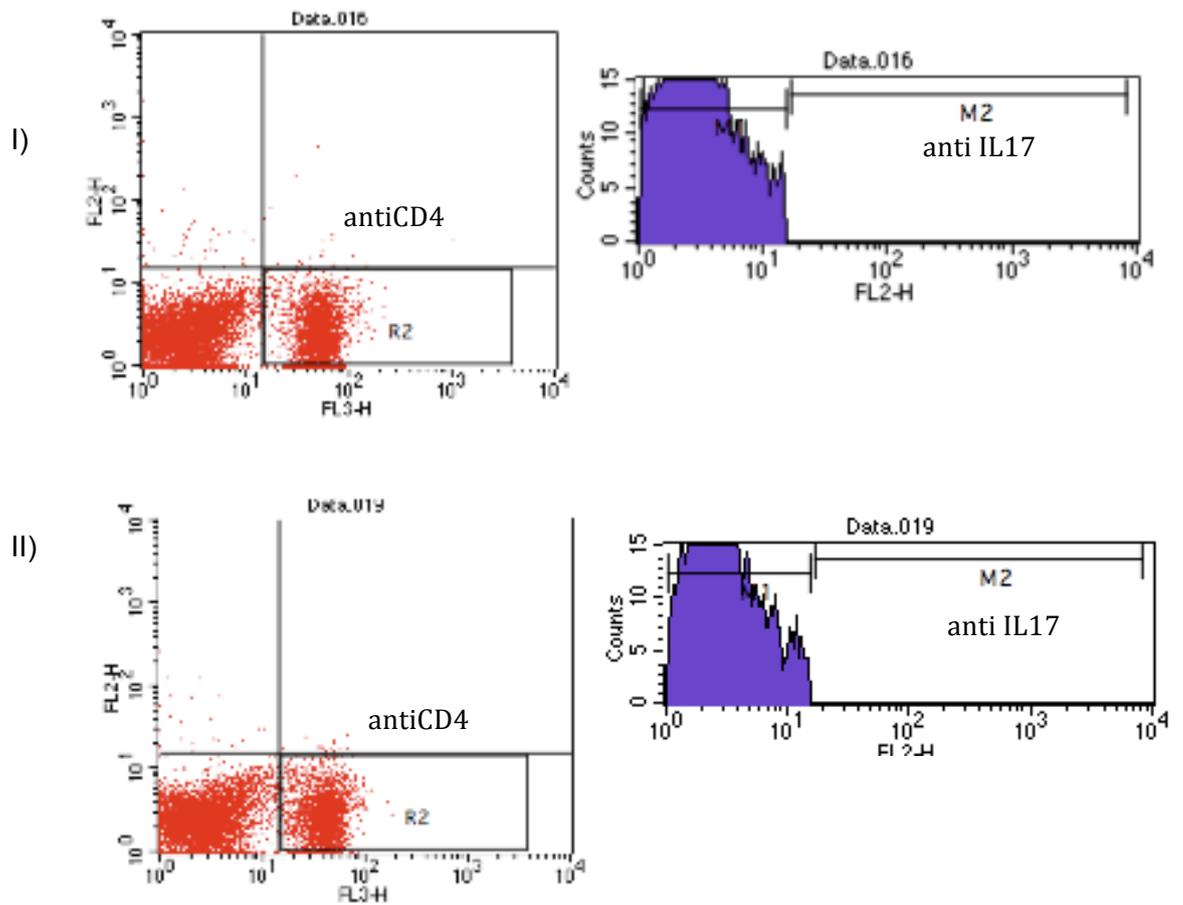
**Figura 5.** Gate 1 y 2 (R1,R2:antiCD4) en DotPlots e histograma de muestra de Grupo F, sin estimulación.

En los DotPlots e histogramas siguientes (Figuras 6 y 7) se puede apreciar que aun cumpliendo con la duración mínima recomendada por nuestros asesores para los periodos de incubación de las condiciones Estimulación y Permeabilización y evaluando dos distintas combinaciones de las mismas a través de nuestro diseño de Grupos (LE y LP), no se detectó la presencia significativa de IL-17. Tampoco se encontró presencia de IFN- $\gamma$ , ninguna muestra resultó con un porcentaje M2>0.5% en el análisis de los histogramas.

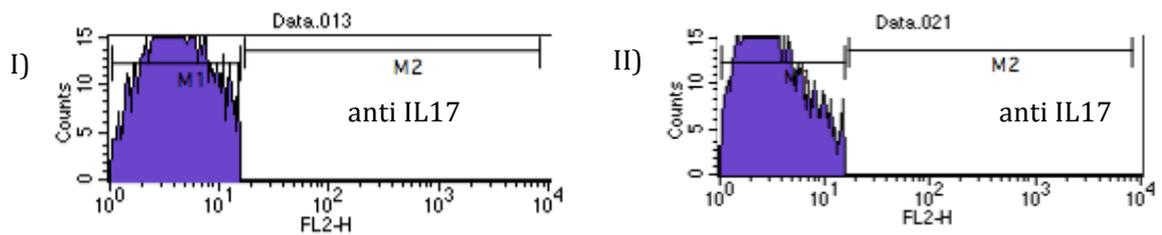


**Figura 6.** Condición de Larga Estimulación (LE). I) Control (Grupo B) y II) muestras (representativa de Grupo C). DotPlots (FL3 para CD4+: R2) e histogramas (FL2, para detección de IL-17).

Las muestras con tratamiento  $\text{ZnCl}_2$  0.1mM (D y H) no presentaron resultados significativamente distintos respecto a los controles sin estimulación ni a los controles con estimulación sin el tratamiento con  $\text{ZnCl}_2$  (Figura 8).



**Figura 7.** Condición de Larga Permeabilización (LP). I) Control (Grupo F) y II) muestras (Grupo G). I) DotPlots (FL3 para CD4+: R2) e histogramas (FLI para detección de IL-17).



**Figura 8.** Histograma FL2 para detección de IL17 en muestras representativas de I) Grupos D y II) Grupos H, muestras con tratamiento ZnCl<sub>2</sub> 0.1mM. Ver Controles para LE y LP en Figuras 6 y 7.

## **6 *Discusión***

Para poder identificar modificaciones en la producción de moléculas características de distintas subpoblaciones linfocitarias producida por la exposición a concentraciones en exceso de zinc, es esencial lograr la Estandarización de las condiciones experimentales convenientes para la preparación y el tratamiento de las muestras, para el reconocimiento de citocinas mediante tinción intracelular con anticuerpos y aquellas para el correcto análisis de la información generada. Un Protocolo estandarizado nos llevará a contar con una técnica confiable para lograr concluir si la Hipótesis de este proyecto es correcta y así otorgar resultados útiles sobre la influencia del zinc en el comportamiento de la población Th17 y en la importante necesidad de reducir el riesgo de autoinmunidad.

La Estandarización en esta su Primera Fase facilita una estructura inicial muy buena para poder montar este Protocolo en el LII, sin embargo los resultados obtenidos con las condiciones evaluadas no son suficientes para que la técnica se considere lista para su aplicación.

Es un hecho que las instrucciones referentes a la Permeabilización por parte del inserto del Kit no son las adecuadas. El periodo más largo evaluado en nuestra Estandarización, 12 horas, tampoco parece ser suficiente para permitir a los anticuerpos del 'cocktail' entrar a la célula y unirse con sus ligandos. Aun cuando la polarización Th17 no estuviera funcionando y no contáramos con IL17, con una correcta Permeabilización deberíamos de ser capaces de detectar niveles basales de IFN- $\gamma$  intracelular.

Otra propuesta discutida es la de incluir un control positivo con concanavalina A como se ha hecho antes en el LII (Camacho 1994, Aguilar et al 2000) para que mediante su estimulación sobre los linfocitos se pueda hacer una detección del IFN- $\gamma$  producido y así tener una noción mayor de la eficacia en la permeabilización y detección intracelular y en sobrenadante de citocinas presentes en la población para así lograr comparar las muestras estimuladas con las condiciones aquí evaluadas para la polarización a Th17.

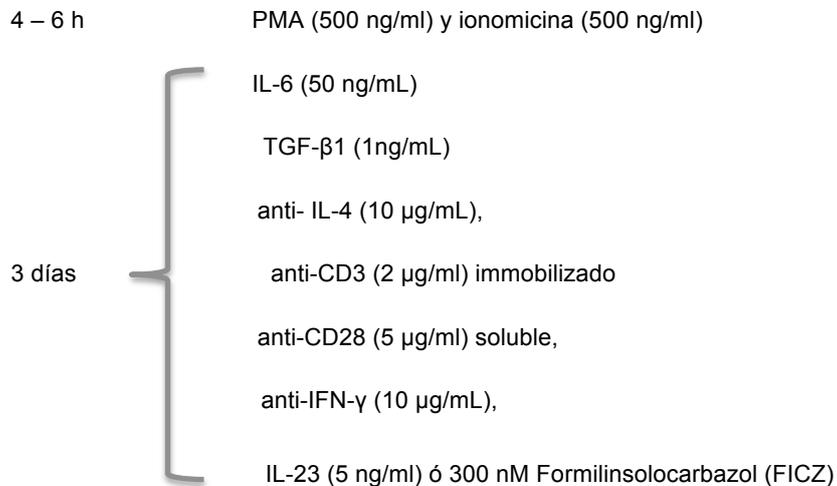
La permeabilización prolongada corre el riesgo de que las citocinas de interés salgan de la célula aun cuando el inhibidor de transporte de proteínas (Buffer Golgi Stop™ - BDG) previene el escape de las citocinas intracelulares. La larga permeabilización puede también llevar a daños irreversibles en la membrana fosfolipídica.

Considerando lo antes discutido, proponemos que en las siguientes Fases de Estandarización, se manejen tiempos un poco más largos para esta condición pero con cuidado de no dañar a los linfocitos de las muestras.

Algunos grupos consultados para su asesoría, como el de la Dra. Gloria Soldevila en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y el del Dr. Vianney Ortiz Navarrete en el CINVESTAV, sustentan la idea de que para una polarización efectiva deben utilizarse también anticuerpos que bloqueen moléculas que propician la diferenciación hacia otras subpoblaciones Th.

Estos anticuerpos y otras citocinas estimulantes se encuentran también como recomendación en la Guía de Estimulación para Tinción Intracelular de Citocinas y Quiomocinas de Biolegend™ en la sección de IL17A. En ella se propone el siguiente grupo de estimulantes de la Figura 9.

Figura 9. Estimulantes de polarización Th17 recomendados .



De igual manera encontramos un documento de Biolegend™ titulado “Polarización Th17 de Células CD4 murinas” para la generación de células productoras de IL-17 *in vitro*. En éste se propone el uso de esplenocitos de nódulo linfático para aislar linfocitos CD4, recubrir una caja de Petri con anti-CD3 murino (2µg/ml, 37°C, 2 h) para después incubar durante 3 días con las mismas moléculas propuestas en la Guía (anti-CD28 (5 µg/mL), IL-6 (50ng/mL), TGF-β1 (1ng/mL), anti-IL-4 (10 µg/mL), anti-IFN-γ (10 µg/mL) y 300 nM de FICZ) y después proceder a la estimulación con PMA y ionomicina en presencia de Brefeldina A por 4 h.

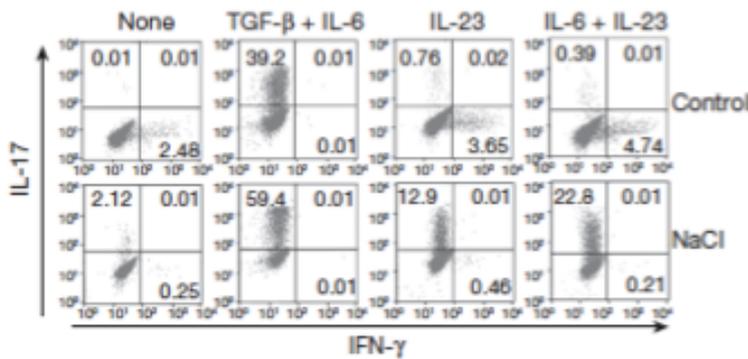
El Protocolo en estandarización pretende encontrar las condiciones idóneas (pero más simples y costeables) para la estimulación de linfocitos Th17 y la producción de IL17. Ya que las condiciones evaluadas hasta ahora no han otorgado resultados satisfactorios, proponemos alargar aún más la

duración de esta etapa (intentar periodos de 3 días como propone Biolegend™ en sus insertos) e intentar crear vínculos de colaboración que pueden proveer al LII con algunos otros de estos estimulantes para poder incluirlos en nuestra técnica. Desde luego antes la posibilidad de nuevos recursos, se puede proceder a la adquisición de estos con nuestros ya creados vínculos con las casas comerciales que los manejan.

Kleinewietfel et al demostraron recientemente que la adición de 40mM de NaCl en presencia de las citocinas inductoras de Th17 antes mencionadas en los antecedentes (TGF  $\beta$ , IL1  $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23) induce la producción de IL-17. En comparación con sales de manganeso, urea y manitol, el catión sodio fue el que mostró mejor inducción. Los experimentos fueron realizados con apoyo de citometría y de microarreglos, cuyo análisis verificó la expresión a nivel de ARNm y proteínas, mediante la fosforilación de p38/MAPK, provocando un crecimiento en la población de Th17 (Kleinewietfeld et al 2013).

La enzima SGK1, cinasa 1 regulada por glicorticoide en suero, esencial en la señalización dependiente de IL-23, es por ende crítica para la estabilización del fenotipo Th17 y se encarga del transporte de sodio y la homeostasis de NaCl en muchas otras células ( Wulff et al. 2002, Salker et al 2011). Wu et al mostraron recientemente también que un incremento en la concentración de NaCl induce la expresión de la enzima, promoviendo la expresión del IL-23R y de IL-17, aumentando la diferenciación a Th17 tanto *in vivo* como *in vitro* acelerando así el desarrollo de autoinmunidad (Wu et al

2013). Por lo tanto proponemos la inclusión de NaCl también al grupo de estimulantes para la polarización de linfocitos Th17 del Protocolo.



**Figura 10. NaCl aumenta diferenciación de población Th17 *in vitro* e *in vivo*** Dot Blot de la producción de IL-17 e IFN  $\gamma$  en células T CD4+ inmaduras estimuladas con las citocinas indicadas por 3 días en presencia y ausencia de 40mM de NaCl.

Aunque estudios *in vitro* indican que los linfocitos T siguen un estricto camino de polarización activado por citocinas específicas, en modelos *in vivo* estas poblaciones están expuestas a un medio complejo de citocinas que les confieren una considerable plasticidad (McGeachy 2008). Esta característica en la subpoblación Th17 sugiere una marcada heterogeneidad en líneas de Th17 exhibiendo diferentes perfiles inmunológicos. La evidencia disponible muestra que las células Th17 son generadas por la actividad de polarización de IL-6 y TGF- $\beta$ , mientras que IL-23 participa de manera crucial en la efectividad de la maduración y patogenicidad de la subpoblación. Se ha encontrado que IL-23 es esencial para inducir y mantener la expresión de las concentraciones de TGF- $\beta$  en células Th17 en desarrollo .

Considerando lo anterior se puede concluir que existen líneas de Th17 que expuestas a las citocinas indicadas (IL-23) serán patogénicas pero en caso de que no lo estén serán linfocitos que no inducirán autoinmunidad (Yang et al 2009, Esplugues et al 2011).

Mc Geachy et al han generado resultados que comprueban la existencia de la heterogeneidad de la subpoblación Th17, lo que nos lleva a pensar que el control del medio de citocinas proporcionado en las condiciones de estimulación para polarización Th17 debe ser cuidadoso y correctamente planteado para que la significancia de los resultados en utilización de estas células tengo un significado útil y confiable para el conocimiento de cómo son en realidad los mecanismos inmunológicos en situaciones de patogenia autoinmune.

## **7 Conclusiones**

- El desarrollo y preparación de un protocolo que utiliza citometría de flujo resulta una herramienta muy útil para que en el LII se puedan continuar los estudios de la influencia del zinc en el sistema inmunológico
- La creación de vínculos de colaboración son primordiales para el desarrollo del Protocolo para poder reunir el conocimiento, la infraestructura y los elementos ideales para poder implementar la técnica de citometría de flujo en los trabajos del LII
- La implementación de un Protocolo de análisis y cuantificación de citocinas intracelulares por citometría de flujo requiere de la estandarización de condiciones para poder confiar y utilizar los resultados generados por la aplicación de la técnica
- Las condiciones de estimulación de un cultivo primario de esplenocitos de ratones BALB/c AnN deben ser evaluadas hasta que generen una condición basal determinada y suficiente para poder contar con los controles negativos indicados para evaluar el efecto que tienen las concentraciones elevadas de  $ZnCl_2$  sobre la diferenciación de la población linfocitaria Th17

- La polarización de la subpoblación Th productora de IL-17 se puede lograr con la estimulación con IL-6 y TGF- $\beta$ , sin embargo debe de incubarse por un tiempo más largo. Sería conveniente que la siguiente Fase de la Estandarización utilice 3 días como tiempo de incubación
- En caso de tener posibilidad de adquirir nuevas moléculas, recomendamos la adición de otros estimulantes recomendados para la diferenciación hacia Th17 como: anti- IL-4 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), anti-CD3 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inmovilizado , anti-CD28 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) soluble, anti-IFN- $\gamma$  (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), IL-23 (5 ng/ml) o 300 nM FICZ y 40mM NaCl
- La permeabilización de la membrana celular utilizada para la tinción intracelular de citocinas en la técnica del Protocolo debe ser adecuada para que sin dañar las células se pueda llevar a cabo la unión los anticuerpos con sus respectivos ligandos
- Un tiempo de permeabilización mayor a 12 h y menor a 24h es una buena opción a evaluar en el futuro para estandarizar esta condición
- La Segunda Fase para la Estandarización del Protocolo deberá de utilizar la información y resultados de este trabajo para plantear la

metodología y poder continuar con el proceso de estructurar y en su momento habilitar el Protocolo

## Anexo I

### Preparación de Soluciones Amortiguadoras (Buffers)

- Buffer de lisis (BLI)- Lisis de eritrocitos: 100mL pH 7.2  
10 mL de tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) (20.60g/l) 0.17M  
90 mL de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) (8.30g/l) 0.16M
- Buffer Golgi Stop™ (BDG) – Inhibidor de transporte de proteínas :  
Uso directo desde el Kit
- Buffer de Tinción (BT): 200 mL pH 7.4  
196 mL de amortiguador salina de fosfatos (PBS) pH 7.2  
24.0 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15M  
76.0 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15M  
100.0 mL NaCl 0.15M  
0.09% (0.18g) de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>)  
2% (4 mL) de suero fetal bovino (FBS)
- Buffer Cytifix™ (BF)- Fijación:  
Uso directo desde el Kit
- Buffer Perm/Wash™ (BP) – Permeabilización:  
Dilución 10x a 1x con agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) para 'Permeabilización'

Contacto (Proveedor)	1) BD	2) Merck Millipore	3) Uniparts	4) CINVESTAV Lab. Dr. Ortiz	5) Biomédicas Lab. Dra. Soldevila	6) Biomédicas Lab. Dra. Fragoso	7) SMI (CMNXXI)	8) Colegio de Profesores FQ
<b>Recurso</b>								
Presupuesto								X
Kit de Tinción	X	X						
Citómetro	X	X				X		
Moléculas Estimulantes	X		X		X	X		
Asesoría	X	X		X	X	X	X	

Tabla 3. Relación de contactos de Etapa Preliminar de Organización de Recursos (EPOR). 1) BD ; 2) Merck Millipore; 3) Uniparts; 4) CINVESTAV, Laboratorio del Dr. Vianney Ortiz5-6) Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, Laboratorios Dra. Gloria Soldevila y Dra. Gladis Fragoso; 7) Sociedad Mexicana de Inmunología en Centro Médico Nacional siglo XXI; 8) Colegio de Profesores de la Facultad de Química.

## DIRECTORIO

1) BD - Becton & Dickinson Biosciences México

QFB. Angélica V Juárez - Jr Application Specialist / Especialista en aplicaciones.

Tel. 5999 8200 Ext 1313 Cel. 55 4554 2240

E-mail: [angelica\\_v\\_juarez@bd.com](mailto:angelica_v_juarez@bd.com)

IB María del Carmen Carrasco - Sales Representative / Ejecutiva de ventas.

Tel. 5999 8356 Cel. 4194 7711

E-mail: [maria\\_carmen\\_carrasco@bd.com](mailto:maria_carmen_carrasco@bd.com)

Asesoría : Curso privado (2h) sobre “Citometría de Flujo y sus Aplicaciones” para todos los integrantes del LII e invitados pasantes QFB de la FQ.

2) Merck Millipore México

Dr. Samuel García Nieto - Bioscience Product Manager / Gerente de Producto

Tel. 2122 1600 Ext 2659 Cel. 55 4181 8563

E-mail: [samuel.nieto@merckgroup.com](mailto:samuel.nieto@merckgroup.com)

Asesoría: Asistencia a exposición sobre Citómetros Amnis™ (FlowSight™ e ImageStream™ en el Instituto de Fisiología de la UNAM.

3) UNIPARTS S.A. de C. V.

Q.F.B. Gladys Mojica - Especialista en productos

Tel. 5281 4718 Ext. 114 Cel. 55 1655 2875

E-mail: [gladysm@uniparts.com.mx](mailto:gladysm@uniparts.com.mx)

M en C. Adriana Núñez Valencia - Asesora Científica

Tel. 5281 4718 Ext 119

E-mail: [adrianan@uniparts.com.mx](mailto:adrianan@uniparts.com.mx)

4) CINVESTAV - Departamento de Biomedicina Molecular

Dr. Vianney Ortiz Navarrete - Investigador Principal 3 C

Tel. 5061 3324

E-mail: [vortiz@cinvestav.mx](mailto:vortiz@cinvestav.mx)

5) Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM - Sede del Circuito Escolar

Dra. Gloria Soldevila - Investigador Principal

Tel. 5622 3159

E-mail: [soldevi@unam.mx](mailto:soldevi@unam.mx)

Biólogo Germán Alemán Muench

E-mail: [gamuench@gmail.com](mailto:gamuench@gmail.com)

6) Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM - Sede del Circuito Escolar

Dra. Gladis Fragoso

Tel. 5622 3853

E-mail: [gladis@biomedicas.unam.mx](mailto:gladis@biomedicas.unam.mx)

QFB. Jacquelynne Cervantes

Tel. 5622 3152 Cel: 55 3996 9071

E-mail: [otra\\_jbct@yahoo.com.mx](mailto:otra_jbct@yahoo.com.mx)

7) Sociedad Mexicana de Inmunología

Asesoría: Clínicas de Citometría de Flujo en el Centro Médico Nacional siglo XXI y seminarios mensuales relacionados.

8) Colegio de Profesores de la Facultad de Química UNAM

Aplicación a la Cátedra de apoyo económico a alumnos tesistas. (No resultó ganador el proyecto pero aplicar a la cátedra nos sirvió para arrancar la estructuración del protocolo; el presupuesto fue finalmente cubierto por fondos del LII)

## **Anexo III**

### ABREVIATURAS

BDG	Buffer Inhibidor de transporte de proteínas GolgiStop
BF	Buffer de Fijación Cytifix™
BLI	Buffer de Lisis de eritrocitos
BP	Buffer de Permeabilización Perm/Wash™
BT	Buffer de Tinción
CFA	Células formadoras de anticuerpos
CIA	Artritis inducida por colágeno
CRIP	Proteínas intestinales ricas en cisteína).
DTH	Hipersensibilidad Tipo Retrasada
EPOR	Etapas Preliminares de Organización de Recursos
FBS	Suero Fetal Bovino
FICZ	6-formylindolo[3,2-b]carbazole
FL-x	Detector de fluorescencia en citómetro
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
HDL	Lípidos de alta densidad
IDR	Ingesta Diaria Recomendada
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL- x	Interleucina x
IL-xR	Receptor de interleucina x
LD50	Dosis Letal 50
LDL	Lípidos de baja densidad

LE	grupo de Larga Estimulación
LII	Laboratorio de Investigación en Inmunología
LP	grupo de Larga Permeabilización
MLC	Cultivo mixto linfocitario
MT	Metalotioneínas
MTF-1	Factor de transcripción de unión a metales
NK	Células Natural Killer
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Forbol miristato acetato
PMN	Células Polimorfonucleares
ROR $\gamma$ t	Receptores huérfanos de ácido retinoico
SOD	Enzima superóxido dismutasa
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
Th-x	Linfocitos T cooperadores – x
TLR	Receptores tipo Toll
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral
WHO / OMS	Organización Mundial de la Salud
ZIP	Proteínas importadoras de zinc
ZnT	Proteínas trasportadoras de zinc

## **Bibliografía**

1. Aydemir TB, Blanchard RK, Cousins RJ. Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 1699–1704
2. Bao B, Prasad AS, Beck FWJ, Fitzgerald JT, Snell D, Bao GW, Singh T, Cardozo LJ. Zinc decreases C-reactive protein, lipid peroxidation, and inflammatory cytokines in elderly subjects: A potential implication of zinc as an atheroprotective agent. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, 91, 1634–1641
3. Bao B, Prasad A, Beck FW, Suneja A, Sarkar F. Toxic effect of zinc on NF-kappaB, IL-2, IL-2 receptor alpha, and TNF-alpha in HUT-78 Th(0) cells. *Toxicol Lett.* **2006**, 166(3):222-228
4. Barceloux DG. Zinc. *Clin. Toxicol.* **1999**, 37:2:279–292
5. Beck FW, Prasad AS, Kaplan J, Fitzgerald JT, Brewer GJ: Changes in cytokine production and T cell subpopulations in experimentally induced zinc deficient humans. *Am J Physiol* **1997**, 272:1272
6. Beisel WR Single nutrients and immunity. *Am J Clin Nutr.* **1982**, 35(suppl) 417-468
7. Beisel WR. Zinc and the immune system. *Encyclopedia of immunology.* Academic Press, Roitt. 1992 1577-1578
8. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **2006**; 441:235–238
9. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* **2007** , 19(6): 652–657
10. Bettger WJ, O'Dell BL. Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells. *J Nutr Biochem* **1993**, 4:194-207
11. Beyersmann, D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.* **2008**, 82, 493-512
12. Bhutta ZA, Bird SM, Black RE. Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhea in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* **2000**, 72:1516-1522
13. Boukaiba N, Flament C, Archer S: A physiological amount of zinc supplementation: effects on nutritional, lipid and thymic status in an elderly population. *Am J Clin Nutr.* **1993**, 57: 566-572
14. Brambilla EM, Lozano P: Metalotioneínas, bioquímica y funciones propuestas. *BEB* **1999**, 8: 21-27
15. Bremner I, Beattie JH. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. *Proc Nutr Soc.* **1995**, 54: 489-499
16. Briefel RR, Bialostosky K, Kennedy-Stephenson J, McDowell MA, Ervin RB, Wright JD. Zinc intake of the U.S. population: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *J. Nutr.* **2000**, 130, 1367S-1373S
17. Brown KH. Effect of infections on plasma concentration and implications for zinc status assessment in low-income countries. *Am J Clin Nutr.* **1998** 68(suppl): 425-429.
18. Brown H, Pearson JM, Allen LH, Rivera J. Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of pre-pubertal children: a metaanalysis of randomized, controlled trials. *Am J Clin Nutrition.* **2002**, 75:1062-1071
19. Campo CA, Wellinghausen N, Faber C, Fischer A, Rink L. Zinc inhibits the mixed lymphocyte culture. *Biol. Tr. Elem. Res.* **2001**, 79, 15-22

20. Chandra RK: Excessive intake of zinc impairs immune responses. *JAMA* **1984**, 252: 1443-1446
21. Chandra RK: Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr.* **1997**, 66: 460S-463S
22. Costello LC, Liu Y, Zou J, Franklin RB. Evidence for a zinc uptake transporter in human prostate cancer cells which is regulated by prolactin and testosterone. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 17499-17504
23. Chabaud M, Miossec P. The combination of tumor necrosis factor alpha blockade with interleukin-1 and interleukin-17 blockade is more effective for controlling synovial inflammation and bone resorption in an ex vivo model, *Arthritis Rheum* **2001** 44:1293-1303
24. Chvapil M et al. Effect of Zinc on peritoneal macrophages in vitro. *Infect Immun* **1977**, 16:1:367-373
25. Cousins RJ. Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Phis Rev.* **1985**, 65: 238-309
26. Csermely P, Somogyi J. Zinc as a possible mediator of signal transduction in T lymphocytes. *Acta Physiol Hung* **1989**, 74:195-199
27. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **2003**, 421:744–748
28. Dutta SK, Procaccino F, Aamodt R. Zinc metabolism in patients with exocrine pancreatic insufficiency. *J Am Coll Nutr* **1998**, 17:556-563
29. Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB, Kastelein RA. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* **2007**, 132, 2359–2370
30. Esplugues, E. et al. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* **2011**; 475: 514–518
31. Faber C, Gabriel P, Ibs KH, Rink L. Zinc in pharmacological doses suppresses allogeneic reaction without affecting the antigenic response. *Bone Marrow Transplant.* **2004**, 33, 1241-1246
32. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol.* **2003**, 170 : 2106 – 2112
33. Finamore A, Massimi M, Conti Devirgiliis L, Mengheri E. Zinc deficiency induces membrane barrier damage and increases neutrophil transmigration in Caco-2 cells. *J. Nutr.* **2008**, 138, 1664–1670
34. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. *National Academies Dietary Reference* **2001**
35. Fosmire GJ. Zinc toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* **1990**, 51: 225-227
36. Fragoso G, Lastra MD, Aguilar AE, Pastelín R, Rosas G, Meneses G, Sciutto E, Lamoyi E. Effect of oral zinc supplementation upon *Taenia crassiceps* murine cysticercosis. *J Parasit.* **2001**, 87(5):1034-1039
37. Fraker PJ et al. Interrelationships between zinc and immune function. *Fed Proc* **1986**, 45: 1474-1479
38. Fraker PJ, King LE, Laakko T, Vollmer TL. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J Nutr.* **2000**, 130:1399-1406
39. Fraker PJ, Osati-Ashtiani F, Wagner MA, King LE. Possible roles for glucocorticoids and apoptosis in the suppression of lymphopoiesis during zinc deficiency: a review. *J Am Coll Nutr* **1995**, 14, 11–17

40. Franklin RB, Feng P, Milon B, Desouki MM, Singh KK, Kajdacsy-Balla A, Bagasra O, Costello LC. hZIP1 zinc uptake transporter down regulation and zinc depletion in prostate cancer. *Mol. Cancer*. **2005**, 4:32
41. Fujino S , Andoh A , Bamba S , Ogawa A , Hata K , Araki Y , Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* . **2003** 52 : 65 – 70
42. Golden MHN, Harland PSEG, Jackson AA: Zinc and immunocompetence in protein-energy malnutrition. *Lancet* **1978**, 1226-1227 R.
43. Good A, West A, Fernandes G. Nutritional modulation of immune responses, *Fed. Proc.* **1980**, 39, 3098–3104
44. Grider A, Bailey LB: Erythrocyte metallothionein as an index status in humans. *Proc Natl Acad Sci* **1990** 85: 1259-1262
45. Haase H, Maret W. Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp. Cell Res.* **2003**, 291, 289-298
46. Haase H, Maret W. Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *Biometals* **2005** 18:333–338
47. Haase H, Rink L: The immune system and the impact of zinc during aging. *Immun Ageing* **2009** , 6:9
48. Hart DA. Effect of zinc chloride on hamster lymphoid cells: mitogenicity and differential enhancement of lipopolisaccharide stimulation of lymphocytes. *Infect Immunol* **1978**, 19: 45-461
49. Hayashi K, Ishizuka S, Yokoyama C, Hatae T. Attenuation of interferon-gamma mRNA expression in activated Jurkat T cells by exogenous zinc via down-regulation of the calcium-independent PKC-AP-1 signaling pathway. *Life Sci.* **2008**, 83, 6–11
50. Hinks LJ, Colmsee M, Delves HT. Determination of zinc and copper in isolated leucocytes. *Analyst* **1982**, 107: 815-823
51. Ho E, Ames BN. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2002**, 99: 16770–16775
52. Ho E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J Nutr Biochem.* **2004**, 15:572–578
53. Infante-Duarte C, Horton H, Byrne M, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.* **2000**, 165: 6107–6115
54. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 fl T helper cells, *Cell* **2006**, 126:1121-1133
55. Iwata T, Incefy GS, Tanaka T, Fernandez-Botet CJ, Pih K, Good RA. Circulating thymic hormone levels in zinc deficiency. *Cell. Immunol.* **1979**, 47, 100–10541.
56. Kahmann L, Uciechowski P, Warmuth S, Plümkers B, Gressner AM, Malavolta M, Mocchegiani E, Rink L. Zinc supplementation in the elderly reduces spontaneous inflammatory cytokine release and restores T cell functions. *Rejuvenation Res.* **2008**, 11, 227–237
57. Kara E, Ozal M, Gunay M, Kilic M, Baltaci AK, Mogulkoc R. Effects of exercise and zinc supplementation on cytokine release in young wrestlers. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, 143,1435–1440.
58. King LE, Fraker PJ. Flow cytometric analysis of the phenotypic distribution of splenic lymphocytes in zinc deficient adult mice. *J Nutr* **1991**, 121: 1433-1438
59. Kitabayashi C et al. Zinc suppresses Th17 development via inhibition of STAT3 activation. *Internat Immuno.* **2010**, 22:5:375–386

60. Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakana H, Yosef N, Linker R, Muller D, Hafler D. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. **2013**, March Letter.
61. Kruse-Jarres JD. The significance of zinc for humoral and cellular immunity. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1989, 3, 1–8
62. Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, Hue S, Gorelick PL, McKenzie BS et al. IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced cell-dependent colitis. *J Exp Med*. **2006**, 203:2485–2494
63. Kuvibidila SR, Baliga BS, Warriar RP, Suskind RM. Iron deficiency reduces the hydrolysis of cell membrane phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate during splenic lymphocyte activation in C57BL/6 mice. *J Nutr*. **1998**, 128: 1077–1083
64. Ladefoged K, Jarnum S: Zinc deficiency during parenteral nutrition. *Metal Ions Biol Syst*. **1983**, 416-422
65. Laity JH, Andrews GK. Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1). *Arch. Biochem. Biophys*. **2007**, 463, 201-210
66. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **2005**, 201:233–240
67. Lee SJ, Cho KS, Koh JY: Oxidative injury triggers autophagy in astrocytes: the role of endogenous zinc. *Glia* **2009**, 57:351-361
68. Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO, Weaver CT. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* **2009**, 30:92–107
69. Leitzmann MF, Stampfer MJ, Wu K, Colditz GA, Willett WC, Giovannucci EL. Zinc supplement use and risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, 95, 1004-1007
70. Lichten, LA, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu. Rev. Nutr.* **2009**, 29, 153-176
71. Malavé I, Benaím IR. Modulatory effect of zinc on the proliferative response of murine spleen cells to polyclonal T cell mitogens. *Cell Immunol* **1984**, 89: 322-330
72. Malavé I, Rodriguez J, Araujo Z, Rojas I. Effect of zinc on the proliferative response of human lymphocytes: mechanism of its mitogenic action. *Immunopharmac.* 1990, 20:1-10
73. Mangan PR, Harrington LE, O’Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the Th17 lineage. *Nature* **2006**, 441:231–234
74. Maret W. Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers. *Antioxid. Redox. Signal* **2006**, 8, 1419-1441
75. Mariani E, Cattini L, Neri S, Malavolta M, Mocchegiani E, Ravaglia G, Facchini A. Simultaneous evaluation of circulating chemokine and cytokine profiles in elderly subjects by multiplex technology: Relationship with zinc status. *Biogerontology* **2008**, 7, 449–459
76. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua, DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain Th17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* **2007**, 8, 1390–1397
77. McGeachy M, Cua D. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. *Immunity* **2008**, 28(4):445-453
78. Mesna OJ, Steffensen IL, Hjertholm H, Andersen RA. Accumulation of metallothionein and its multiple forms by zinc, cadmium and dexamethasone in human peripheral T and B lymphocytes and monocytes. *Chem-Biol Interac.* **1995**, 94: 215-224
79. Mills CF. Zinc in Human Biology. Springer, UK, **1989**, pp 85-86

80. Mulhern SA et al: Supression of antibody response by excess dietary zinc exposure during certain stages of ontogeny. *Proc Soc Exp Biol Med* **1985**, 180: 453-461
81. Murakami M, Hirano T. Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Sci* **2008**, 99:1515-1522
82. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med* **2007**, 204:33-39
83. Nurieva R, Yang XO, Martinez G et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* **2007**, 448:480–483
84. Oppmann B, Lesley R , Blom B, Timans JC, Xu Y , Hunte B , Vega F , Yu N, Wang J , Singh K et al. Novel p19 Protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. **2000**, 13 : 715 – 725
85. Osati-Ashtiani F, King LE, Fraker PJ. Variance in the resistance of murine early bone marrow B cells to a deficiency in zinc. *Immunology* **1998**, 94:94–100
86. Oteiza PI, Clegg MS, Keen CL. Short-term zinc deficiency affects nuclear factor-kappaB nuclear binding activity in rat testes. *J Nutr*. **2001**;131:21–26
87. Peretz A et al: Zinc distribution in blood components, inflamatory status and clinical indexes of disease activity during zinc supplementation in inflamatory rheumatic diseases. *Am J Clin Nutr*. **1993** 57: 690-69437
88. Porter AG. Human tumour necrosis factors- and - : differences in their structure, expression and biological properties. *FEMS. Microbiol. Immunol.* **1990**, 2, 193–199
89. Prasad AS, Bao B, Beck FWJ, Kucuk O, Sarkar FH. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, 37, 1182–1190
90. Prasad AS. Clinical and biochemical manifestation zinc deficiency in human subjects. *J Pharmacol* **1985**, 16:344-352
91. Prasad AS. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *American J Clin Nutr* **1991**, 53: 403:12812-12819
92. Prasad AS: Zinc and immunity. *Ol Cell Biochem*, **1998**,188: 63-69
93. Prasad AS. Zinc: an overview. *Nutrition* **1995**, 11:93-99
94. Prasad AS, Fraker PJ, Walsh CT. Zinc: health effects and research priorities for the 1990s. *Environ Health Prospect.* **1994**,102: 5-46
95. Prasad AS. Zinc in human health: an update. *J Trace Elements Exp Med* **1998**, 11:63-87
96. Reinhold D, Ansorge S: Immunobiology of zinc and zinc therapy. *Immunol Today* **1999**, 20: 102
97. Renoux G, Guillsumin JM: Immunopharmacology and immunotoxicity of zinc diethyldithiocarbamate. *Int J Immunopharmac.* **1988**, 10: 489-493
98. Rink L, Gabriel P. Zinc and the immune system. *Proc Nutr Soc* **2000**, 541
99. Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nature Rev. Immunol.* **2011**, 11, 275–288
100. Rossowska MJ, Nakamoto T. Interaction between zinc and calcium in skeletal muscle in young growing rats. *Biol Tr Elem Res.* **1993**, 38: 301-309
101. Saha AR, Hadden EM, Hadden JW. Zinc induces thymulin secretion from human thymic epithelial cells in vitro and augments splenocyte and thymocyte responses in vivo. *International Journal of Immunopharmacology* **1995**, 17,729–733
102. Sakamoto KTA, Imamura S, Kita M. IL-17 is involved in Helicobacter pylori-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Helicobacter.* **2008**,13 (suppl) 1:13-17
103. Sandstead HH, Prasad AS, Penland JG, Beck FWJ, Kaplan J, Egger NG, Alcock NW, Carroll RM, Ramanujam VMS, Dayal HH et al. Zinc

- deficiency in Mexican American children: Influence of zinc and other micronutrients on T cells, cytokines, and anti-inflammatory plasma proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, 88, 1067–1073
104. Sandstead HH: Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *Am J Clin Nutr.* **1995** 61: 621S-624S
  105. Scott BJ, Bradwell AR. Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel, and calcium. *Clin. Chem.* **1983**, 29, 629-633
  106. Scuderi P. Differential effects of copper and zinc on human peripheral blood monocyte cytokine secretion. *Cell Immunol* **1990**, 126: 391-405
  107. Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of faltered resistance to infection, *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, 68, 447S–463S
  108. Shen F, Gaffen SL. Structure–function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine* **2008**, 41:92–104
  109. Sherman AR. Zinc, copper, and iron nutritive and immunity. *J Nutr* **1992**, 122: 694-609
  110. Shi G, Cox CA, Vistica BP, Tan C, Wawrousek EF, Gery I. Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. *J Immunol.* **2008**, 181:7205–7213
  111. Shi HN, Scott ME, Stevenson MM, Koski KG. Energy restriction and zinc deficiency impair the functions of murine T cells and antigen-presenting cells during gastrointestinal nematode infection, *J. Nutr.* **1998**, 128, 20–27
  112. Smith KL, Lawrence DA. Stimulation of murine lymphocyte responses by cations. *Cell Immunol* **1986**, 101: 425-439
  113. Sutton C, Breton C, Keogh B, Mills KH, Lavell EC. A crucial role for IL-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **2006**, 203 : 1685 – 1691
  114. Takabayashi K, Iwamoto I. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **2000**, 43 :2455 – 2463
  115. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, 57, 399-411
  116. Taylor KM, Vichova P, Jordan N, Hiscox S, Hendley R, Nicholson RI. ZIP7-mediated intracellular zinc transport contributes to aberrant growth factor signaling in antihormone-resistant breast cancer Cells. *Endocrinology* **2008**, 149, 4912-4920
  117. Treves S, Trentini PL. Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes. *Exp Cell Res* **1994**, 211: 339-343
  118. U.S. Department of Health and Human Services. Draft toxicological profile for zinc. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. USA **2003**
  119. U.S. National Library of Medicine, Toxnet Database 2010. <http://toxnet.nlm.nih.gov> Accessed: jan 2013.
  120. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* **1993**, 73, 79-118
  121. Vallee BL: The function of metallothionein. *Neurochem Int.* **1995**, 27:23-33
  122. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **2006**, 24:179–89
  123. Walker EM, Walker SM. Effects of iron overload on the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci* **2000**, 30: 354–365

124. Wan YY. Multitasking of helper T cells. *Immunology* **2010**, 130 2:166-71
125. Wang Y, Huang DS: Nutritional status and immune responses in mice with murine AIDS are normalized by vitamin E supplementation. *J Nutr.* **1994**, 124:2024-2032
126. Wang K, Zhou B, Kuo YM, Zemansky J, Gitschier J. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am. J. Hum. Genet.* **2002**, 71, 66-73
127. Warner GI, Lawrence DA. Cell surface and cell cycle analysis of metal-induced murine T cell proliferation. *Eur j Immunol* **1986**, 16: 1337-1342
128. Watts TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T-cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, 23, 23–68
129. Wellinghausen N, Driessen C, Rink L. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations. *Cytokine* **1996**, 8, 767-771
130. Wellinghausen N, Kirschner H: Immunobiology of zinc. *Immunol Today* **1997**, 18: 519-521
131. Wellinghausen N, Martin M, Rink L. Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation, *Eur. J. Immunol.* **1997**, 27, 2529–2535
132. Williams AJ, Khachigian LM, Shows T, Collins T. Isolation and characterization of a novel zinc-finger protein with transcription repressor activity. *J Bio Chem.* **1995**, 270: 22143–22152
133. WHO World Health Organization. Global database on child growth and malnutrition. Geneva **2002**
134. Winchurch RA, Togo J, Adler WH. Supplemental zinc restores antibody formation in cultures of aged spleen cells II. Effect on mediator production. *EUR J Immunol.* **1987**, 17: 127-132
135. Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, Regev A, Kuchroo VK. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature.* **2013** March Letter
136. Wuehler SE, Peerson JM, Brown KH. Use of national food balance data to estimate the adequacy of zinc in national food supplies: methodology and regional estimates. *Public Health Nutr.* **2005**, 8: 7:812-819
137. Yang, Y. et al. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J. Exp. Med.* **2009**; 206: 1549–1564
138. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ . *Immunity* **2008**; 28:29–39
139. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells, *J Immunol* **1995**, 155:5483-5486
140. Yasukawa, H., Sasaki, A., Yoshimura, A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, 18:143
141. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon, JJ, Kolls JK. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* **2001**, 194, 519–527
142. Zhao H, Eide D: The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**, 93:2454-2458
143. Zheng Y, et al. Interleukin-22, a Th17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* **2007**, 445:648–651

144. Zhou L, et al. IL-6 programs Th17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology* **2007**, 8:967–974
145. Zhou L, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$  function. *Nature*. **2008**, 8:453:236-240
146. Zhou X, Fragala MS, McElhaney JE, Kuchel GA. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2010**, 13, 541–547