



59
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFEECTO DE LA ADMINISTRACION DE ZINC SOBRE LA
INMUNOCOMPETENCIA DE RATONES CD1 CON EL
SINDROME DEL DESGASTE**



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
EDUARDO GONZALEZ MACOUZET

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

INDICE

CAPITULO	TITULO	PAGINA
1.	INTRODUCCION.	1
2.	ANTECEDENTES.	9
2.1.	EL SINDROME DEL DESGASTE	9
2.2.	INMUNOPATOLOGIA DEL SINDROME DEL DESGASTE	14
2.3.	EFFECTO DE LOS PRODUCTOS BACTERIANOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO	16
2.4.	EL ZINC COMO METAL ESENCIAL	19
2.5.	EL ZINC COMO ELEMENTO INMUNOESENCIAL	20
2.5.1.	El zinc y la respuesta humoral	21
2.5.2.	El zinc y la respuesta celular	22
2.5.3.	El zinc y la citotoxicidad mediada por células	23
2.5.4.	El zinc y la proliferación de linfocitos	23
2.5.5.	El zinc y los mediadores solubles de la inmunidad	24
2.5.6.	El zinc y las células fagocíticas	25
2.6.	REVERSIBILIDAD DE LOS EFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE ZINC	26
2.7.	ALGUNAS POSIBLES CAUSAS DE LA INMUNODEPRESION POR DEFICIENCIA DE ZINC	26
2.8.	ONTOGENESIS-ENVEJECIMIENTO-DIABETES	27
2.9.	EL ZINC COMO INMUNOMODULADOR	28
2.9.1.	Fagocitosis y liberación de histamina	28
2.9.2.	Proliferación de linfocitos	29
2.9.3.	Síntesis y liberación de citocinas	29
2.10.	ALGUNAS CONSECUENCIAS DEL EXCESO DE ZINC	30
2.11.	OTROS EFECTOS DEL ZINC	32

3.	MATERIAL Y METODOS	33
3.1.	MATERIAL	33
3.1.1.	Bacterias	33
3.1.2.	Animales	33
3.1.3.	GRC	34
3.1.4.	Complemento	34
3.1.5.	Zinc	34
3.2.	DISENO DEL EXPERIMENTO	35
3.3.	TECNICAS	36
3.3.1.	Inducción del síndrome del desgaste	36
3.3.2.	Administración del acetato de zinc	37
3.3.3.	Inmunización de los animales	37
3.3.4.	Cuenta de células formadoras de anticuerpos	38
3.3.5.	Análisis estadístico	39
4.	RESULTADOS	40
4.1.	CRECIMIENTO DE LOS RATONES	40
4.2.	RESPUESTA INMUNOLOGICA	41
5.	DISCUSION	51
6.	CONCLUSIONES	62
7.	APENDICE	64
8.	BIBLIOGRAFIA	68

El término desgaste se comenzó a utilizar con relativa frecuencia desde hace aproximadamente treinta años. En esa época se descubrió que el deterioro inmunológico provocado experimentalmente podía ocasionar anorexia, pérdida de peso, debilidad general, inanición caquexia y muerte. Todo este conjunto de síntomas asociados a las lesiones del sistema inmunológico, fue denominado "desgaste". Más adelante se pudo comprobar que las mismas manifestaciones podían ser producidas por diferentes factores; todos ellos tenían el común denominador de provocar lesiones inmunológicas algunas de ellas transitorias y otras definitivas. De este modo la enfermedad experimental se convirtió en un síndrome. Finalmente, el fenómeno del desgaste físico e inmunológico de los animales de laboratorio fue comparado con la condición en la cual se encontraban algunas personas con infecciones crónicas o cáncer en su etapa terminal.

Hace aproximadamente tres décadas, después del descubrimiento de los primeros casos de personas inmunodeficientes (1), se inició una nueva etapa de investigaciones clínicas sobre los mecanismos encargados de la defensa específica contra las infecciones. Las primeras inmunodeficiencias congénitas fueron llamadas "experimentos de la naturaleza" (2) porque permitieron obtener abundante

información sobre varios aspectos de la respuesta inmunitaria que habían sido desconocidos hasta ese momento. Sin embargo, las personas inmunodeficientes solo pudieron ser estudiadas hasta ciertos límites compatibles con las restricciones éticas de la sociedad.

El descubrimiento de animales de laboratorio con inmunodeficiencias primarias o congénitas (3) y la posibilidad de inducir inmunodeficiencias secundarias mediante ciertos procedimientos quirúrgicos (timectomía, burssectomía y la cateterización permanente del conducto torácico), abrieron otro camino importante para la inmunología experimental porque proporcionaron los modelos necesarios para ampliar considerablemente los primeros estudios inmunológicos que habían sido realizados en niños inmunodeficientes.

Desde entonces, los modelos experimentales de animales inmunodeficientes han sido utilizados ampliamente para estudiar los mecanismos inmunológicos que pueden estar alterados en diferentes circunstancias clínicas. Han tenido particular importancia los modelos animales inmunodeficientes en una forma secundaria porque están desnutridos, envejecidos, sometidos a diversos estímulos que les provocan "stress" o por que han sido intervenidos quirúrgicamente para extirparles el timo, la hipófisis u otras glándulas.

También han sido importantes los modelos animales que tienen comprometida, parcialmente o en forma transitoria las funciones de

algunas subpoblaciones de linfocitos. Estos animales inmunocomprometidos pueden simular la condición clínica de personas enfermas con algunas funciones inmunológicas deprimidas. En los últimos años se ha observado que, a lo largo de la vida de cualquier individuo, pueden actuar numerosos factores capaces de provocar diversos grados de inmunosupresión. Los factores inmunosupresores más conocidos, son las infecciones virales y bacterianas, la administración de ciertos antibióticos y esteroides, los compuestos utilizados en la quimioterapia de las enfermedades primarias, las intervenciones quirúrgicas, la exposición a radiación, el cáncer, la desnutrición, la edad avanzada, la contaminación ambiental, el hábito de fumar, la drogadicción, las quemaduras severas, los trastornos emocionales, etc.

Las personas inmunocomprometidas en una forma secundaria son una realidad mucho más frecuentes de lo que se había sospechado inicialmente (4). La mayor parte de ellas tienen la inmunidad comprometida en una forma transitoria y no manifiestan inmediatamente complicaciones graves. Pero de todos modos estas personas están expuestas al riesgo que representan ciertas infecciones inaparentes (virus oncogénicos, por ejemplo) cuyas consecuencias generalmente aparecen varios años más tarde y además, pueden tener facilitado el inicio de otras enfermedades, inmunológicas o no, para las cuales existe una predisposición genética.

Todas estas razones explican el creciente interés por la caracterización inmunológica de varios modelos animales que tienen inmunodeficiencias secundarias. Las investigaciones que se realizan sobre ellos permiten conocer mejor y más rápidamente las bases moleculares de varios trastornos inmunológicos humanos. Este es el caso, por ejemplo, de los estudios que se realizan con ratones inmunodeficientes que pueden ser injertados con linfocitos humanos y, posteriormente, utilizarlos para infectarlos con el virus del SIDA. Además, los modelos experimentales de animales inmunodeficientes también permiten el ensayo de diversos procedimientos terapéuticos que no pueden ser aplicados libremente en las personas enfermas.

Con la aparición del SIDA y el desarrollo exponencial de esta epidemia y con la confirmación del mal pronóstico que tiene toda persona infectada con el VIH, en los últimos años se ha observado una polarización del interés de los investigadores hacia los diferentes aspectos de esta nuevo síndrome. En las personas con SIDA han llamado la atención el deterioro progresivo del sistema inmunitario, las infecciones por oportunistas que inevitablemente se vuelven recurrentes y el desgaste físico que se instala en las etapas terminales de la enfermedad. Estos hechos devolvieron el interés por las enfermedades experimentales conocidas como síndromes desgastantes.

Nosotros hemos desarrollado un modelo animal experimental de

inmunodeficiencia selectiva que aparece secundariamente a una serie de inyecciones IP de S. aureus. La mayoría de los animales inyectados tienen atrofia del timo, pérdida de peso, incapacidad casi absoluta para producir anticuerpos, disminución de la tolerancia inmunológica oral y una tasa de mortalidad elevada a causa de infecciones intestinales que producen diarrea.

El cuadro clínico anterior ha sido denominado desgaste, sus principales manifestaciones han sido comparadas con las de personas que tienen enfermedades cancerosas avanzadas o algunas infecciones crónicas que también se complican con alguna inmunodeficiencia secundaria. La frecuencia elevada de infecciones en estos casos, ha motivado diversos estudios con el objetivo de reducir sus elevadas tasas de mortalidad.

Un grupo de investigadores ha tratado de encontrar nuevos y más potentes (así como también menos tóxicos) productos inmunoadyuvantes para aumentar la inmunogenicidad de las vacunas y para incrementar la inmunocompetencia de personas que a causa de una enfermedad primaria, tienen comprometidas algunas funciones de los linfocitos. Este grupo ha estudiado particularmente diversos productos bacterianos, varias hormonas del timo y algunos elementos traza como el zinc y el selenio.

El zinc es un elemento necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (5). Como el zinc es un componente esencial

para numerosas enzimas, su falta compromete el desarrollo del cuerpo en general y de numerosos órganos en particular (6). Se ha propuesto que en el caso de la desnutrición, la deficiencia de zinc, es la responsable de una gran parte del cuadro clínico así como también del deterioro de las funciones inmunológicas y de las infecciones asociadas (7). Las deficiencias del zinc provocan una atrofia del timo y las alteraciones de la respuesta inmunitaria humoral y celular (8). La administración de zinc en personas inmunocomprometidas ha mejorado la cantidad de linfocitos T circulantes y la calidad de la respuesta inmunitaria (9). El cuerpo humano adulto contiene aproximadamente dos gramos de zinc. Esta cantidad se encuentra distribuida en diferentes tejidos en donde el elemento tiene distintas concentraciones. Así por ejemplo, los espermatozoides y las células del plexo coroides contienen cantidades elevadas de zinc. Lo mismo el hígado, la próstata y varios tejidos más en donde el elemento alcanza concentraciones superiores a los 100 $\mu\text{g/g}$ de tejido.

En el suero, la concentración de zinc es de 90 $\mu\text{g/ml}$. En cambio en el calostro, alcanza 20 mg/l y 3 mg/l en la leche materna, pero esta última cantidad tiende a disminuir a medida que se prolonga la lactancia. Los requerimientos de zinc en los niños recién nacidos pueden ser de aproximadamente 3 mg/diarios (algo así como 1 mg/K de peso/día). En el adolescente estos requerimientos pueden

disminuir a menos de 1mg/K de peso/día. Las ratas requieren aproximadamente 40 µg de zinc diarios que deben estar contenidos en los alimentos y el agua. En niños desnutridos a los cuales se les ha tratado de mejorar su inmunocompetencia mediante la administración diaria de un suplemento de zinc, se les ha dado a beber una solución de acetato de zinc (15mM) en volúmenes que son suficientes para proporcionar una carga adicional del elemento entre 25 y 150 µmoles/K de peso/diarios (10). En otros casos, los niños han recibido 1 mg de zinc/K de peso/día (11). Otros autores han recomendado el tratamiento de los niños con 13 mg de acetato de zinc (aproximadamente 1 mg de zinc) por ml, administrando esta solución en dos o tres dosis por día, preferiblemente antes de las comidas.

En este trabajo, se plantea como hipótesis que la administración IP de un suplemento de acetato de zinc, en animales recién nacidos que recibieron inyecciones de estafilococos muertos, inhibirá el retraso del crecimiento y la aparición de alteraciones inmunológicas en el curso del síndrome del desgaste.

Desde hace tres años en el laboratorio de Inmunología en el Departamento de Biología, se ha estudiado un modelo experimental de inmunodeficiencia secundaria que se puede inducir en ratones recién nacidos mediante inyecciones IP de estafilococos muertos. Este tratamiento provoca una atrofia del timo, anulación transitoria de la respuesta de anticuerpos, diarreas frecuentes y una pérdida de peso

superior al 30 %. El objetivo de este trabajo es mostrar que, cuando el síndrome de desgaste es inducido mediante inyecciones IP de estafilococos, la administración de pequeñas cantidades de acetato de zinc puede impedir la aparición de sus principales síntomas y alteraciones inmunológicas.

2.1. EL SINDROME DEL DESGASTE.

El síndrome del desgaste es una enfermedad que tiene tres manifestaciones principales:

- a) Retraso del desarrollo pondoestatural de los animales.
- b) Depresión de la respuesta de anticuerpos.
- c) Susceptibilidad a infecciones por microorganismos oportunistas.

Puede ser provocada por diferentes procedimientos (12) y, según la técnica utilizada para su inducción, puede ser de carácter transitorio o definitivo.

En 1957 Billingham y Bernet (14) inocularon IP células linfohematopoyéticas alogénicas a ratones recién nacidos y observaron que éstos después de veinte o treinta días presentaban: retraso en el crecimiento así como diarrea y diversos grados de hipoplasia del sistema linfoide, además de lesiones en la piel y necrosis focal de tejido hepático (13), a este síndrome se le denominó "desgaste", el síndrome de "desgaste" o "runt disease". Para que se presente este síndrome se requiere que:

- 1) El injerto contenga células inmunológicamente competentes.
- 2) El receptor presente diferentes antígenos de histocompatibilidad al del injerto.

3) El hospedero sea incapaz de establecer una reacción inmunológica efectiva contra el injerto.

En 1962, Gowans (14) sugirió que los linfocitos pequeños eran los responsables de la enfermedad injerto contra hospedero y Medawar (1963) subsecuentemente lo postuló así (13).

La jerarquía del contenido de los linfocitos T, contra la enfermedad era la siguiente: las células más efectivas eran los linfocitos de sangre periférica, los del conducto torácico, las células de nódulos linfoides y en menor grado las células del bazo, mientras que los timocitos y las células de la médula ósea, eran relativamente no reactivos (13,14,15).

En ratones neonatos, el desarrollo del síndrome del desgaste se puede impedir si los animales se inyectan IP o IV, con células linfoides de donadores adultos singénicos sensibilizados contra los antígenos de las células injertadas, debido a que habilitan al hospedero con una respuesta inmunitaria competente. Los sueros homólogos antilinfocíticos eran más efectivos para proteger a los animales y podían revertir totalmente el curso de la enfermedad ya iniciada, por lo cual se propuso que el resultado fatal del síndrome no estaba causado por lesiones irreversibles producidas en la primera fase (14).

Por otro lado la mortalidad de estos grupos de animales se puede disminuir por la extirpación del bazo del hospedero, ya que la

mayoría de las células injertadas se establecen en este órgano (14). Además hay algunos fármacos inmunosupresores para prevenir el síndrome del desgaste.

El síndrome del desgaste se ha utilizado como un ensayo de laboratorio para estudiar las diferencias entre dos poblaciones de células linfoides (14), también como una prueba que permite medir la competencia de los linfocitos T de animales donadores sometidos a diferentes condiciones experimentales (16).

Existen otros medios que pueden inducir un síndrome de desgaste, con manifestaciones clínicas similares al cuadro clásico que se conoce como síndrome similar al desgaste (runt disease like).

Algunos métodos que lo originan son los siguientes:

- 1) Inoculaciones de acetato de cortisol, testosterona o estrógenos.
- 2) Timectomía neonatal.
- 3) Infección neonatal con: virus como el del polio y el de la linfocoriomeningitis (LCM).
- 4) Inoculación IP de estafilococos ó estreptococos del grupo A muertos (14,17,18).

En cualquiera de los casos anteriores para la inducción del síndrome semejante al desgaste, se han podido mitigar los síntomas, o no presentarse, cuando se realiza en ratones libres de gérmenes o cuando se les administran antibióticos (19,20,21). Por el

contrario el síndrome del desgaste clásico, si se presenta en ratones libres de gérmenes (20).

Después de la administración de los productos bacterianos, se observa una atrofia del timo y bazo, además, se ha encontrado una disminución en el número de linfocitos y un aumento de los PMN, pero no hay variación en el número de los monocitos. Cabe mencionar que se presenta un aumento en los niveles de IgM que es algo característico en el síndrome del desgaste.

La mayoría de los animales inoculados dentro de las primeras dos horas después de su nacimiento presentan todos los síntomas de la enfermedad experimental (sin discriminación de sexo), pero la incidencia de las manifestaciones decrece cuando la primera inoculación se aplica después de varias horas de nacidos (22).

A continuación se presenta un resumen de los principales síntomas y alteraciones patológicas que han sido descritas en animales con el síndrome del desgaste:

1) Daños corporales.

Inhibición y disminución progresiva del crecimiento

Postura encorvada

Adelgazamiento de la piel

Disminución de la grasa subcutánea

Alargamiento de orejas y cola

Felo raro

Microesplacnia y microsomia

2) Daños en el tejido linfoide.

Atrofia de médula ósea

Atrofia del timo

Atrofia de ganglios linfáticos

Aumento del tamaño del bazo

Linfopenia en sangre periférica

3) Alteraciones glandulares.

Atrofia de tiroides

Desarrollo incompleto de las glándulas salivales

Lesiones en la corteza de las suprarrenales

Degranulación de las células acidófilas

4) Alteraciones sexuales.

Ausencia de caracteres sexuales secundarios en los animales
de sexo masculino

Espermatogénesis incompleta

Esterilidad en los dos sexos

5) Otras alteraciones.

Focos de necrosis en el hígado

Reducción del número y tamaño de los hepatocitos

Osteoporosis

Desarrollo incompleto de los riñones

Anemia microcítica

Diarreas hemorrágicas

La frecuencia con la cual se presentan todas estas alteraciones, puede variar según el procedimiento utilizado para inducir el síndrome, la edad del animal, sexo, etc.

El síndrome del desgaste o inmunodeficiencia secundaria provocado mediante la administración de productos bacterianos, se caracteriza por una atrofia o hipoplasia considerable de varios órganos linfoides primarios y secundarios. Sin embargo las investigaciones publicadas han revelado que los animales desgastados, a pesar de la gravedad de las lesiones macroscópicas en el timo, bazo y ganglios linfáticos, sólo tienen deprimida su respuesta de anticuerpos contra antígenos timo dependientes. Después de dos semanas, el timo de los animales desgastados recupera la imagen histológica y el peso normal (23) y los ratones continúan su vida en una forma indistinguible a la de los ratones sanos.

2.2. INMUNOPATOLOGIA DEL SINDROME DEL DESGASTE.

Las lesiones más importantes se encontraron en la médula ósea, en los órganos linfoides primarios o secundarios y en varias glándulas del sistema endócrino (17).

Cuando el síndrome del desgaste fue provocado mediante la inducción de una reacción GvH sistémica, algunos investigadores (24)

observaron que los animales presentaban lesiones importantes en la mucosa del tubo digestivo, las cuales fueron consideradas como un daño indirecto o accidental de la reacción. Sin embargo algunos trabajos más recientes (25) han demostrado que en el curso de las reacciones GvH aumenta la producción de un factor necrosante de tumores (TNF) caquectina, particularmente cuando los animales se exponen a las endotoxinas.

Además, se ha comprobado que la caquectina administrada experimentalmente, puede provocar una necrosis intestinal en animales de laboratorio (26). Todas estas observaciones apoyan la idea de que el animal desgastado presenta una profunda alteración de su control inmunológico sobre la flora de bacterias comensales localizadas en el tubo digestivo, cuyos resultados apenas comienzan a ser explorados a un nivel molecular (27).

Según algunos autores, que se han ocupado extensamente de estudiar las alteraciones del sistema endócrino de los animales desgastados (17), el síndrome consiste en la expresión de una alteración en las interrelaciones que normalmente existen entre los sistemas inmunitario y neuro-endócrino. Por esta razón ha sido tan amplia la patología encontrada. Se ha considerado que el síndrome del desgaste viene a ser un modelo de la interacción anormal entre el timo y las diferentes glándulas del sistema endócrino y que el ataque a la integridad anatómica, el crecimiento, la diferenciación y las

funciones del timo, constituyen un prerrequisito básico para que aparezcan las principales manifestaciones de la enfermedad experimental.

2.3. EFECTO DE LOS PRODUCTOS BACTERIANOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO.

La membrana externa de las bacterias Gram negativas, es una bicapa lipídica, asimétrica que contiene a los LPS, fosfolípidos y proteínas (28,29). Esta membrana tiene un papel importante en la resistencia de las bacterias cuando interaccionan con los factores defensivos del hospedero y los antibióticos (30). El LPS está ligado a la superficie de la membrana externa bacteriana. Consiste en una región hidrofóbica conocida como lípido A, enlazado al oligosacárido central (core) y a la cadena O específica (31,32).

El lípido A purificado reproduce los síntomas del shock séptico causado por bacterias Gram negativas en humanos, por lo tanto, es el responsable de la toxicidad de los LPS (33). Estos últimos interactúan con los componentes celulares y humorales del sistema inmunitario e inducen la producción y secreción de las citocinas que son los verdaderos responsables de las manifestaciones tóxicas de las endotoxinas (34,35,36).

Las endotoxinas bacterianas (LPS) tienen efectos biológicos tanto benéficos como tóxicos en los animales susceptibles ya que se

ha demostrado que son potentes inmunógenos T independientes (31,36), estimuladores de ciertas subpoblaciones de células T (37), son potentes activadores policlonales de los linfocitos B (33,38) y pueden actuar como inmunomoduladores de la respuesta inmunológica hacia otros antígenos (36), estimulan la hematopoyesis y la adherencia de PMN (39,40). Por lo tanto, los LPS aumentan inespecíficamente

la resistencia a infecciones, estimulan la actividad anti tumoral de los fagocitos (36,41) así como la expresión de productos bacterianos sobre la membrana de las células (35,36).

Las endotoxinas son inmunógenos inductores de la síntesis de IgM, con fluctuaciones cíclicas debidas a los mecanismos de retroalimentación mediados por los anticuerpos (32). Son metabolizados lentamente y permanecen en los tejidos y macrófagos conservando sus propiedades inmunogénicas (42).

Los efectos nocivos más conocidos de las endotoxinas son : el daño celular directo al endotelio, fiebre, activación de la cascada de la coagulación, activación del sistema del complemento, hipotensión, hipoglicemia, granulocitopenia, trombocitopenia, espasmo arterial, anoxia, acidosis láctica, edema, degranulación de células cebadas, activación de la vía hexosa monofosfato inhibición de la quimiotaxis, generación y liberación de radicales del ion super óxido, liberación de enzimas hidrolíticas, activación de la cascada

del ácido araquidónico con producción de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, coagulación intravascular diseminada, agregación de plaquetas, contracción del músculo liso, necrosis de piel sangrado intestinal, shock y muerte (32,36,38,43,44,45,46,39,41).

Se ha demostrado que la mayoría de los efectos anteriores no son producidos directamente por los LPS, sino más bien se deben a la liberación de factores por los macrófagos (35,36).

También se ha visto que algunos componentes de las bacterias Gram positivas, tienen efectos similares sobre el sistema inmunitario.

El péptido glicano o mureína es un componente común de todas las paredes celulares en las eubacterias, principalmente las Gram positivas, que interactúan con el sistema del complemento activándolo e induciendo algunos síntomas de la enfermedad bacteriana (47,48).

Es un activador policlonal de linfocitos T y B (49) y un inmunógeno potente. Sus subunidades (muramil dipéptido, pentapéptidos,

pentaglicinas) son pirogénicas, producen lesiones inflamatorias en la piel, son inhibidores de la liberación de cininas y de la quimiotaxis de PMN, tienen actividad de inmunoestimulantes, activan macrófagos y aumentan la resistencia inespecífica a infecciones (47).

La bacteria Gram positiva S aureus presenta, además del péptidoglicano, otras sustancias con propiedades biológicas : los ácidos teicoicos, la proteína A, enzimas extra celulares y toxinas.

Los ácidos teicoicos son moderados activadores policlonales de

linfocitos T y B. Además aumentan la quimiotaxis de PMN mediada por complemento (49).

La proteína A es un mitógeno no específico de linfocitos T y B (50) que puede activar al sistema del complemento y aumentar la quimiotaxis de PMN (48), aunque interfiere junto con la cápsula de polisacáridos, con la fagocitosis y opsonización (47).

2.4. EL ZINC COMO METAL ESENCIAL

El zinc es necesario para el crecimiento normal, la reproducción y la supervivencia de los animales. Tiene un efecto benéfico en la reparación de tejidos y en la cicatrización de heridas.

La deficiencia severa de zinc en los humanos, ocasiona enanismo con hipogonadismo. En casos menos graves se puede observar hipogusia, inapetencia y mala cicatrización de las heridas. En animales (rata y pollo) se ha observado crecimiento retardado, deformidades embrionarias, lesiones tisulares y muerte (51).

La deficiencia de zinc se puede dar por un consumo insuficiente en la dieta o mala absorción como en la acrodermatitis enteropática (52).

La falta de zinc en la dieta ocasiona una rápida disminución de su nivel en la sangre.

El zinc es componente esencial de las siguientes enzimas animales (entre otras) :

- Deshidrogenasa láctica
- Fosfatasa alcalina
- Anhidrasa carbónica
- Procarboxipeptidasa
- Super óxido dismutasa

El zinc forma complejos con la insulina e interviene en su almacenamiento, liberación y acción (51,52).

El zinc es indispensable para la respuesta inmunitaria, interviene con las hormonas tiroideas responsables de la maduración y diferenciación de la línea de los linfocitos T (53).

El zinc es un elemento con propiedades inmunomoduladoras y su presencia en exceso puede ser perjudicial para el sistema inmunitario.

2.5. EL ZINC COMO ELEMENTO INMUNOESENCIAL.

(CONSECUENCIAS DE SU DEFICIENCIA)

Diversos estudios en ratones han mostrado que la deficiencia de zinc ocasiona atrofia del timo, reducción en la producción de anticuerpos, alteración en la función de los linfocitos T cooperadores, depresión en la actividad de las células T asesinas y daño a las células NK (54).

2.5.1. El zinc y la respuesta humoral.

La falta de zinc es una de las causas de la inmunodepresión que se observa en humanos con desnutrición proteico-calórica (55). La deficiencia de zinc afecta de una manera muy notoria la respuesta secundaria de anticuerpos (respuesta de memoria). La deficiencia de zinc provocada en ratones en el periodo entre el primero y segundo retos con GRC da lugar a una inhibición notoria en la formación de anticuerpos, asociada a una disminución en el número de células de memoria en el bazo.

La deficiencia de zinc en ratones NZB, disminuye la incidencia de autoinmunidad y la gravedad de ésta cuando se presenta. Tanto una deficiencia de zinc moderada, como severa, establecida antes de la aparición de signos de enfermedad hemolítica autoinmune, da lugar a una menor frecuencia en la aparición de anticuerpos antieritrocíticos. En los casos en los que se presenta la autoinmunidad, se observa una disminución en el título de autoanticuerpos IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b (56). Sin embargo la deficiencia inducida cuando ya ha comenzado la producción de autoanticuerpos, es incapaz de disminuir los títulos de anticuerpos antieritrocíticos y las concentraciones totales de IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, e IgG3. Esto muestra que la deficiencia de zinc afecta los eventos iniciales del establecimiento de una respuesta humoral autoinmune.

Una alteración en el metabolismo del zinc podría ser una de las causas de la inmuno depresión que se observa en los ancianos. El zinc "in vitro" ($10^{-5}M$) estimula la producción de anticuerpos por células de bazo de ratones ancianos, en los que está normalmente reducida. En cambio, su efecto es mínimo en células de ratones jóvenes.

La distribución del zinc después de administrarlo a ratones ancianos, es diferente a la que existe en ratones jóvenes. Hay además reportes que indican que el envejecimiento está asociado a alteraciones en los niveles de zinc en la sangre (57).

Hay reportes de una reducción en la respuesta a antígenos T dependientes y T independientes y disminución en la afinidad de los anticuerpos producidos ante su antígeno. Se ha reportado también, en la deficiencia de zinc, una inhibición de la respuesta a un antígeno T dependiente, con recuperación en esta respuesta al readministrar el zinc y una disminución en el número de CFA, asociada a una alteración en las cantidades relativas de las distintas inmunoglobulinas en el suero (58).

2.5.2. El zinc y la respuesta celular.

Algunos estudios de la deficiencia de zinc, reportan efectos como los siguientes: linfocitopenia e infecciones recurrentes en humanos, disminución en el número de células en el bazo, menor

crecimiento de este órgano y timo, reducción en la cuenta leucocitaria en ratones deficientes durante el período posnatal, linfopenia con un aumento en la proporción de células T supresoras, disminución en la proporción de cooperadoras. Se ha observado que en los ancianos, al aumentar el contenido de zinc en la dieta, hay un aumento en el número de linfocitos circulantes y una estimulación en las reacciones de hipersensibilidad retardada (58).

2.5.3. El zinc y la citotoxicidad mediada por células.

La inducción de la deficiencia de zinc en ratones Balb/c da lugar a una anulación en la respuesta citotóxica a la inoculación de células tumorales. Sin embargo, la deficiencia de zinc afecta el crecimiento tumoral (independiente de sus efectos sobre el sistema inmunitario), lo que podría ser la causa de al menos una parte de la reducción en la respuesta citotóxica, aunque la inhibición inducida por la falta de zinc en el desarrollo de tumores es total.

2.5.4. El zinc y la proliferación de linfocitos.

La mayoría de los estudios reportan que la falta de zinc in vivo o in vitro ocasiona una inhibición en la respuesta proliferativa a mitógenos. Sin embargo algunos pocos estudios han encontrado que la deficiencia de zinc en animales de laboratorio no afecta la respuesta proliferativa a mitógenos.

Se ha observado una baja respuesta proliferativa a mitógenos, en linfocitos de pacientes con acrodermatitis enteropática (enfermedad genética de mala absorción de zinc), corregible mediante la adición de zinc en la dieta.

2.5.5. El zinc y los mediadores solubles de la inmunidad.

El zinc es un cofactor esencial de la hormona tímica o FTE (59). La falta de zinc en la dieta de ratones, ocasiona una disminución marcada en los niveles séricos de este péptido. La timulina (llamada FTS) es un péptido producido por las células epiteliales del timo, su actividad biológica esta ligada a la presencia del zinc. La hormona junto con el metal, induce la diferenciación de células T y mejora su funcionamiento (60).

La disminución en los niveles del FTS es paralela a una reducción en el número de células de bazo formadoras de rosetas E, es decir una disminución en el número de células T (61). La disminución en los niveles de la hormona tímica podría ser la causa de la atrofia tímica y de las alteraciones en el número y las funciones de las células T, en la deficiencia de zinc.

Normalmente, las células mononucleares de sangre periférica de pacientes Mantoux-positivos producen LIF al ser estimuladas con PPD. La presencia de fenantrolina (agente quelante del zinc) in vitro, durante todo el tiempo de cultivo, disminuye o anula la producción de

LIF, estimulada por el PPD. Cuando la producción de este factor es estimulada por FHA (estímulo inespecífico), la adición de fenantrolina no tiene ningún efecto. Se puede producir el mismo efecto inhibitorio eliminando a los macrófagos del cultivo. Como explicación a estos resultados, se piensa que la falta de zinc altera procesos posteriores a los eventos iniciales de la activación (que son acontecimientos asociados a la membrana) y que posiblemente en la deficiencia de zinc se dé un bloqueo en algún producto de los monocitos estimulados. Se ha evaluado también la capacidad del zinc de regular in vitro la producción y la actividad de otras linfocinas, como la IL-2 y la IL-4.

2.5.6. El zinc y las células fagocíticas.

La falta de zinc tiene un efecto preferencial sobre las células fagocíticas inmaduras de la sangre y el bazo, mientras que no afecta a las células maduras peritoneales.

El zinc es también un posible agente modulador de la diferenciación celular e inhibidor de los monocitos, en concentraciones normales (62). Hay una menor respuesta quimiotáctica (medida con la cámara de Boyden utilizando endotoxina de E. coli como quimioatrayente) y una disminución en la capacidad de fagocitar C. albicans por los PMN de la sangre de monos Rhesus que han estado deficientes en zinc durante el período de desarrollo de su sistema inmunitario.

2.6. REVERSIBILIDAD DE LOS EFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE ZINC.

En muchos casos se reporta que hay una restauración de las funciones del sistema inmunitario después de reincorporar el zinc a la dieta (58,63), pero la deficiencia de zinc puede ocasionar alteraciones difíciles de revertir.

2.7. ALGUNAS POSIBLES CAUSAS DE LA INMUNODEPRESION POR DEFICIENCIA DE ZINC.

Se ha propuesto que un aumento de los niveles de los corticoesteroides en la sangre, sea la causa de la inmunodepresión en la deficiencia de zinc, pero algunos estudios muestran que este fenómeno no es importante. La deficiencia de zinc en ratones ocasiona una reducción en las funciones de las células T cooperadoras, paralela a un aumento en los niveles plasmáticos de los corticoesteroides. Se piensa que la deficiencia de zinc estimula el eje hipotálamo-hipófisis-corteza suprarrenal. Sin embargo, al adrenalectomizar a los ratones deficientes en zinc, para disminuir los niveles de los corticoesteroides, no se logra una recuperación notoria de funciones de células T. Los ratones deficientes en zinc adrenalectomizados, presentan solo una mejoría parcial en la respuesta humoral a eritrocitos de carnero (58,59).

2.8. ONTOGENESIS-ENVEJECIMIENTO-DIABETES.

El sistema inmunitario es espacialmente sensible a la deficiencia de zinc durante su desarrollo. (5) Fraker (58) menciona estudios que muestran alteraciones graves en el sistema inmunitario en ratones que han sufrido falta de zinc durante la gestación, lactancia o las primeras horas de vida. Estas alteraciones incluyen desorden de las cantidades relativas de las inmunoglobulinas (ausencia de IgM, IgG2a, IgA, y niveles elevados de IgG1), cuenta leucocitaria disminuida, baja respuesta de anticuerpos e inhibición en el crecimiento del bazo y timo. Este último efecto no se revierte al aumentar el consumo de zinc en los neonatos afectados.

El papel del zinc en la respuesta inmunitaria se ha estudiado también en relación con el envejecimiento y la diabetes. En los ancianos se observan frecuentemente estados de inmunodepresión. En humanos se observa que la administración diaria de zinc, durante un mes, estimula la respuesta humoral y celular en ancianos aparentemente sanos, sin embargo, no se ha evaluado el estado nutricional del zinc antes de la suplementación, por lo que es difícil atribuir el estímulo a un aumento en los niveles del zinc, en el organismo (58).

El posible papel del zinc en la inmunodepresión que se observa en los individuos con diabetes, es menos claro. Se han reportado anomalías en las funciones del sistema inmunitario en ratones con

diabetes genética. También en ratones diabéticos se han encontrado niveles séricos de zinc bajos y, un aumento en la excreción urinaria de este elemento.

2.9. EL ZINC COMO INMUNOMODULADOR.

El zinc puede alterar o regular diversas funciones del sistema inmunitario, según se ha visto en estudios que presentan concentraciones normales y elevadas de este metal in vivo e in vitro.

2.9.1. Fagocitosis y liberación de histamina.

El zinc presente, normalmente en la sangre es posiblemente un factor importante en la regulación de funciones como la fagocitosis, lisis intracelular y la liberación de histamina.

El zinc y la colchicina, ambos inhibidores de la liberación de la histamina, no tienen efectos aditivos y el óxido de deuterio previene el efecto del zinc. Además, el zinc en presencia de calcio, muestra una curva dosis-respuesta indicativa de inhibición competitiva.

El zinc no afecta la primera fase de la liberación de la histamina (fase no dependiente del calcio), sino la segunda (fase dependiente del calcio). Las concentraciones capaces de ejercer este efecto, son concentraciones alrededor de las concentraciones fisiológicas (64).

Se ha reportado una inhibición en la capacidad fagocítica de macrófagos de ratón, debida a la administración de zinc en exceso (54). En las células adherentes de sangre periférica de ratones deficientes en zinc hay un aumento en la expresión de receptores para complemento y Fc. Esto muestra que posiblemente las concentraciones normales de zinc in vivo tengan un papel, regulando las funciones y la diferenciación de los monocitos (62).

2.9.2. Proliferación de linfocitos.

El zinc (Zn^{2+}) puede tener actividad mitogénica. El Zn^{2+} in vitro ($10 \mu M$), es capaz de inducir la proliferación de linfocitos de hamsters, aumentando la respuesta a LPS. En cambio no afecta la respuesta a Con A. Concentraciones mayores ($50 \mu M$) inhiben la respuesta a mitógenos en células del bazo y de nódulos linfáticos (65). Las células estimuladas a proliferar por el zinc (en ausencia de otros mitógenos) son principalmente linfocitos T.

2.9.3. Síntesis y liberación de citocinas.

La deficiencia in vitro de zinc ocasiona una disminución en la producción de LIF, en linfocitos humanos. Esta inhibición es reversible por la adición de zinc.

El zinc en concentraciones de 10^{-6} a 10^{-4} M inhibe notoriamente la producción de MIF, en linfocitos de cobayo estimulados por

ovalbumina, antígeno al que estos cobayos han sido previamente inmunizados (66).

Por otra parte, el zinc es capaz de inducir la proliferación y la producción de IL-2, además de aumentar el número de células con receptores para IL-2 en el bazo. La proliferación inducida por el zinc es abatida al añadir anticuerpos anti IL-2 y anti interferon γ . Los resultados con una línea dependiente de IL-2 sugieren que el zinc no modula la capacidad de la IL-2 de unirse a un receptor, mientras que los otros resultados sugieren que la activación de linfocitos por el zinc es un fenómeno dependiente de la IL-2 y el γ IF (67).

2.10. ALGUNAS CONSECUENCIAS DEL EXCESO DE ZINC.

No sólo la deficiencia del zinc es perjudicial para el sistema inmunitario, el exceso de este elemento en el organismo también altera la respuesta inmunitaria. Esto se puede observar en las células NK.

El zinc in vitro (7.6×10^{-5} M a 6.1×10^{-4} M) disminuye en forma proporcional a la concentración, la actividad de NK de células de bazo y células peritoneales de ratón, evaluada con lisis de células de linfoma marcadas con Cr^{51} .

Se ha visto en diversos estudios que el exceso de zinc es capaz de afectar los distintos tipos de toxicidad mediada por células (NK y T) y el desarrollo ontogénico del sistema inmunitario. La adición

de altas cantidades de zinc a la dieta (200 ppm) durante un periodo que comprende la gestación, la lactancia y un tiempo después del destete o durante la lactancia y el periodo postdestete, ocasiona una disminución en el número de CFA.

Se han encontrado casos de intoxicación, como resultado de guardar alimentos o bebidas en recipientes galvanizados. Los síntomas que presentan los individuos intoxicados son : nauseas, vómito, calambres abdominales y diarreas, frecuentemente con sangre (68).

Un caso reportado, indica que una mujer que recibió 440-660 mg $ZnSO_4$ (110-116 mg Zn) diariamente durante diez meses, desarrolló una deficiencia de cobre con anemia y neutropenia. Por otra parte, los resultados de personas que fueron tratadas durante seis semanas, no presentaron la deficiencia de cobre (68).

Otros reportes de la ingestión de zinc a una concentración de 100 a 300 mg diarios, incluyen alteraciones en la respuesta inmune y en los perfiles lipídicos de la sangre.

Cuando once voluntarios recibieron 300 mg de zinc diarios durante seis semanas, la función inmune se deprimió severamente en comparación a cuando se administraron dosis de 100 mg diarios, durante tres meses. Los once voluntarios que recibieron 300 mg de zinc diarios, presentaron un aumento de LDL y una disminución de HDL (68).

2.11. OTROS EFECTOS DEL ZINC.

Se ha estudiado el papel del zinc como agente protector de la inmunotoxicidad de otros elementos.

En ratones, la administración de zinc evita el aumento en el número de células de bazo formadoras de anticuerpos, el aumento en la respuesta a mitógenos y el desbalance en las subpoblaciones de linfocitos T se presentan al administrar cadmio en forma crónica (69).

El zinc además presenta un efecto inhibitorio aditivo al del cadmio (70). Se propone como mecanismo de acción, un efecto competitivo del zinc con el cadmio por sitios de unión en proteínas de las células involucradas.

Por último, el zinc no antagoniza notablemente con el níquel en su efecto inhibitorio de las células Nk. cuando ambos son administrados paralelamente a ratones (71).

3.1. MATERIAL

a) Bacterias

Se utilizó una cepa de Staphylococcus aureus que se obtuvo del Cepario del Departamento de Biología de la Facultad de Química y se cultivó en BHI, a 37°C en agitación constante durante 18 horas. Las bacterias se lavaron tres veces con SSI estéril. Posteriormente se inactivó por calor a 121°C y 15 lb de presión durante 30 minutos. Los estafilococos se recolectaron por centrifugación y finalmente se ajustaron nefelométricamente a una concentración de 5×10^9 bacterias/ml de SSI. La suspensión se conservó a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

b) Animales

Se utilizaron 136 ratones CD1 recién nacidos, los cuales permanecieron durante toda la investigación bajo condiciones convencionales.

Cada camada se mantuvo con la madre durante las tres primeras semanas de vida. Al destete, los animales se alimentaron ad libitum con purina y agua.

c) Glóbulos rojos de carnero (GRC)

La sangre de carnero se obtuvo en el Bioterio de la Facultad de Veterinaria. Esta sangre se obtiene en condiciones de esterilidad y se mezcla con solución anticoagulante de ALSEVER. En el momento de su uso, los GRC se preparan por centrifugación, y se lavan tres veces con SSI y se resuspenden en la misma solución, hasta ajustar la concentración y la cantidad requerida.

d) Complemento

Se obtuvo un pool de suero de cobaycs (85 aproximadamente) donados por el Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Este suero se separó en viales con volúmenes de 5 ml cada uno y se conservó a -72°C , hasta el momento de su uso.

El suero con el que se trabajó durante toda la investigación, perteneció al lote obtenido el día 27 de Junio de 1990.

e) Acetato de zinc

Se utilizó acetato de zinc granular, marca Mallinckrodt perteneciente al lote B740 KCJR.

Fórmula: $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

3.2. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Los ratones CDI fueron separados al azar en varios grupos con el fin de estudiar el efecto de dos variables y la combinación de las mismas sobre su capacidad de sintetizar anticuerpos. Las dos variables fueron: la inoculación IP de productos bacterianos y el tratamiento con acetato de zinc. Para confirmar los efectos de la primera variable, desde el momento de su nacimiento los animales fueron separados en tres grupos y, antes de cumplir dos horas de nacidos, comenzaron a recibir, cada tercer día y durante cuatro semanas, una serie de inyecciones IP de acuerdo a la modificación propuesta al esquema de EKSTEDT. Un grupo de ratones recibió inyecciones IP de 0.1 ml de una suspensión de estafilococos inactivados y ajustados a una concentración de 5×10^9 células/ml; los animales del otro grupo solo recibieron inyecciones IP de SSI y, finalmente, los ratones del tercer grupo no fueron inyectados. Para conocer los efectos de la segunda variable, los animales de los dos primeros grupos fueron separados en tres subgrupos cada uno, según fueran o no a recibir 2.5 ó 10 mg de acetato de zinc diluido en SSI, en una dosis IP cada tercer día durante cuatro semanas. De este modo se formaron siete grupos de ratones cuyas condiciones experimentales se describen a continuación.

GRUPO	INOCULACIONES IP	TRATAMIENTO CON ACETATO DE ZINC (mg/dl)
C ³	(-)	(-)
I	ESTAFILOCOCCOS	(-)
II	ESTAFILOCOCCOS	2.5
III	ESTAFILOCOCCOS	10.0
IV	SSI	(-)
V	SSI	2.5
VI	SSI	10.0

C³ (GRUPO CONTROL)

Una vez terminadas las inoculaciones, se dejó descansar a los ratones de tres a cuatro días , para inocularlos con una sola dosis de GRC y finalmente, cinco días después realizar el conteo de células formadoras de anticuerpos anti-GRC.

3.3. TECNICAS

3.3.1. Inducción del síndrome del desgaste

La enfermedad experimental fue provocada en ratones recién

nacidos. Los animales seleccionados tenían menos de dos horas de edad cuando comenzaron a recibir por vía IP 0.1 ml de la suspensión de estafilococos muertos. Esta dosis se repitió cada tercer día durante cuatro semanas.

3.3.2. Administración del acetato de zinc

Se prepararon dos soluciones de acetato de zinc a una concentración de 2.5 y 10 mg/dl en SSI estéril. Las soluciones fueron administradas a los ratones de dos grupos problema (que recibían las inyecciones de estafilococos) y también a los animales de dos grupos control (que solo habían recibido SSI por vía IP).

Otros tres grupos de ratones (inyectados con estafilococos, SSI y el grupo control) no recibieron ninguna dosis del elemento traza. De este modo, cada animal recibió, por vía IP y cada tercer día, un volumen de 0.1 ml de la solución correspondiente a su grupo experimental. El ciclo de inoculaciones de acetato de zinc, se prolongó durante cuatro semanas y fue aplicado al mismo tiempo que las dosis de estafilococos, desde el día del nacimiento de cada animal.

3.3.3. Inmunización de los animales

Al final de los experimentos, todos los ratones fueron inmunizados IP con una sola dosis de una suspensión de GRC al 15% en SSI (esta inmunización no debe pasar de cinco días después de la

última inoculación de su correspondiente variable).

3.3.4. Cuenta de células formadoras de anticuerpos

Cinco días después de la inmunización, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a la extracción del bazo de cada uno de ellos para preparar las respectivas suspensiones de células esplénicas que sirvieron para contar las cantidades de linfocitos que formaban anticuerpos anti-GRC. El procedimiento utilizado fué la modificación de Cunningham (72) a la técnica propuesta inicialmente por Jerne (73). Los linfocitos del bazo fueron suspendidos en solución de Hank fría y ajustados a 5×10^6 células viables/ml. Posteriormente se mezclaron 400 μ l de la suspensión celular ajustada, más 400 μ l de suero de cobayo, adsorbido con GRC y diluído 1:10 en solución de Hank mas 200 μ l de una suspensión de GRC al 8% en solución de Hank. Con esta mezcla se llenaron las cámaras, que luego, de sellarlas con parafina, fueron incubadas durante una hora a 37°C. Con una lámpara se contó el número de halos de hemólisis presentes en la placa, esta cifra se ajustó como la cantidad de linfocitos formadores de placas hemolíticas/ 1×10^6 células esplénicas, tomando en cuenta que cada 200 μ l de la mezcla, contenían 0.4×10^6 células esplénicas.

3.3.5. Análisis estadístico

Se utilizó una prueba de varianza (74) para calcular el grado de significancia estadística de las diferencias entre las cantidades de células formadoras de anticuerpos (CFA) encontradas en cada grupo experimental.

CAPITULO. 4. RESULTADOS.

4.1. CRECIMIENTO DE LOS RATONES

Los ratones del grupo I (inoculados con estafilococos muertos) presentaron un retraso en el crecimiento. Estos ratones no aumentaron de peso como los del grupo C (control) y los del grupo IV (inoculados con SSI estéril). En la gráfica número 1 se presenta la diferencia promedio de los pesos obtenidos durante las cuatro semanas de inoculación. Al final de las cuatro semanas, los ratones inoculados con estafilococos, pesaban en promedio, un 30.7% menos que los ratones del grupo control.

Los ratones del grupo IV (inoculados con SSI estéril) presentaron una baja del 8.3% de peso en comparación a los ratones del grupo C (control).

Los animales inoculados con estafilococos muertos presentaron las otras características clásicas de la enfermedad: debilidad generalizada y postura encorvada. En este grupo de animales hubo una mayor mortalidad, que en los otros grupos.

Los ratones del grupo V (inoculados con acetato de zinc 2.5 mg/dl) y los del grupo II (inoculados con una mezcla de acetato de zinc 2.5 mg/dl y una suspensión de estafilococos muertos) crecieron a una tasa similar a los ratones del grupo C (control), ya que estos

sólo perdieron un 5.7 y un 30.2% en peso respectivamente. Estos dos grupos de ratones no sufrieron ningún cambio físico. La tasa de mortalidad de estos grupos fué igual pero sin ser elevada, la diferencia de peso de estos dos grupos, se puede observar en la gráfica número 2.

Los animales del grupo VI (inoculados con acetato de zinc 10 mg/dl) y los del grupo III (inoculados con una mezcla de acetato de zinc 10 mg/dl y una suspensión de estafilococos muertos), crecieron a una tasa más lenta y se observó una pérdida de peso del 9.7 y 17.6% respectivamente. En estos dos grupos de animales, algunos presentaron un desgaste físico, otros más no sólo tenían disminuido su peso y tamaño sino que llegaron a presentar los síntomas del síndrome del desgaste: postura encorvada y debilidad generalizada. La diferencia de pesos se puede observar en la gráfica número 3.

4.2. RESPUESTA INMUNOLOGICA

Los ratones del grupo I (inoculados con estafilococos muertos) deprimieron significativamente su capacidad de producir anticuerpos anti-GRC. Presentaron una franca disminución de la respuesta humoral hacia los GRC respecto a los ratones del grupo C (control) y los ratones del grupo IV (inoculados con SSI estéril).

Los valores de la media fueron de $11 \text{ CFA}/10^6$ linfocitos esplénicos de los ratones del grupo I, mientras que en el grupo C, la

media fue de 492 CFA/ 10^6 linfocitos esplénicos, y en el grupo IV la media fue de 418.2 CFA/ 10^6 linfocitos esplénicos.

Los animales del grupo V (inoculados con acetato de zinc 2.5 mg/dl) presentaron un aumento considerable en la formación de CFA, los linfocitos productores de anticuerpos se elevaron hasta 1049 por millón.

En los animales del grupo II (inoculados con una mezcla de acetato de zinc 2.5 mg/dl y una suspensión de estafilococos muertos) se observó un aumento significativo del número de CFA. Los linfocitos productores de anticuerpos se elevaron hasta 785 por millón, contra valores de 11 CFA/ 10^6 linfocitos esplénicos de los animales del grupo I.

Los animales que recibieron un exceso de zinc, grupos III y VI (inoculados con una mezcla de una suspensión de estafilococos muertos y acetato de zinc 10 mg/dl, y los que se inocularon únicamente con acetato de zinc 10 mg/dl respectivamente) presentaron una depresión de la respuesta contra GRC. La media del grupo III fue de 142 CFA/ 10^6 linfocitos esplénicos y la del grupo VI fue de 68 CFA/ 10^6 linfocitos esplénicos. En la tabla número 1 se muestra de una manera simplificada los resultados obtenidos durante la investigación. La tabla número 2 presenta los resultados del análisis de varianza. Las graficas 4,5 y 6 muestran de una manera ilustrativa, las diferencias que existen en la producción de CFA * 10^6 células esplénicas de los diferentes grupos analizados.

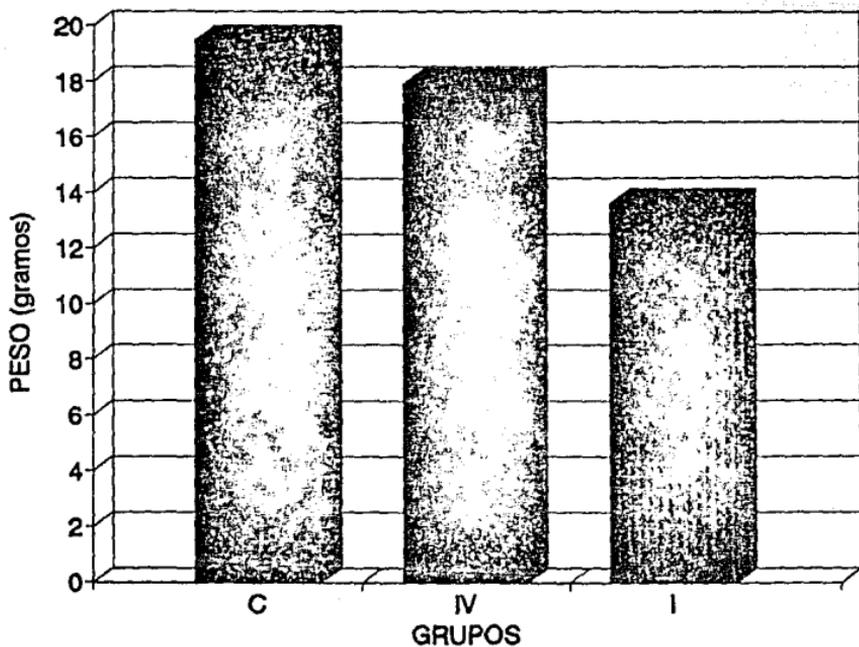
GRUPO	INOCULACION IP	ZINC mg/dl	N	CFA/ $\frac{1}{X} \cdot 10^6$	DS	P
C	(-)	(-)	19	490.6	85.34	(-)
I	<u>S. aureus</u>	(-)	20	10.9	4.03	<<0.01
II	<u>S. aureus</u>	2.5	18	843.5	124.33	<0.01
III	<u>S. aureus</u>	10	20	57.7	24.91	<<0.01
IV	SSI	(-)	17	418.6	65.04	>0.2
V	SSI	2.5	19	1049.4	132.30	<0.01
VI	SSI	10	20	141.8	89.50	<0.05

C (GRUPO CONTROL)

Tabla 1.- Contenido de CFA/ $1 \cdot 10^6$ de linfocitos esplénicos, expresados como la media (\bar{x}) y su correspondiente desviación estándar (DS), en cada uno de los siete grupos experimentales. N equivale al número de animales para cada grupo. El valor de P se obtuvo por un análisis de varianza.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	SUMA DE CUADRADOS AJUSTADA	MEDIAS DE CUADRADOS	F	P
INOCULACION IP	2	2115131	2255075	1127538	82.16	<0.001
TRATAMIENTO CON ZINC	2	15242548	15242548	7621274	555.31	<<0.001
TOTAL	132	19114390				

Tabla 2.- Resultados del análisis de varianza según programa GLM (modelo lineal general) incluido en el sistema MINITAB, 7.1, para el análisis estadístico de datos por computadora (74).



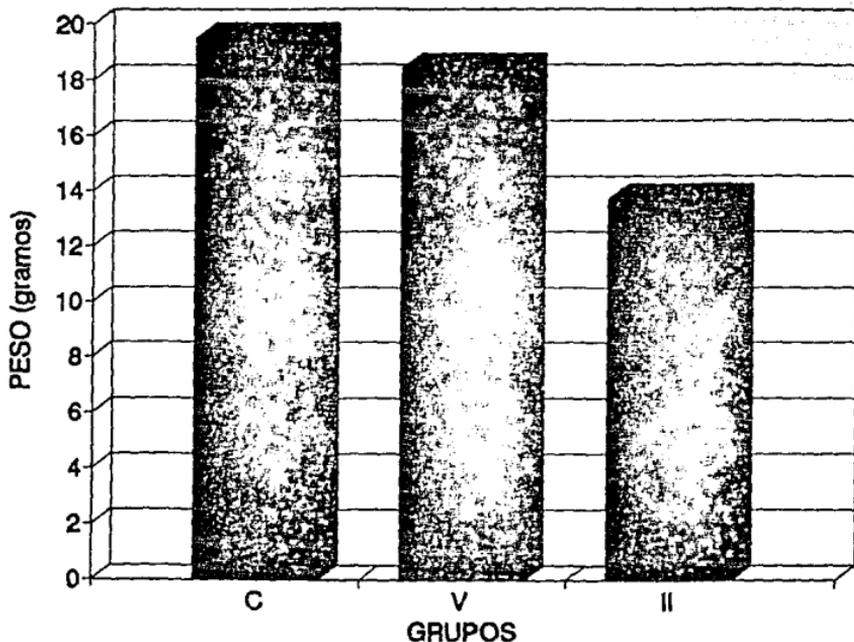
Gráfica número 1.-

Peso promedio al final del experimento de los ratones incluidos en los grupos C, IV y I

Grupo C (control)

Grupo IV (SSI)

Grupo I (S aureus)



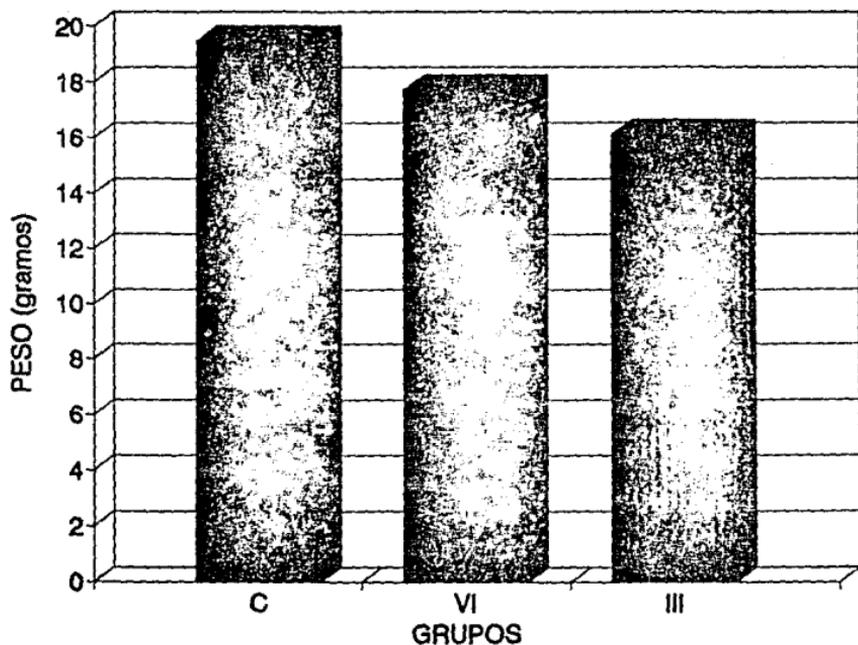
Gráfica número 2.-

Peso promedio al final del experimento, de los ratones incluidos en los grupos C, V y II.

Grupo C (control)

Grupo V (Zn 2.5mg)

Grupo II (Zn 2.5mg/S aureus)



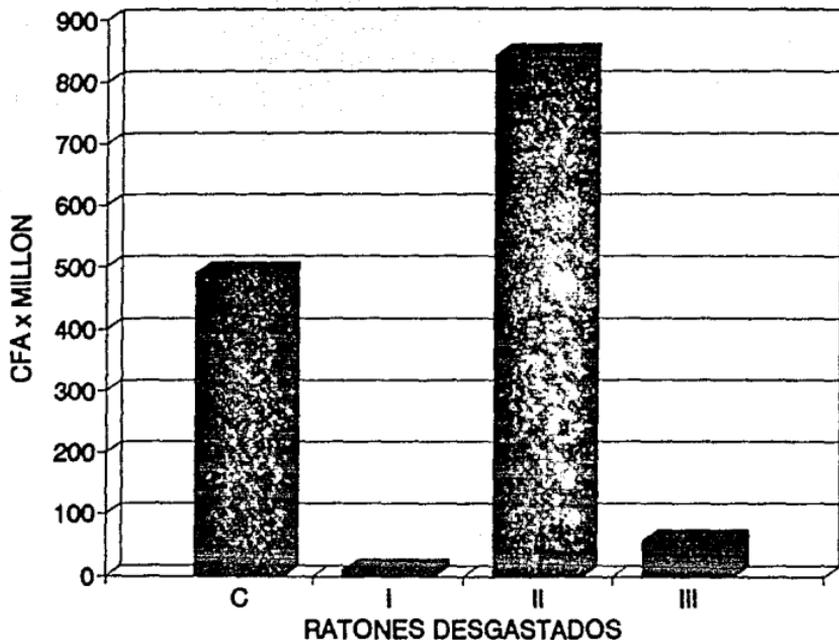
Gráfica número 3.-

Peso promedio al final del experimento de los ratones
incluidos en los grupos C, VI y III

Grupo C (control)

Grupo VI (Zn 10mg)

Grupo III (Zn 10mg/S aureus)



Gráfica número 4.-

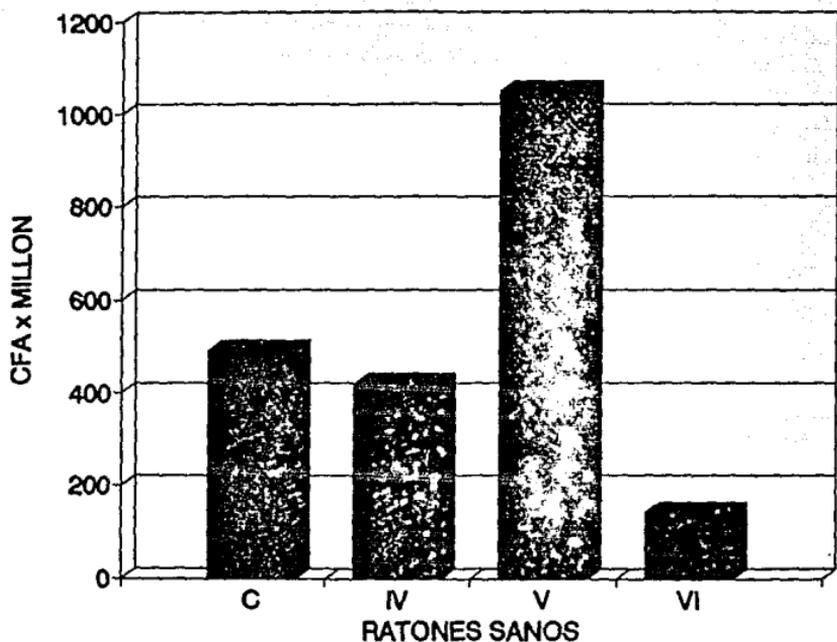
Cantidades promedio de linfocitos formadores de anticuerpos (CFA), por cada millón de células esplénicas, en los ratones desgastados de los grupos I, II, III y del grupo control (C) de ratones sanos

Grupo C (control)

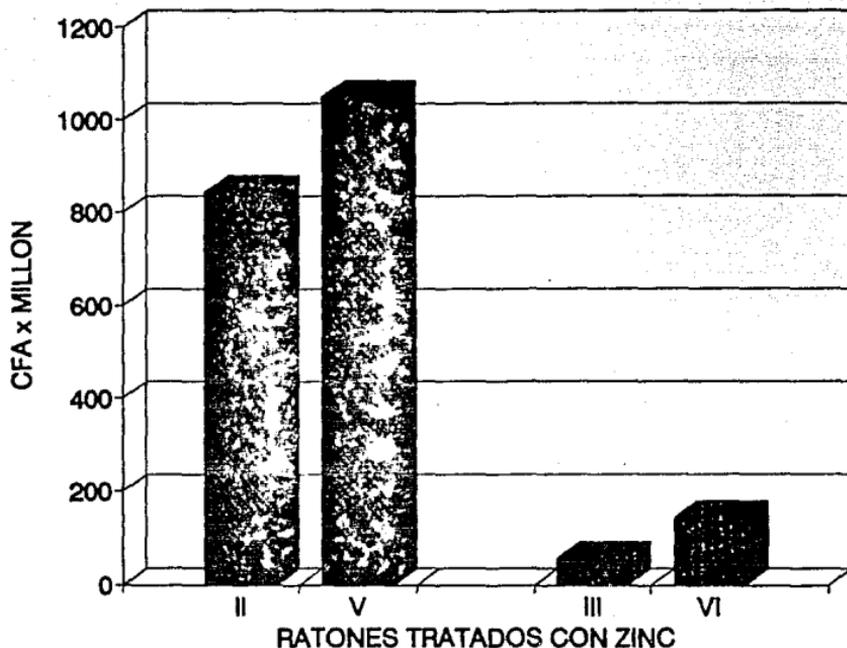
Grupo I (S aureus)

Grupo II (Zn 2.5mg/S aureus)

Grupo III (Zn 10mg/S aureus)



Gráfica número 5.-
 Cantidades promedio de linfocitos formadores de anticuerpos (CFA) por cada millón de células esplénicas, en los ratones sanos de los grupos IV, V, VI y del grupo control (C)
 Grupo C (control)
 Grupo IV (SSI)
 Grupo V (Zn 2.5mg)
 Grupo VI (Zn 10mg)



Gráfica número 6.-

Cantidades promedio de linfocitos formadores de anticuerpos (CFA) por cada millón de células esplénicas, en los ratones sanos y desgastados que recibieron 2.5 ó 10mg de acetato de zinc. A un lado de la gráfica se presentan los valores promedio de los ratones de los grupos II y V que recibieron 2.5mg de zinc. Mientras que del otro lado de la gráfica están los valores promedio de los ratones de los grupos III y VI que recibieron 10mg de zinc. Se puede apreciar que, independientemente de su condición de animales sanos o desgastados, los ratones respondieron en una forma completamente diferente cuando recibieron una u otra dosis del elemento traza.

Grupo II (Zn 2.5mg/S aureus), Grupo V (Zn 2.5mg), Grupo III (Zn 10mg/S aureus) y Grupo VI (Zn 10mg).

CAPITULO. 5. DISCUSION.

Las inyecciones IP de estafilococos muertos y la aparición del síndrome del desgaste, provocaron alteraciones significativas de los mecanismos inmunológicos que controlan la producción de anticuerpos. Mientras estuvo presente la enfermedad experimental, disminuyó la cantidad de linfocitos esplénicos que formaban placas hemolíticas (CFA) después de una inmunización IP con GRC.

Los ratones desgastados presentaron un retraso significativo en su desarrollo, de tal modo que al final del experimento, pesaban un 30.7% menos que los animales sanos del grupo control.

La pérdida de peso se atribuye a la anorexia de los animales desgastados, los cuales disminuyeron la ingesta del alimento que siempre les fué administrada ad libitum (purina). Conforme aumentaba la serie de inyecciones con la suspensión de estafilococos muertos, se observó que se acertaban los signos y síntomas del desgaste, entre los cuales destacaron el aletargamiento, la indiferencia ante estímulos leves y pérdida del apetito. Durante la lactancia (tres semanas), todas estas manifestaciones se presentaron en una forma atenuada, probablemente por la cercanía de

la madre que presentaba una fuente de alimento fácilmente alcanzable. La gráfica número uno, muestra la diferencia en peso promedio que existe entre el grupo control y los inoculados con estafilococos muertos.

Fué evidente que los animales inyectados con estafilococos, disminuyeron su ingesta de alimentos y que, como una consecuencia, al final de las inoculaciones presentaban un franco cuadro clínico de desnutrición avanzada.

Teóricamente, la pérdida de peso pudo estar influida por otros factores. Por ejemplo, la activación de los macrófagos peritoneales por los productos de los estafilococos, pudo haber estimulado la liberación de IL-1 y caquetina durante un lapso prolongado.

Debido a que la desnutrición provoca una inmunodeficiencia secundaria que ha sido reconocida y estudiada extensamente (75), fue necesario considerar la posibilidad de que los animales desgastados se encontraran inmunodeficientes por su desnutrición y no por las inyecciones IP de estafilococos (22). Por otra parte, fue necesario tomar en cuenta la influencia del "stress" sobre la alimentación y el grado de desnutrición (76), aunque el uso de ratones control inyectados con SSI estéril permitió comprobar que los efectos de éste último factor, no fueron significativos.

En la gráfica número uno se muestra la ligera pérdida de peso

en promedio, del 8.3% en relación al grupo control, que sufren los ratones inoculados con SSI estéril. Esta ligera pérdida de peso se atribuye al "stress" ocasionado por las inoculaciones con SSI que recibieron cada tercer día y durante cuatro semanas, juntamente con la manipulación a la cual fueron sometidos, ya que en este grupo de ratones no se observa falta de apetito ni alteraciones físicas (pelo erizado, encorvamiento, diarrea, etc).

Este grupo de ratones puede ser considerado como un segundo control, ya que la SSI estéril, no altera la función fisiológica del organismo.

La bibliografía consultada, ha revelado que la desnutrición, provoca una atrofia del timo tanto en niños, como en animales de experimentación (77), la cual, es parecida a la de nuestros animales desgastados (78).

En lo que se refiere a la depresión inmunológica del grupo de ratones inoculados con estafilococos muertos, respecto a los ratones del grupo control (grupo C) y los inoculados con SSI estéril (grupo IV), se puede observar en la tabla número uno la gran diversidad que existe entre las cantidades de $CFA/1 \times 10^6$ linfocitos esplénicos. Esta depresión inmunológica se puede explicar de acuerdo a la forma en la cual se ocasionó el síndrome del desgaste.

En este trabajo la enfermedad del desgaste fue provocada por una serie de inoculaciones IP de estafilococos muertos.

Posteriormente los animales fueron inmunizados con una suspensión de GP de carnero. Los resultados revelaron una depresión de la respuesta humoral. Desde un punto de vista teórico, este abatimiento de la respuesta inmunitaria humoral de los animales desgastados se puede explicar por varios mecanismos.

1) Los estafilococos inyectados durante cuatro semanas pueden saturar la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales y, por consiguiente deprimir sus funciones como células presentadoras de antígenos, en una forma similar al bloqueo después de inyectar carbón, partículas inertes de látex o sílica (79).

Por otra parte, también se deben tener en cuenta otros experimentos que logran facilitar la respuesta de anticuerpos mediante la inyección de varias suspensiones de bacterias (80) o de sus productos (81).

2) Es posible que ocurriera una competencia antigénica entre los estafilococos y los GPC, similar a la encontrada por Radovich y Talmage (82) cuando, con cuatro días de intervalo utilizaron eritrocitos de caballo y de carnero para inmunizar un grupo de ratones. La disminución de la respuesta de anticuerpos contra los antígenos del segundo inmonógeno ha sido explicada mediante varias teorías (83). Sin embargo, en el caso de los ratones desgastados, la competencia antigénica no permite explicar todo el conjunto de síntomas y signos que han sido encontrados en los animales

experimentales.

3) Algunos productos bacterianos son estimulantes de la actividad de los linfocitos T supresores (84). En otros casos se ha comprobado que la fagocitosis de ciertos parásitos bloquea la capacidad de los macrófagos para liberar IL-1 y anula la estimulación de células T colaboradoras necesarias para una buena respuesta humoral (85). Es evidente que existen diversos factores, bacterianos o no, que pueden trastornar la modulación de la respuesta inmunitaria o provocar una depresión transitoria en la síntesis de anticuerpos.

Ninguna de estas posibilidades fue explorada en el curso del presente trabajo debido a que su estudio no formaba parte de los objetivos. Sin embargo, a todo lo largo de los diferentes experimentos, se tuvo presente que cualquiera de ellas podía suprimir transitoriamente la respuesta de anticuerpos, tal y como fue observado en el grupo de ratones desgastados. Conviene tener presente que, hasta ahora, todavía no se han aclarado las bases moleculares de los mecanismos que participan en la inducción del desgaste.

Los animales del grupo I (inoculados con estafilococos muertos) presentaron un desgaste notorio, en parte debido a la anorexia de los ratones. Esta disminución en la ingesta de alimentos provocó una desnutrición, posiblemente proteico-calórica, en la cual se observa

una disminución de las concentraciones séricas y tisulares del zinc, la deficiencia de este elemento traza afecta de una manera muy notoria la respuesta secundaria de anticuerpos (respuesta de memoria).

La deficiencia de zinc provocada en ratones durante el período comprendido entre el primero y segundo retos con GRC, da lugar a una inhibición notoria en la formación de anticuerpos, asociada a una disminución en el número de células de memoria en el bazo.

La administración de varias dosis de acetato de zinc a una concentración de 2.5 mg/dl, dió origen a una producción muy elevada de $CFA/1 \times 10^6$ linfocitos esplénicos y a un crecimiento normal de los animales. Estos dos acontecimientos fueron observados tanto en el grupo de ratones inoculados solamente con zinc, así como los inoculados con una mezcla de la suspensión de estafilococos y zinc (en este último se observa una pérdida de peso, mayor). El aumento notorio de CFA es comparado con nuestro grupo control, la gran diferencia de valores se puede observar en las tablas números uno y dos.

El grupo de ratones inoculados únicamente con acetato de zinc a una concentración de 2.5 mg/dl presentó un desarrollo muy similar a los del grupo control (tamaño, pelo, apetito, comportamiento, etc). Como se puede observar en la gráfica número dos, el peso de estos animales tiene una pérdida en promedio de 5.7% de peso en relación a

los controles y de solo 2.6% en comparación a los inoculados con SSI estéril, lo cual sugiere que esa falta de peso se debe al "stress" al cual son sometidos estos animales durante la serie de inoculaciones, que reciben desde el momento de su nacimiento. Este mismo fenómeno asociado al efecto de los productos bacterianos, puede ser la causa de la pérdida de peso de un 30.2% en comparación con el grupo control, de los ratones inoculados con la mezcla de la suspensión de estafilococos muertos y acetato de zinc (ver párrafos anteriores sobre el efecto que causan los productos bacterianos).

Como se puede observar en la tabla número uno, existe una diferencia considerable en cuanto al número de CFA producidas por el grupo control y la de los grupos que recibieron únicamente zinc y los que recibieron la mezcla de estafilococos muertos y zinc. Este aumento de CFA se puede deber al importante papel que desempeña el zinc como elemento inmunoesencial.

Estudios realizados con hamsters, revelan que el zinc in vitro a una concentración de μM es capaz de inducir la proliferación de linfocitos obtenidos de nódulo linfático.

Por otra parte se puede pensar que el aumento de las CFA se deba a que el zinc es capaz de inducir la producción y la liberación de IL-2, además de aumentar el número de células con receptores para IL-2 en el bazo.

Otra causa por la cual se puede explicar el aumento de CFA en

estos grupos de ratones, se puede deber a que el zinc es esencial para un buen desarrollo del sistema inmunitario (ontogénesis), ya sea durante la gestación, la lactancia o las primeras horas de vida. Los dos grupos de ratones que fueron inyectados con dosis IP de 2.5 mg de zinc, recibieron un suplemento extra de zinc además del adquirido durante la lactancia.

Los datos anteriores pueden mostrarnos la importancia que tiene un suplemento de zinc en la dieta, ya que esto facilita y mejora el desarrollo del sistema inmune en relación a los animales que solo recibieron el zinc, primeramente por la leche materna y posteriormente por el metal incluido en el alimento purina.

La ontogénesis, proliferación de linfocitos, producción de IL-2 y de receptores para la misma, son etapas y mecanismos de suma importancia para lograr una buena respuesta humoral, pero si además existe un suplemento de zinc, los resultados se verán favorecidos notablemente como se observó en este trabajo. Estos resultados aparecen en la tabla número uno y, en las gráficas 2,4,5 y 6.

Los animales inoculados IP con acetato de zinc a una concentración de 10 mg/dl mostraron datos interesantes.

El grupo de ratones que fué inoculado únicamente con acetato de zinc (10 mg/dl), presentó una pérdida de peso de un 9.7% en relación al grupo control, lo cual puede ser atribuido al "stress" al cual fue sometido por las inoculaciones IP que recibieron desde el momento de

su nacimiento.

Los animales que recibieron la mezcla de estafilococos y acetato de zinc a una concentración de 10 mg/dl presentaron una pérdida de peso, mayor, ya que esta fue de un 17.6% respecto al grupo control. Esta pérdida solo puede ser atribuida al desgaste que provocan los estafilococos muertos. Los resultados obtenidos en los grupos de ratones que recibieron un suplemento de zinc y estafilococos muertos a una concentración de 2.5 y 10 mg/dl fueron diferentes. Los inculados con zinc a una concentración de 2.5 mg/dl y estafilococos muertos, presentaron una pérdida de un 30.2% en peso comparado con el grupo control y los inculados con zinc a una concentración de 10 mg/dl y estafilococos muertos, únicamente perdieron un 17.6% en peso con respecto al grupo control. Estas diferencias se observaron únicamente en la pérdida de peso, ya que los animales no presentaron síntomas de diarrea y erizamiento del pelo.

En el caso de los ratones que recibieron zinc a una concentración de 10 mg/dl y estafilococos muertos, puede pensarse que la mayor administración de zinc, evitó la aparición del desgaste. En este grupo de animales la pérdida de peso fue menor.

La respuesta inmunológica de los ratones tratados con zinc a 10 mg/dl fue inferior a la de los ratones del grupo control. Esta depresión es más notoria en el grupo de ratones que recibieron la

mezcla de zinc a 10 mg/dl y estafilococos muertos, como se puede observar en la tabla número uno y en las gráficas números 3,4,5 y 6.

La disminución en el número de anticuerpos puede ser el resultado de una dosis tóxica de zinc, la cual ocasiona una depresión del sistema inmunitario.

La adición de altas cantidades de zinc a la dieta (200 ppm) durante un periodo que comprende la gestación, la lactancia y un tiempo después del destete o durante la lactancia y el periodo postdestete, ocasiona una disminución en el número de CFA. El exceso de zinc ocasiona además una deficiencia secundaria de minerales. Esto muestra que el sistema inmunitario es especialmente sensible al exceso de zinc durante su desarrollo (86).

Es importante notar que aunque la depresión causada por una dosis de 10 mg de zinc fue significativa, las cantidades de CFA no disminuyeron hasta los valores obtenidos en el grupo de ratones que fueron sometidos únicamente al tratamiento IP con estafilococos muertos. Por lo tanto se puede decir que, en los ratones tratados con esta dosis, no es posible distinguir si la depresión de la síntesis de anticuerpos se debe al desgaste o a las inyecciones de un exceso de zinc.

Debido a que el exceso de zinc ocasiona una deficiencia secundaria de minerales, se puede plantear que esta consecuencia

provoque una alteración directa o indirectamente de los mecanismos que conducen al desarrollo de una adecuada respuesta inmunitaria.

CAPITULO. 6. CONCLUSIONES.

En esta investigación como en algunas otras realizadas por el Departamento de Biología de la Facultad de Química, acerca de la inducción de la enfermedad del desgaste en ratones CDI, utilizando estafilococos muertos inculados IP a una concentración de 5×10^9 células/ml en solución salina estéril, ésta sigue dando resultados satisfactorios para nuestros propósitos, ya que se observa una disminución de la respuesta inmunológica y un deterioro físico del animal.

Las investigaciones realizadas con S. aureus, han sido de mucha utilidad, ya que la enfermedad del desgaste (con todas sus manifestaciones) es semejante a diversas enfermedades inmunológicas que se presentan en los humanos. Por consiguiente este modelo experimental, abrió las puertas a nuevas investigaciones, con el fin de lograr una disminución parcial o total de las manifestaciones clínicas que se presentan en este tipo de enfermedades (diabetes tipo I, cáncer, SIDA, desnutrición, etc).

Los resultados del trabajo, confirman la utilidad del acetato de zinc como inmunoestimulante. En este caso, las inyecciones con el acetato de zinc sirvieron para la profilaxis del síndrome del

desgaste. Esto es importante debido a que sugiere que los ratones tratados con estafilococos muertos presentan un trastorno de la inmunomodulación que puede ser prevenido o corregido.

Debido a que el zinc actúa como inmunomodulador, es de gran importancia manejar una concentración adecuada de acetato de zinc en la profilaxis, ya que una falta o exceso del elemento trace, puede traer resultados diferentes a los esperados por el investigador.

Para lograr un mejor conocimiento del zinc en el organismo, es importante que en las siguientes investigaciones, se realice una determinación espectrofotométrica del elemento trace, en diversos sistemas del organismo (sangre, timo, bazo, ganglios, etc).

CAPITULO. 7. APENDICE.

1) Abreviaturas.

SIDA	Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
IP	Intra Peritoneal
IV	Intra Venoso
LCM	Linfocoriomeningitis
Ig	Inmunoglobulina
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
LPS	Lipopolisacáridos
PMN	Polimorfonucleares
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
PPD	Derivado Proteico Purificado
NK	Asesinas Naturales
NZB	Nueva Zelanda Negro
FTS	Factor Timico Sérico
LIF	Factor Inhibidor de la migración de Linfocitos
PHA	Fitohemaglutinina
IL	Interleucina
Fc	Fracción Constante de las inmunoglobulinas
Con A	Concanavalina A
γ - IF	Interferon γ
CFA	Células Formadoras de Anticuerpos
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
GRC	Globulos Rojos de Carnero
SSI	Solución Salina Isotónica
CFP	Células Formadoras de Placas Hemolíticas
BHI	Infusión Cerebro Corazón
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos

2). Ingredientes de Alimento Utilizado (purina):

Cereales molidos, combinaci3n de pastas oleaginosas, harinas de origen animal, subproductos de cereales, subproductos alimenticios agr3colos e industriales, melaza de caña de azúcar, alfalfa deshidratada, vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina, cloruro de colina, vitamina B 12, pantotenato de calcio, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

Carbonato de calcio, roca fosforica, cloruro de sodio, fosfato dicálcico, carbonato de cobalto, óxido cúprico, óxido férrico, sulfato ferroso, óxido de manganeso, yoduro de potasio, tiosulfato de sodio y óxido de zinc.

3) Composición química (nutrientes) del alimento utilizado

Proteína	23.00 %	Arginina	1.50 %
Cisteína	0.32 %	Glicina	1.20 %
Histidina	0.55 %	Isoleucina	0.95 %
Leucina	1.70 %	Lisina	1.28 %
Metionina	0.41 %	Fenilalanina	1.03 %
Treonina	0.84 %	Triptofano	0.35 %
Valina	1.21 %	Grasa	2.50 %
Fibra	5.80 %	TND	75.00 %
ELN	48.50 %	Cenizas	7.30 %
Calcio	1.00 %	Fósforo	0.60 %
Potasio	1.10 %	Magnesio	0.21 %
Sodio	0.40 %	Cloro	0.50 %
Fluor	35.00 ppm	Hierro	198.00 ppm
Zinc	58.00 ppm	Manganeso	51.00 ppm
Cobre	18.00 ppm	Cobalto	0.40 ppm
Yodo	1.70 ppm	Energía	4.25 KCal/g
Tiamina	1.00 ppm	Riboflavina	8.00 ppm
Niacina	95.00 ppm	A.pantoténico	23.00 ppm
A.fólico	5.90 ppm	Piridoxina	6.00 ppm
Biotina	0.07 ppm	B 12	10.00 mcg/lb
Vitamina A	12.50 UI/g	Vitamina D	3.00 UI/g

5) Solución Anticoagulante de Alsever

Glucosa	2.050 g
Citrato de sodio	0.800 g
Acido citrico	0.055 g
Cloruro de sodio	0.420 g

Aforar hasta 100 ml con agua destilada, esterilizar por filtración a través de una membrana Millipore con poros de 0.45 μ de diámetro, esta solución se mantiene a 4°C.

6) Solución Salina Balanceada de Hank (BSS)

Solución	I	Solución	II
d-glucosa	10.00 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.86 g
KH ₂ PO ₄	0.60 g	KCl	4.00 g
Na ₂ HPO ₄	1.84 g	NaCl	80.00 g
Rojo de Fenol	0.01 g	MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.00 g
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.00 g

Los componentes de las dos soluciones se disuelven en agua desionizada. se aforan hasta 1000 ml. Las soluciones se esterilizan por filtración.

La solución final se prepara con 5 ml de la solución I más 5 ml de la solución II. Luego se afora hasta 50 ml con agua desionizada. La solución final se conserva a 4°C hasta el momento de su uso.

7) Preparación de la suspensión de S aureus. 5×10^9 células/ml

Debido a que la suspensión original de estafilococos, contenía

una concentración de 2×10^{10} células/ml, se tomó un mililitro de esta suspensión por tres mililitros de SSI estéril.

8) Preparación de la mezcla de S aureus. y la sal de zinc

Para realizar esta mezcla, se tomaron por duplicado las concentraciones de acetato de zinc y de los estafilococos, para que al momento de hacer la mezcla, no se pierda la proporción de 1:1.

1. BRUTON, G. C. :
Agamma globulinemia.
Pediatrics, 1952, 9 : 722.
2. GOOD, R. A. ; ZAC, S. J. :
Disturbances in gamma globulin synthesis as "experiments of nature".
Pediatrics, 1956, 18 : 109.
3. SHULTZ, L. D.; SIDMAN, C. L. :
Genetically determined murine models of immunodeficiency.
Ann. Rev. Immunology, 1987, 5 : 367.
4. SHEARER, W. T. ; ANDERSON, D. C. :
The secondary immunodeficiencies.
En : Immunologic disorders in infants and children, editado por STIEHM, E.R., tercera edición. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1989, pag. 400.
5. KEEN, C.L.; GERSHWIN, M.E. :
Zinc deficiency and immune function.
Ann. Rev. Nutr., 1990, 10 : 415.
6. DE WYS, W; PORIES, W.J. ; RICHTER, M.C.; STRAIN, W.H.
Inhibition of Walker 256 carcinosarcoma growth by dietary zinc deficiency.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1970, 135 : 17.

7. GOLDEN M.H.N., GOLDEN B.E., HARLAND, P.S.E.G., JACKSON A.A. :
Zinc and immunocompetence in protein energy malnutrition.
Lancet. 1978, 1 : 1226.

8. VERMAN P.C., GUPTA R.P., SADANA J.R., GUPTA R.K.P. :
Effect of experimental zinc deficiency and repletion on some immunological variables in guinea pigs.
BRIT. J. NUTR., 1988, 59 : 149.

9. DUCHATEAU J., DELEPESSE G., VRIJENS R. COLLET H. :
Beneficial effects of oral zinc supplementation on the immune response of old people.
AMER. J. MED. 1981, 70 : 1001.

10. GOLDEN M.H.N., GOLDEN B.E.
Effect of zinc supplementation on the dietary intake, rate of weight gain, and energy cost of tissue deposition in childrens recovering from severe malnutrition.
Amer. J. Clin. Nutr., 1981, 34 : 900.

11. PATRICK J., GOLDEN B.E., GOLDEN M.H.N.
Leucocyte sodium transport and dietary zinc in protein energy malnutrition.
Amer. J. Clin. Nutr. 1980, 33 : 617.

12. SCHLESINGER, M. ; MARX, R. :
Wasting disease induced in young mice by administration of cortisol acetate.
Science, 1964, 143 : 965.

13. SANTOS G. W., HESS A. D., VOGELSANG G. E.
Graft versus Host reactions and disease.
Immunol. Rev. 1985. 88, 169.
14. BILLINGHAM R., SILVERS W.
Graft vs Host reactions , In : The immunobiology of Transplantation.
Prentice Hall Inc. 1976. 149.
15. GREBE S. C., STREILEIN J. W.
Graft vs Host reactions.
Adv. Immunol. Dixon F. J.-Kunkel H. G. 1976. 22, 119. Academic Press
16. GOZES Y., UMIEL T., MESHOFER A., TRAININ N.
Syngenic GvH induced in popliteal lymph nodes by spleen cells of old C57BL/6 mice.
J. Immunol. 1978. 121, 2199.
17. PIERPAOLI N., SORKIN E.
Hormones, thymus and lymphocyte functions.
Experientia 1972. 15, 11, 1365.
18. EKSTED R., HAYES L. L.
Runt disease induced by non-living bacterial antigens.
J. Immunol. 1967. 98, 1, 110.
19. KEAST D.
Role of bacterial endotoxin in the Graft vs Host syndrome.
J. Infect. Dis. 1973. 128, Suppl 1., s 104.

20. JUTILA J. W.

Etiology of the wasting disease.

J. Infect. Dis. 1973. 128, Suppl 1, S 99.

21. AZAR H.A.

Bacterial infection and wasting in neonatally thymectomized rats.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1964. 116, 817.

22. EKSTED R. D. , NISHIMURA E. T.

Runt disease induced in neonatal mice by sterile bacterial vaccines.

J. Exp. Med. 1964, 120, 795.

23. KIND, P. ; CAMPBELL, P.; ROWLANDS, D.T. :

Endotoxin-induced wasting disease in mice : a temporary condition explained by endotoxin tolerance.

Proc. Soc Exp. Biol. Med., 1967. 125 : 495.

24. ELSON, C. O.; REILLY, R.W. ; ROSEMBERG, H. :

Small intestine injury in the GvHR : an innocent bystander phenomenon.

Gastroenterology, 1977, 72 : 886.

25. NESTEL, F. P. ; SEEMAYER, T. A. ; LAPP, W.S. :

Cachectin production during acute GvH reaction.

FASEB J., 1988, 2 : A448 (abstract).

26. SUNG, X-m. ; HSUEH, W. :

Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activation factor.

J. Clin. Invest., 1988, 81 : 1328.

27. PEKALA, P.H. ; PRICE, S.R. ; HORN, C.H. ; HCM, E.E. ; MOSS, J. ; CERAMI, A. :
Model for cachectin in chronic disease : secretory products of endotoxin-stimulated macrophages induce a cachectic state in 3T3-L adipocytes.
Trans. Assoc. Amer. Physicians, 1984, 97 : 251.
28. JANN K., JANN B.
Polysaccharide antigens of Escherichia coli.
Rev. Infect. Dis.1987, 9 Suppl 5 s517.
29. BENTLEY A. T., KLEBBA P.E.
Effect of LPS structure on reactivity of antiportin monoclonal antibodies with the bacterial cell surface.
J. Bacteriol.1988 170, 1063.
30. BRAUN V.
Molecular and the cell wall of Escherichia coli.
J. Infect. Dis.1973, 129 Suppl s9.
31. LUDERITZ G., TANAMOTO., GALANOS.
Lipopolysaccharides: Structural principles and biological activities.
Symposium I. Rev. Infect. Dis.1984 6, 428.
32. MORRISON D. C., RYAN J. L.
Bacterial endotoxins and host immune responses.
Adv. Immunol.1979 28, 293.

33. RIETSCHEL E. T., BRADEL L., BRANDENBURG M.
Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic Lipid A.
Rev. Infect. Dis.1987, 9 Suppl 5 s527.
34. TESH V. L., MORRISON D. C.
The physical chemical characterization and biologic activity of serum released LPS.
J. Immunol.1988. 141, 3525.
35. MORRISON D. C., FVAN J. L.
Endotoxins and disease mechanism.
Ann. Rev. Med.1987, 38, 417.
36. MORRISON D. C., URBASCHEK B.
The effects of bacterial endotoxins on the host mediation systems.
Am J. Pathol.1978, 71, 527.
37. MEI-GUEY L., MORRISON D. C.
Specific endotoxic LPS-binding proteins on murine splenocytes.
J. Immunol.1988, 141, 3, 996.
38. MADONNA G. S., PETERSON J. E., RIBI E. E., VOGEL S. N.
Early phase endotoxin tolerance: Induction by a detoxified Lipid A derivative, monophosphoryl Lipid A.
Infect. Immun.1986 52, 6.

39. DAHINDEN C., GALANDS C., FERH J.
Granulocyte activation by endotoxin tolerance. Correlation between adherence and other granulocyte functions and role of endotoxin. Structure on biologic activity.
J. Immunol. 1985, 130, 857.
40. BORIS H., DE BORE F., VAN DER WAAIJ D.
Mielopoiesis in experimentally contaminated specific-pathogen-free and germfree mice during oral administration of polymyxin.
Infect. Immun. 1985, 50, 2, 407.
41. URBASCHEK R., URBASCHEK P.
TNF and IL-1 as mediators of endotoxin-induced beneficial effects.
Rev. Infect. Dis. 1987, 9 Suppl 5 s607.
42. BONA C.A.,
Fate of endotoxin in macrophages: Biological and ultrastructure aspects.
J. Infect. Dis. 1975, 128 suppl s74.
43. MANNEL D.N., NORTHOFF H., BAUSS F., FALK W.
TNF: A cytokine involved in toxic effects of endotoxin.
Rev. Infect. Dis. 1987, 9 Suppl. 5 s602
44. FOLKE L., GIERTZ H.
Endotoxins, arachidonic acid and superoxide formation.
Rev. Infect. Dis. 1987, 9 Suppl 5 s553.

45. KOIVURANTA-VAARA P., BANDA D., GOLDSTEIN I. M.
Bacterial Lipopolysaccharide-induced release of Lactoferrin from human polymorphonuclear leukocytes: Role of monocyte derived TNF α .
Infect. Immun.1987. 55, 1956.
46. VUKAJLOVICH S. W., HOFFMAN J., MORRISON D. C.
Activation of human serum complement by bacterial LPS: Structural requirements for antibody independent activation of the classical and alternative pathways.
Molec. Immunol.1987. 24, 319.
47. VERHOEF J., VERBRUGH H. A.
Host determinants in Staphylococcal disease.
Ann. Rev. Med.1981. 32, 107.
48. KAPLAN M.H., TENENBAUM M. J.
Staphylococcus aureus: Cellular biology and clinical application.
Am. J. Med.1982, 72, 248.
49. RASANEN L., MUSTIKAMAKI U.P., ARVILOMMI H.
Polyclonal response of human lymphocytes to bacterial cell walls, peptidoglycans and teichoic acids.
Immunology 1982, 46, 481.
50. SHIBASAKI M., NEMOTO H., SUZUKI S., KUROUME T.
Induction of lymphocyte colony formation in vitro by Protein A.
J. Immunol.1978, 121, 2278.

51. "Review of Physiological Chemistry"
 15a edición, 1977
 Lange Medical Publications,
 Los Altos, California.
 Tyler, D.D.: "Water and mineral metabolism".
 Capitulo 30, pp. 516-541
52. "Bioquímica de Harper"
 11a edición, 1984
 El Manual Moderno, Mexico, D.F..
 Martin. D.W.Jr.: "Agua y minerales"
 Capitulo 43, pp. 579-590
53. MACCHEIGIANI E., BOEMI M., FUMELLI P., FABRIS N.
Zinc-dependent low thymic hormone level in type I diabetes.
 Diabetes; 1989 Jul; 38 (7).pp 932-7
54. KOLLER L.D.
"Immunotoxicology of heavy metals"
 Int.J. Immunopharmacol.1980, 2: 268-79.
55. GOOD R.A., LORENZ E.
Nutrition, immunity, aging and cancer.
 Nutr. Rev.1988, 46: 62-7.
56. BEACH R.S., GERSHWIN M.E., HURLEY L.S.
Nutritional factors and autoimmunity
 I.- Immunopathology of zinc deprivation in New Zealand mice.
 J. Immunol. 1981.126: 1999-2000.

57. WINCHURCH R.A., ADLER W.H.
Supplemental zinc (Zn^{2+} restores antibody formation in cultures of aged spleen cells.
Eur. J. Immunol.1987, 17: 127-32.
58. FRAKER P.J., GERSHWIN M.E., GOOD R.A., PRASAD A.
Interrelationships between zinc and immune function (symposium summary).
Federation Proceedings 1986, 45: 1474-79.
59. DARDENNE M., PLEAU J.M., NABARRA B., LEFRANCIER P., DERRIEN M., CHOAY J., BEACH J.F.
Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor.
Proc. Natl. Acad. Sci, USA 1982, 79, 5370-3 (Immunology).
60. BACH J.F., DARDENNE M.
Thymulin, a zinc-dependent hormone.
Med. Oncol. Tumor Pharmacother;1989; 6 (1), pp 25-9.
61. IWATA T., INCEFY G.S., TANAKA T. ; FERNANDES G., MANENDEZ-BOTET C.J., PIH K., GOOD R.A.
Circulating thymic hormone levels in zinc deficiency.
Cell. Immunol.1979, 47: 100-5.
62. WIRTH J.J., FRAKER P.J., KIERSZENBAUM F.
Changes in the levels of marker expression by mononuclear phagocytes in zinc-deficient mice.
J. Nutr.1984, 114: 1826-33.

63. DE PASQUALE- JARDIEU P., FRAKER P.J.
Interferences in the development of a secondary immune response in mice by zinc deprivation: persistence of effects.
J. Nutr.1984, 114: 1762-9.
64. MARONE G., FINDLAY S.R., LICHTENSTEIN L.M.
Modulation of histamine release from human basophils in vitro by physiological concentrations of mice.
J. Pharmacol. Exp. Therapeutics 1981, 217: 292-8.
65. HART D.
Effect of zinc chloride on hamster lymphoid cells: mitogenicity and differential enhancement of lipopolisaccharide stimulation of lymphocytes.
Infection and Immunity 1978, 19: 457-461.
66. KIREMIDJIAN-SCHUMACHER L., STOTZKY G., LIKHITE V., SCHWARZ J., DICKSTEIN R.A.
Influence of cadmium, lead and zinc on the ability of sensitized guinea pig lymphocytes to interact with specific antigen and to produce lymphokines.
Env. Res.1981 (a) 24: 96-105.
67. WARNER G.L., LAWRENCE D.A.
The effect of metals on IL-2 related lymphocyte proliferation
Int. J. Immunopharmacol. 1988, 10: 629-37.
68. FOSMIRE G.J.
Zinc toxicity.
Am. J. Clin. Nutr. ; 1990 Feb.; 51(2); pp 225-7.

69. CHOWDHURY B.A., FRIEL J.K., CHANDRA R.K.
Cadmium-induced immunopathology is prevented by zinc administration in mice.
J. Nutr. 1987. 117:1768-94.
70. STACEY N.H.
Effects of cadmium and zinc on spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.
J. Toxicol. Env. Health 1986, 18: 293-300.
71. SMIALOWICZ R.J., ROGERS R.R., RIDDLE M.M., LUEBKE R.W., FOGELSON L.D.
Effects of manganese, calcium, magnesium, and zinc on nickel-induced suppression of murine natural killer cell activity.
J. Toxicol. Env. Health 1987 (a) 20: 67-80.
72. CUNNINGHAM A.J., SZENBERG E.
Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells.
Immunology. 1968, 14: 599.
73. JERNE N.K., NORDIN A.A.
Plaque formation in agar by single antibody-producing cells.
Science, 1963, 140: 405.
74. MINITAB, Reference Manual, Release 7: editado por MINITAB Inc., Duxbury Press, Boston, USA. 1989. pp 8-1.
75. SUSKIND R.M.
Malnutrition and the immune response.
Raven Press, Publishers. New York, 1977.

76. BEISEL W.R.
Malnutrition as a consequence of stress.
En: Malnutrition and the immune response, editado por
Suskind R.M., Raven Press, Publishers. New York, 1977.
pp 21.
77. WATTS T.
Thymus weights in malnourished children.
J. Trop. Pediat., 1969, 15: 155.
78. FUNATSU M.K.; ERLICH R.B.; MONTAGNINI, M.L.; FERRANDES C.A.,
OGAWA C.A.; PAES R.A.P.
Efeitos da inoculacao de endotoxina produzida por
Escherichia coli, na morfologia timica e no desenvolvimento
ponderal de camundongos jovens.
Rev. Inst. Adolfo Lutz (Brasil), 1985, 45: 65.
79. ZIMMERMAN B.T., CANONO B.P., CAMPBELL P.A. :
Silica decreases phagocytosis and bacterial activity of both
macrophages and neutrophils in vitro.
Immunology, 1986, 59 : 521.
80. MACKANESS M.B. :
The influence of immunologically committed lymphoid cell on
macrophage activity in vivo.
J. Exp. Med. , 1969, 130 : 973.
81. WITZEL G.D., KETTMAN J.R. :
Activation of murine B lymphocytes. III. Stimulation of B
lymphocyte clonal growth with lipopolisaccharide and dextran
sulfate.
J. Immunol. 1981, 126 : 723.

82. RADOVICH J., TALMAGE D.W. :
Antigenic competition cellular or humoral.
Science, 1967, 159 : 512.
83. PROSS H.F., EIDINGER D. :
Antigenic competition : a review of nonspecific antigen-induced suppression.
Advances in Immunology, 1974, 18 : 133.
84. HOLLY M., LIN Y.S., ROGERS T.J. :
Induction of suppressor cells by staphylococcal enterotoxin B. Identification of a suppressor cell circuit in the generation of suppressor-effector cells.
Immunology, 1988, 64 : 643.
85. JAYAWARDENA A.N., WASKMAN B.H. :
Suppressor cells in experimental Trypanosomiasis.
Nature (London), 1977, 265 : 539.
86. MULHERN S.A., VESSEY A.R., TAYLOR G.L., MAGRUDER L.E.
Suppression of antibody response by excess dietary zinc exposure during certain stages of ontogeny.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1985, 180 : 453-461.