



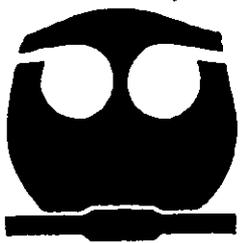
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DEL ZINC SOBRE LA PRODUCCION DE TNF- $\alpha$  EN MACROFAGOS PERITONEALES.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
MARIA ASUNCION CABAÑAS CORTES

2000/07/15



MEXICO, D. F.

2000



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: Prof. Lastra Azpilicueta María Dolores.  
VOCAL: Prof. Hernández Montes Homero  
SECRETARIO: Prof. Pastelín Palacios Rodolfo  
1er. SUPLENTE: Prof. Giral Barnes Carmen  
2do. SUPLENTE: Prof. Aguilar Cárdenas Ana Esther

## **SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA**

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOLOGIA, DEL  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM

### **ASESOR DEL TEMA**

M en C María Dolores Lastra Azpilicueta

Mrs. Dolores Lastra

### **SUPERVISOR TECNICO**

M en C Ana Esther Aguilar Cárdenas

Ina Esther Aguilar C

### **SUSTENTANTE**

María Asunción Cabañas Cortes

MA

A mi madre por ser mi guía, pilar de mi formación humana y profesional,  
por su amor y comprensión, te quiero mamá!

A mis hermanos, Erick, Mario, Toyi, Jaime y Alvaro por su cariño y  
paciencia.

Gracias a la Mtra. MD Lastra por su enseñanza y confianza.

A la Mtra. Anita por brindarme su consejo y cariño.

Al Maestro Rodolfo por su buen humor y apoyo.

A las personas que han formado parte de mi vida brindándome su amistad y apoyo Germán, Lety, Neri, Alicia, Jorge.

A mis queridas compañeras y amigas "Chivis" y Mónica por su apoyo incondicional

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Generalidades del zinc .....	3
2.2 El zinc en las etapas perinatales .....	11
2.3 La suplementacion con zinc .....	14
2.4 El zinc y el sistema inmunológico .....	18
2.5 Participación del monocito/macrófago en la respuesta inmune.....	24
2.6 El zinc y las citocinas .....	31
2.7 El factor de necrosis tumoral alfa.....	35
<b>III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b> .....	43
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	44
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	45
5.1 Animales .....	45
5.2 Peso de los animales .....	45
5.3 Diseño experimental .....	45
5.4 Estudio de la producción de TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneales	
a) Técnica de cultivo de macrófagos peritoneales .....	47
b) Cinética de producción de TNF- $\alpha$ .....	48
c) Determinación de la concentración de TNF- $\alpha$ por medio de un ensayo inmunoenzimatico .....	48

<b>VI. RESULTADOS</b> .....	51
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>ANEXO</b> .....	61
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	64

## RESUMEN

El descubrimiento de la deficiencia nutricional del zinc en la patogenia de diversas enfermedades como la anemia de células falciformes, trastornos renales y la acrodermatitis enteropática, dieron ímpetu al estudio de los mecanismos de cambio, inducidos por zinc en el metabolismo celular e inmunidad. El zinc es un cofactor para un gran número de enzimas que participan en la síntesis de DNA, como son la DNA polimerasa y la timidina-cinasa, las que a su vez, regulan las funciones celulares. (38, 67)

La deficiencia de zinc provoca un estado de inmunodeficiencia grave en humanos y en animales. Los ratones con dietas bajas de zinc durante la gestación presentan después del nacimiento un estado de deficiencia inmunitaria, que se puede revertir cuando se les aplica una dieta suplementada con zinc. (11, 20)

Este trabajo forma parte de un proyecto extenso acerca de los efectos del zinc sobre el sistema inmunológico durante las etapas perinatales, así como investigar el efecto que tiene el metal en la producción de citocinas, ya que en esta etapa del desarrollo se observa una disminución en la producción de las mismas. (12, 34, 57, 61, 75) Se han realizado diversos estudios del efecto que tiene el zinc en las células del sistema inmunológico, como son los linfocitos, macrófagos, etc. (12, 26, 27, 49, 80) El macrófago es susceptible a las concentraciones del zinc, afectando así una de sus principales funciones, la producción de citocinas. Entre las citocinas que se ven afectadas está el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que es uno de los mediadores esenciales en el crecimiento, diferenciación y función de diferentes

células y tejidos. (33) Además, tiene diversas actividades que ejerce tanto "in vitro" como "in vivo", realizando un importante papel en la inmunidad celular como humoral. Las funciones benéficas del TNF- $\alpha$  incluyen un papel importante en la respuesta inmune hacia infecciones bacterianas fúngicas, vírales y parásitos, así como la necrosis de tumores específicos. (35, 69)

Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue evaluar el efecto del zinc sobre la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos peritoneales. Este estudio se realizó en un modelo murino, el cual se clasificó en dos grupos de experimentación, el grupo I que recibió un suplemento con zinc (500 mg/L) durante los periodos de gestación y lactancia y el grupo II que recibió el suplemento durante la gestación, la lactancia y el destete, ambos grupos con sus respectivos testigos.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento del 30 % en la producción del TNF- $\alpha$  en los ratones tratados con zinc, grupo I y un 20 % de elevación en los ratones del grupo II. Estos datos sugieren que la suplementación con zinc en estas etapas afecta la producción de TNF- $\alpha$ , teniendo posiblemente un efecto positivo en el sistema inmunológico, ya que se ha observado que el sistema inmune en el recién nacido no está totalmente desarrollado y es susceptible a infecciones bacterianas y vírales. (57, 61)

En una situación de balance, el TNF- $\alpha$  se comporta como uno de los principales mediadores en la lucha frente a la inflamación y a microorganismos invasores. Sin embargo, el TNF- $\alpha$  puede tener efectos nocivos, ya que una excesiva producción del mismo causa serios trastornos en el huésped. (33, 35) Por esto se sugiere que la suplementación con zinc debe ser administrada cuidadosamente.

## I. INTRODUCCION

Desde hace años se sabe que la desnutrición es un factor crítico y determinante en la respuesta del sistema inmune, provocando que algunos individuos sean susceptibles a una variedad de enfermedades infecciosas. La disminución de la respuesta inmunológica provocada por la desnutrición hipoprotéica e hipocalórica, se ha demostrado en diversos modelos experimentales. (51)

Actualmente se considera que la deficiencia de un solo nutriente, o más aun, de un elemento traza, como es el caso del zinc, altera las funciones metabólicas y celulares que tienen una importante influencia sobre el sistema inmunológico. (22)

El zinc es un elemento traza esencial para el sistema inmune, su acción puede ser particularmente importante en las etapas perinatales donde hay una disminución fisiológica de la concentración del elemento en circulación, en investigaciones con ratas con bajos niveles de zinc, durante el período de lactancia conducen a una disminución de la respuesta inmune y a un incremento en la susceptibilidad a infecciones. (16) La deficiencia en la concentración de zinc durante el embarazo está relacionada al riesgo de aborto espontáneo y al retardo en el crecimiento fetal, entre otras alteraciones. Las alteraciones inmunológicas que se presentan como resultado de una desnutrición intrauterina, específicamente debido a la carencia de zinc, causan persistentes estados de inmunodeficiencia en la prole que pueden ser transferidos a subsecuentes generaciones. (11)

El zinc influye en la función de las células fagocíticas y linfocitos, las células del sistema inmune son sensibles a los niveles de zinc en circulación, una de ellas son los macrófagos que forman parte de la primera línea de defensa. El macrófago participa en las etapas inductoras de la respuesta inmunológica, como célula presentadora de antígeno, así como en la fase efectora, eliminando células tumorales o participando en la respuesta inflamatoria. (6)

Las funciones del macrófago son inhibidas en animales deficientes de zinc, las alteraciones presentes en el macrófago incluyen una disminución en los marcadores de superficie y en los receptores del complemento, así como en su capacidad de eliminar parásitos. Además, se ve afectada la producción de monocinas que regulan los mecanismos de inicio y control de la respuesta inmune. (31, 80) Entre las monocinas que se ven afectadas, esta el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que es uno de los mediadores esenciales en el crecimiento, diferenciación y función de diferentes células y tejidos. (33) Además tiene diversas actividades que ejerce tanto "*in vitro*" como "*in vivo*", realizando un importante papel en la inmunidad celular como humoral. (35)

Por lo anterior, es importante explorar el impacto de la suplementación de zinc en el sistema inmune. El presente trabajo ha sido diseñado para estudiar el efecto de la suplementación con zinc en la producción de TNF- $\alpha$ , como uno de los indicadores de la función del macrófago, durante la gestación, la lactancia y el destete en ratones BALB/c.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 GENERALIDADES SOBRE EL ZINC

Los minerales y oligoelementos al igual que las vitaminas son esenciales para la salud del individuo especialmente en las fases de crecimiento y durante la ancianidad. Son indispensables y deben estar presentes en concentraciones definidas, para que los procesos vitales se lleven a cabo en óptimas condiciones.

(55)

Los minerales constituyen el 0.01% de la masa corporal y cabe destacar que también se les denomina elementos traza. Los elementos traza presentes en el cuerpo se expresan en mg/kg de tejido; el cobre, cobalto, hierro, magnesio, molibdeno, selenio y el zinc son esenciales para el crecimiento y desarrollo, (55).

Uno de los elementos traza a los que se han enfocado numerosas investigaciones, es el zinc. El zinc es un importante elemento traza, para el desarrollo y mantenimiento del sistema inmune. Debido a la capacidad inmunomoduladora, la suplementación farmacológica con zinc, se ha empleado para restaurar el daño en la función inmune. (38).

#### Química y metabolismo 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. (20)

Las características químicas del zinc que permiten que tenga funciones útiles sobre los sistemas biológicos, son las propiedades estereoquímicas selectivas que tiene, no toma parte en reacciones de oxidación-reducción, interviene en los procesos

de catálisis ácido-base de muchas enzimas y las combinaciones del zinc con algunos aminoácidos como la histidina, el aspartato y la cisteína proporcionan sitios de coordinación abiertos al agua y los sustratos. (20)

El metabolismo del zinc en mamíferos es dependiente de la carencia y de la alta selectividad en el transporte del zinc en la sangre, la existencia de metalotioneínas, una familia de proteínas intracelulares que transportan al zinc. (17) los diferentes tipos de células una porción del zinc intracelular existen en forma de complejo zinc-metalotioneína. La expresión del gen de metalotioneína es inducida por el zinc, glucocorticoides, glucagon, IL-1 y otras moléculas, la metalotioneína tiene un papel central en el control del metabolismo del zinc en el cuerpo, llevado a cabo en el hígado y el intestino. (20)

### Función biológica del zinc

El zinc esta involucrado en una gran variedad de funciones del cuerpo humano, formando parte de muchos sistemas enzimáticos. El zinc es necesario para el óptimo funcionamiento de más de 200 enzimas. Numerosas metaloenzimas están involucradas en la síntesis de proteínas, en el catabolismo protéico y el metabolismo energético, así como en lá síntesis de ADN y ARN, donde el ADN polimerasa, ARN polimerasa y la transcriptasa reversa, son enzimas que contienen como cofactor al zinc. (39, 64) El zinc también es necesario para un óptimo funcionamiento de diversas hormonas, entre ellas la hormona de crecimiento, donde se ha demostrado que el zinc aumenta la afinidad de unión en el dominio extracelular del receptor de prolactina. Se ha observado también,

mediante el estudio en animales que fueron privados de zinc en su dieta, estos presentaron niveles plasmáticos reducidos de hormonas como la insulina, la GH, las gonadotropinas y la testosterona, mientras que otras hormonas se encontraron incrementadas, como el cortisol y las catecolaminas. (21) Se conoce también que el zinc puede actuar como un agente antioxidante, protegiendo a las células del daño a causa de los radicales libres generados durante la activación del sistema inmune. Se ha observado "*in vivo*", que el zinc induce la síntesis de metalotioneinas, que tienen la propiedad de ser antioxidantes. Bajo condiciones "*in vitro*" el zinc interactúa con grupos sulfhidrilo de proteínas, inhibiendo su oxidación. (67)

### Distribución

El zinc se encuentra en pequeñas cantidades, distribuido en diversos tejidos. Se estima que en el organismo de una persona adulta hay 2.2 g de zinc y los niños nacidos a término contiene 140 mg. Por peso corporal los neonatos y los adultos tienen cantidades bastante aproximadas, sin embargo la distribución es diferente. En los recién nacidos, el 25% del zinc está en el hígado, mientras que en el adulto solo hay 2%; una gran proporción del zinc fetal está en los huesos cerca del 40%, en tanto que en los adultos solo el 30%. Se piensa que el hígado del neonato sirve como órgano de reserva del zinc. En los adultos la mayor parte del zinc, el 60% se localiza en los músculos y el 30% se encuentra en los huesos, por lo que no está disponible para los procesos metabólicos. En condiciones de buena salud hay en el plasma, aproximadamente, entre 70 y 110 µg/dL. (72)

### Absorción

El "status" del zinc en el hombre es determinado generalmente por la cantidad y calidad de zinc en la dieta y la condición fisiológica del individuo. En la dieta, el zinc se encuentra en alimentos tanto de origen vegetal como de origen animal, entre los que destacan principalmente la carne de res, de cerdo; el pescado este último tiene un mayor contenido de zinc, los cereales, frijoles y nueces también y por último la leche y los huevos. (73)

Aun cuando no se precisa el sitio donde ocurre selectivamente la absorción de este mineral, algunos informes indican que la mayor parte ocurre en la porción distal del intestino delgado, esto se comprueba con los siguientes resultados. Se absorbe en el intestino delgado, particularmente en el yeyuno (357+14 nM/min/40 cm) comparado con el duodeno (230+33 nM/min/40CM) e íleon (84+10 nM/min/40cm) esto se determinó por una técnica de perfusión intestinal realizada en humanos. (73)

Los factores que influyen en la absorción gastrointestinal del zinc son los siguientes:

*Ligandos:* el zinc puede unirse uno o más ligandos, algunos de los cuales podrían impedir y otros aumentar la absorción.

*Concentración del zinc:* la absorción se incrementa durante la deficiencia de zinc y disminuye cuando se presenta un exceso de zinc.

*Transporte intracelular:* el transporte de zinc es un mecanismo activo controlado por el metabolismo.

*Secreción endógena del zinc:* una cantidad significativa de zinc se secreta dentro del lumen intestinal por medio de las células epiteliales, bilis y secreción pancreática. (4)

### Excreción

A diferencia del hierro, el zinc no se almacena y se pierde fácilmente por el organismo. La mayor parte del zinc endógeno acontece por la vía digestiva, se estima que por esta vía se pierden diariamente de 4 a 5 mg, sin embargo, el 20% de este es recuperado en la circulación enterohepática. En la orina se eliminan entre 0.4 y 0.6 mg, en los tegumentos y en el sudor se pierde cerca de 1 mg, en cada eyaculación se pierden entre 0.6 y 1 mg. En la leche humana también se pierde zinc, esta contiene entre 1 y 2  $\mu\text{g/mL}$ . (72)

La secreción de zinc endógeno se aumenta cuando la dieta protéica es de origen vegetal en comparación cuando la proteína tiene origen animal. Tanto en humanos como en animales sanos la excreción renal de zinc permanece constante a pesar de las grandes fluctuaciones en la ingesta del mismo.

La homeostasis del zinc depende del balance entre la absorción y excreción. La excreción de zinc se observa disminuida tanto en humanos como animales que presentan deficiencia de zinc. En ratones deficientes en zinc la excreción de zinc tanto por heces, como en orina es demasiado baja. Por el contrario, en animales que reciben una suplementación con zinc, la secreción endógena de zinc es alta, lo que ayuda a mantener la homeostasis del zinc. (73)

### Desórdenes en el metabolismo del zinc

Existen desórdenes en el metabolismo del zinc, que derivan en: deficiencia de zinc o toxicidad por exceso de zinc.

La deficiencia de zinc es un problema común y complejo. Fue identificado previamente en Irán y Egipto en 1961, observándose en varones que presentaban un desarrollo sexual defectuoso con desarrollo corporal disminuido. Prasad y colaboradores describirón el síndrome clínico en el cual la deficiencia de zinc, debida a una interferencia en la absorción del zinc en la dieta, presentaba como consecuencia retardo testicular, enanismo y una susceptibilidad hacia las infecciones. (28, 47)

Las características de la deficiencia de zinc son similares, no importa si son causadas por un desorden genético (acrodermatitis enteropática), una deficiencia primaria adquirida (dieta) o una deficiencia secundaria (condicionada). La deficiencia de zinc esta caracterizada por un daño en el crecimiento, cicatrización de heridas defectuoso, alteraciones en la repuesta inmune, particularmente en las funciones de las células T, así como un incremento en la susceptibilidad a infecciones y enfermedades gastrointestinales. (38)

Existen diversos factores que promueven la deficiencia de zinc que se presentan resumidos en la Tabla 1

---

**Tabla 1 Factores relacionados con la deficiencia de zinc**

---

Dieta rica en fibras	Edad (infancia, pubertad y ancianidad)
Embarazo	Hospitalización
Aumento de ingesta de cobre	Quemaduras
Estrés	Alcoholismo
Infecciones agudas y crónicas	Parasitosis
Uso de diuréticos	Enfermedades renales
Cirrosis	

---

Tomado de la referencia 4

El zinc generalmente se considera un metal relativamente poco tóxico. Esta clasificación esta basada en varias características: el zinc es un metal esencial en varios procesos biológicos y más aun, se consume en la dieta para tener un buen estado de salud, es relativamente abundante en la naturaleza, la dosis recomendada diariamente es de 8 a 15 mg. No se conocen anomalías genéticas, las cuales resultan de una excesiva acumulación en el cuerpo, como es el caso del cobre (enfermedad de Wilson) y el hierro (hemocromatosis). La administración de zinc con fines terapéuticos en el humano con la dosis recomendada diariamente (RDA) no produce patologías significativas. La administración de zinc en animales de experimentación con dosis 100 veces más que la RDA no producen patología. (73)

Sin embargo, se ha encontrado evidencia, de que la deficiencia de cobre es secundaria al uso de la suplementación con zinc, en la administración por períodos prolongados. Este efecto interfiere con el metabolismo del hierro y posiblemente causa anemia, el cobre y el hierro son importantes en los eritrocitos.

En un modelo murino (ratones BALB/c) se ha observado que la suplementación con 1000 mg/L de zinc, durante la gestación, la lactancia y el destete tienen un efecto negativo en el valor del hematocrito. (52)

Las consecuencias de ingerir cantidades entre 100 a 300 mg/día de zinc puede ayudar en el tratamiento de varios problemas, pero si el tratamiento es muy prolongado, es decir más de 6 meses se presentan alteraciones en la respuesta inmunológica, encontrándose una marcada disminución de algunos indicadores de la respuesta inmune como es el caso del índice de proliferación de los linfocitos, disminución de la migración quimiotáctica y la ingestión bacteriana. (25)

De lo anterior se puede deducir, que la prescripción de suplementación con zinc, particularmente cuando la ingesta es por períodos prolongados da lugar a reacciones adversas (37), que se resumen en la siguiente Tabla 2.

---

**Tabla 2. Síntomas de toxicidad debida a una excesiva ingesta de zinc**

---

Daño en la absorción del cobre  
Iritación intestinal  
Daño en la respuesta inmune  
Anemia  
Bajos niveles de LDH-colesterol

---

Tomado de la referencia 37

## 2.2 EL ZINC EN LAS ETAPAS PERINATALES

Los efectos perjudiciales de la deficiencia de zinc sobre la concepción y desarrollo fetal en modelos animales se han estudiado ampliamente. La deficiencia de zinc transitoria y la continua en ratas, ratones, ganado doméstico y primates causan un amplio deterioro reproductivo. Los monos rhesus en gestación, alimentados con dietas que contienen 4 mg/kg de zinc desarrollan características de deficiencia de zinc. Ellas tienen un incremento en el índice de abortos, nacimientos de crías muertas y alumbramientos anormales, particularmente los machos tienen una reducción del zinc plasmático. (4)

La deficiencia de zinc durante el desarrollo prenatal puede tener efectos profundos sobre la ontogenia del sistema inmune. Las alteraciones en el desarrollo de la respuesta inmune son inducidas utilizando dietas que son deficientes marginalmente del elemento, es decir, menores de 5  $\mu\text{g Zn/g}$ . (44)

Para ilustrar los efectos dramáticos de una deficiencia de zinc marginal sobre la ontogenia del sistema inmune en el ratón se considera una serie de estudios llevados a cabo por Beach y colaboradores. Recientemente se han estudiado los diferentes grados de deficiencia de zinc, designada como marginal, moderada o severa sobre la base de la concentración de zinc plasmático y se ha demostrado que la deficiencia de zinc marginal y moderada durante la lactancia tiene una influencia sobre el crecimiento y desarrollo del ratón neonatal. (10, 58)

Los defectos en la respuesta inmune causada por la deficiencia de zinc prenatal son persistentes, la progenie de ratones hembras privadas de zinc en la etapa

prenatal, es decir en la generación F2 se hallaron bajos niveles de IgM y una disminución en la respuesta de PFC hacia SRBC. (11)

En otros estudios realizados sobre la respuesta a anticuerpos indican que la administración de zinc durante la gestación y lactancia, así como 21 días después de este período produce un incremento significativo en la síntesis de IgM, son contradictorias ya que en otras investigaciones indican que existe una disminución en la síntesis de IgM, en animales tratados con un exceso de zinc. La diferencia en estos resultados podría deberse al hecho de que las dosis administradas son muy pequeñas y se administran desde el momento de la cruce. Las hembras son por lo tanto capaces de proporcionar zinc a sus crías durante la gestación y lactancia. (52)

Varios estudios informan que durante la etapa perinatal la concentración plasmática del zinc disminuye a medida que progresa el embarazo, la explicación más plausible a este decremento es la hemodilución que, por la expansión del plasma, ocurre en estas mujeres. (72) Los requerimientos del zinc se incrementan durante el embarazo, la infancia y la pubertad. El zinc se requiere específicamente por el embrión y el feto; las lesiones asociadas con la deficiencia del elemento son causadas, por lo menos en parte, por el efecto directo sobre el embrión. (74)

Existe una relación significativa entre el comportamiento neonatal y la ingesta materna de alimentos de origen animal durante el segundo y tercer trimestre de embarazo. Este tipo de hallazgo es el primero en demostrar un enlace entre el déficit de poco, severo a moderado en la ingesta de micronutriente durante el

embarazo así como en el neonato. Además la nutrición materna en la lactancia es claramente importante para pronosticar el mejor rendimiento de los infantes de 6 meses de edad. (48)

Para un desarrollo intrauterino saludable, el feto requiere adecuadas cantidades de elementos traza, el cual sólo se obtiene de la madre a través de la placenta. En el feto, los niveles de zinc se incrementan marcadamente durante el último trimestre, especialmente en el hígado fetal, asociado con una elevación en los niveles de metalotioneína fetal. (54) Las razones para esta acumulación y los mecanismos involucrados permanecen confusas. Una explicación puede ser que el almacén prenatal del zinc sea utilizado después del nacimiento para el crecimiento y desarrollo, incluyendo la maduración del sistema inmune.

### 2.3 LA SUPLEMENTACIÓN CON ZINC

Varios estudios han demostrado los beneficios de la suplementación con zinc en enfermedades infecciosas, que adquieren diversas poblaciones humanas. Demostrando que el zinc reduce la incidencia y duración de los episodios de diarrea aguda o crónica, aproximadamente del 25 al 30% y también reduce la incidencia de infecciones respiratorias agudas cerca del 45%. (68)

En un estudio realizado por Rosado y colaboradores se observa que la suplementación con zinc durante 12 meses disminuye significativamente la morbilidad causada por enfermedades gastrointestinales (diarrea y fiebre) en una población rural de niños en edad preescolar, la suplementación con zinc mejora la inmunocompetencia presente en niños desnutridos. (63)

La suplementación con zinc también tiene efectos benéficos cuando es administrado durante una infección. El zinc en tabletas, ha mostrado disminuir la duración de un resfriado común. El uso del zinc para restaurar las funciones del sistema inmune ha sido exitoso, tanto en el caso de la malnutrición como en el síndrome de mala absorción (acrodermatitis enteropática). En pacientes con anemia se presenta una disminución en el número de linfocitos T así como en la relación de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, también una disminución de la actividad de las células NK, y la disminución de la producción de IL-2, la suplementación con zinc restaura los índices inmunológicos. (38, 67)

La suplementación con zinc restaura la hipersensibilidad tardía, en alcohólicos y estimula la inmunidad celular y humoral en humanos y ratones con hipogamaglobulinemia. Los pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), presentan hipozincemia asociada con una alta incidencia de infecciones oportunistas. La suplementación oral con zinc en pacientes infectadas con VIH, conduce a un aumento en la cantidad de células CD4<sup>+</sup> y una disminución en la incidencia de infecciones bacterianas. (73)

La terapia con zinc en grupos con bajos niveles de zinc, en el caso de mujeres embarazadas, se tiene resultados favorables, en los cuales se reduce la frecuencia de nacimientos prematuros, muerte perinatal etc. (41) Durante el embarazo y la lactancia es preciso considerara una parte adicional para cubrir la demanda del niño, tanto en la etapa prenatal como en la posnatal. Es así como se ha sugerido que durante el embarazo, 15 mg/d es una cantidad razonable para satisfacer esta eventualidad. (72) En las mujeres que lactan se recomienda que durante el primer semestre consuman una cantidad adicional de 7 mg/d y en el segundo semestre 4 mg/d. Tabla 3.

Los requerimientos de zinc durante la lactancia son cuantitativamente más grandes que los necesarios durante el embarazo, especialmente durante las primeras semanas después del parto, lo que el periodo de lactancia posee una significativa importancia en la homeostasis del zinc materno, particularmente en poblaciones con una ingesta de zinc baja en la dieta. (16, 48)

**Tabla. 3 Recomendaciones dietética diarias de zinc**

Población	Edad (años)	Zn (mg/d)
Lactantes	0.0-0.5	5
	0.5-1.0	5
Niños	1-10	10
Hombres	11 a más	15
Mujeres	11 a más	15
Embarazadas		19
Lactantes		16

Tomado de la referencia 72

Los beneficios de la suplementación con zinc materna sobre los infantes, incluyen un aumento en la cantidad y calidad de la leche materna así como una optimización en el crecimiento y desarrollo del infante, mejorando también el sistema inmunológico del mismo. (51)

Por último, las investigaciones previas en el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología de la Facultad de Química, indican que la suplementación con zinc durante las etapas perinatales aumentan algunas funciones inmunológicas. La administración oral de zinc a ratones BALB/c en los períodos de gestación y lactancia produjo un incremento significativo en el metabolismo de los macrófagos peritoneales y en la fagocitosis; también se observó un aumento considerable de IgM. Respecto a los linfocitos T se encontró un efecto mitogénico del metal. Se pudo observar que la respuesta proliferativa máxima se presenta con la concentración de 0.1 mM de zinc, y dosis mayores resultan tóxicas para las células.

También se observó que el zinc inhibe la involución tímica. Estos resultados revelan la importancia de este elemento traza en el estado inmune, sugiriendo la posibilidad de la regulación de algunas funciones inmunológicas a través del zinc.

(50, 52, 53)

## 2.4 EL ZINC Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

La desnutrición y la deficiencia de un nutrimento comprometen la respuesta inmune. Además, el efecto de inmunocompetencia asociado con la deficiencia nutricional puede contribuir al establecimiento de diversas enfermedades. (45)

El zinc es un elemento traza esencial para el sistema inmune. Un daño en la respuesta inmune está relacionado con un bajo nivel del zinc en el plasma o una deficiencia de zinc presente en diferentes enfermedades. Los síntomas clínicos de la deficiencia de zinc incluyen, atrofia tímica y una alta frecuencia de infecciones bacterianas, vírales y micóticas. (73)

La influencia del zinc en el sistema inmune involucra una interacción compleja entre los tres principales mecanismos efectores: inmunidad celular, inmunidad humoral y fagocitosis. Por esta razón los mecanismos efectores son alterados por el estado nutricional del individuo, provocando que algunos de ellos sean ineficaces en la defensa del huésped. (22)

La evaluación de los efectos del zinc sobre la inmunidad del huésped comienza con el efecto del zinc sobre los componentes de la inmunidad innata. La deficiencia de zinc afecta otros mediadores de la inmunidad no específica, como es la función de los leucocitos polimorfonucleares, la función de las células NK y la actividad del complemento. (23)

La linfopenia es común en humanos y animales deficientes de zinc y ocurre en el ámbito de tejido linfoide periférico y central. En el ratón adulto con una dieta deficiente de zinc durante 2 semanas, se observa una disminución en el número

de linfocitos T y B en sangre periférica y en el tejido esplénico también. Los linfocitos en sangre periférica y el número de macrófagos disminuyen por lo menos el 50%. La deficiencia de zinc marginal suprime substancialmente la concentración de células linfoides en sangre periférica tanto en el humano como en el ratón. (38)

#### Efecto del zinc sobre las células del sistema inmune.

Todas las células del sistema inmune son influenciadas por el zinc. La disminución en los niveles de zinc, daña la actividad de las células NK, la fagocitosis por macrófagos y ciertas funciones de los neutrófilos. (77) La deficiencia de zinc afecta en forma diferente a los distintos tipos de células y ocasiona cambios en la proporción en que se encuentran las distintas subpoblaciones de las mismas.

#### Linfocitos T

En varios estudios se ha demostrado el impacto de la deficiencia de zinc sobre la función del linfocito T, observándose una respuesta disminuida a mitógenos, así como una disminución en la producción de timulina, la cual es liberada por el timo, también causa atrofia del timo y de los nódulos linfáticos así como reacciones deficientes de hipersensibilidad cutánea mediada por células. (27, 28, 49)

Un probable mecanismo fundamental de la disfunción del linfocito inducida por la deficiencia de zinc, es el requerimiento del zinc para la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN). Numerosos estudios han mostrado que las enzimas clave para la síntesis del ADN, como es la timidina cinasa y el ADN polimerasa, que constituyen el conjunto de metaloenzimas del zinc. Así de esta manera, la deficiencia de zinc esta involucrada en la disminución de la replicación celular y

proliferación. (67) En linfocitos aislados de animales deficientes de zinc manifiestan un daño en la respuesta a fitohemaglutinina (PHA) y una disminución en la función de anticuerpos dependientes de la célula T, estos efectos son revertidos por la adición de zinc. (67, 73)

Estudios "*in vitro*" han demostrado que el zinc es un potente mitógeno para los linfocitos T, tanto en animales como en el humano y este efecto depende de la concentración. (50) También se ha demostrado que el zinc potencia la respuesta hacia los superantígenos, facilitando la unión del superantígeno con las moléculas de histocompatibilidad clase II (MHC II) de las células presentadoras de antígeno. (31) Existe evidencia que la adición de zinc "*in vitro*" altera la expresión y función de las moléculas de superficie del linfocito T que determinan la interacción celular. La realización de estudios *in vitro* hace evidente el papel del zinc en la activación y proliferación del linfocito T. Los efectos de zinc sobre el linfocito T son modulados por diversos factores como son el tipo de célula presentadora de antígeno, las moléculas de adhesión, las moléculas coestimuladoras el tipo de antígeno y el ambiente en el que ocurre la activación del linfocito. (22, 44)

#### Efecto del zinc sobre las subpoblaciones del linfocito T

Las células T cooperadoras se dividen en dos subpoblaciones celulares, Th1 y Th2, de acuerdo a la función que desempeñan, las células Th1 median la inmunidad de tipo celular y las Th2 la inmunidad humoral. Estas subpoblaciones están bien caracterizadas en el sistema inmune murino, donde IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  son consideradas como productos de las células Th1. La IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 son productos de las células Th2. (62)

Estudios realizados por Beck y colaboradores realizados en un modelo experimental humano mostraron que la primera citocina en disminuir es el IFN- $\gamma$  mientras que la producción de IL-4, IL-6 o IL-10 no son afectadas, debido a la deficiencia de zinc, sugiriendo que el zinc afecta principalmente las funciones de las células Th1. La deficiencia de zinc en humanos esta acompañada por un desequilibrio en las células Th1 y Th2 (Th1>Th2), disminuyendo en el reclutamiento de las células "naive" y reducción en el porcentaje de las células T citotóxicas. Estas consecuencias inmunológicas de la deficiencia de zinc son responsables de la disminución de las funciones de la inmunidad celular en sujetos deficientes de zinc. (12)

### Linfocitos B

El desarrollo del linfocito B en la médula ósea se ve afectado adversamente por la deficiencia de zinc, el número de los linfocitos B y sus precursores está disminuido. Los linfocitos pre-B y linfocitos B inmaduros disminuyen su población aproximadamente en 50% y 25% respectivamente. Por lo tanto la deficiencia de zinc bloquea el desarrollo de los linfocitos B en la médula ósea, resultando una cantidad mínima presente en el bazo. (27) La disminución de las células B en la médula como resultado de la deficiencia de zinc, indica que existe una alteración en el proceso linfopoyético de la médula, lo cual parece ser clave de la linfopenia resultante en muchos tipos de malnutrición. (46)

Algunos estudios realizados indican que la deficiencia de zinc afecta la producción de inmunoglobulinas, observándose una disminución en los niveles sericos de IgG en pacientes que presentan deficiencia de zinc unida a malnutrición protéico-

energética; otros hallazgos sugieren que la carencia de zinc provoca alteraciones en la distribución de inmunoglobulinas. (24)

### Monocito/Macrófago

La falta de zinc afecta la permeabilidad de la membrana del macrófago y la actividad fagocítica. El efecto del zinc sobre la función del monocito y macrófago se ha observado durante la deficiencia de zinc. En un experimento realizado por Wirth y colaboradores demuestra que los macrófagos aislados de ratones deficientes de zinc, presentan una disminución en la capacidad de eliminar parásitos intracelulares, lo cual rápidamente es corregido "*in vitro*" por la adición de zinc (5 µg zinc/ml), estos hallazgos demuestran que el zinc es un factor importante en la regulación del macrófago. (17, 80)

En otros estudios, la capacidad del macrófago en fagocitar partículas se observa aumentada en animales deficientes de zinc y la expresión de receptores para complemento y Fcγ permanecen sin cambios. (81) También se ha observado que una alta concentración de zinc *in vitro* afecta las funciones del macrófago inhibiendo la activación, la movilidad y la fagocitosis, así como el consumo de oxígeno por el macrófago. (26)

En estudios realizados en monocitos humanos la producción de citocinas es estimulada por la adición de zinc "*in vitro*". (66). La inducción de citocinas por el zinc es causada por una interacción directa del zinc en el monocito, los mecanismos por los que se lleva a cabo son desconocidos. En un experimento

realizado por Wellinghausen y colaboradores demostraron que el zinc está involucrado con el proceso de transducción de señales via segundos mensajeros, inducido por diversos estímulos, como puede ser por el lipopolisacárido y los superantígenos bacterianos. (31, 79)

La rápida restauración de la función del macrófago, después de la adición de zinc, sugiere que tiene un efecto terapéutico la suplementación con zinc sobre la diarrea o en el caso de un resfriado común, tiene un efecto benéfico en este tipo de padecimientos, ya que el macrófago esta involucrado, debido a que es la primera línea de defensa en el huésped. Desafortunadamente, existe información limitada, concerniente a los efectos del zinc sobre las funciones inmunológicas del macrófago en humanos. (67)

## 2.5 PARTICIPACION DEL MONOCITO/MACRÓFAGO EN LA RESPUESTA INMUNE.

El macrófago es la principal célula diferenciada del sistema fagocítico mononuclear. Los macrófagos están ampliamente distribuidos en todo el cuerpo participando en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. El termino "macrófago" fue utilizado desde hace más de 100 años por Elie Metchnikoff.

(43) Los monocitos son células fagocíticas que pertenecen al sistema fagocítico mononuclear y residen en la circulación. Los monocitos terminan su proceso de maduración en los tejidos, en donde se establecen recibiendo diferentes nombres según el tejido de residencia: células de Kúpffer en el hígado, macrófagos alveolares en el pulmón, células de la microglía en el sistema nervioso, macrófagos peritoneales en la cavidad abdominal, etc. (8)

Una representación esquemática del desarrollo del sistema fagocítico se muestra en la fig.1

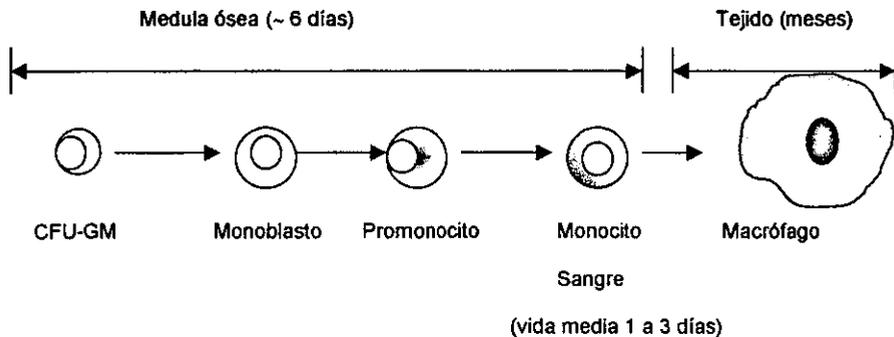


Fig. 1. Secuencia del desarrollo de las células que comprenden el sistema fagocítico mononuclear. CFU-GM, Unidad Formadora de Colonias. (44)

La línea celular, se origina en la médula ósea, con una célula progenitora comprometida denominada Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (CFU-GM).

La glicoproteína Factor Estimulador de Colonias (CSF), macrófago-CSF (GM-CSF), macrófago-CSF (M-CSF) y la Interleucina 3 (IL-3) , inducen la diferenciación de la célula progenitora en monoblasto, el cual se diferencia a promonocito. El promonocito es capaz de endocitar y adherirse a superficies. Los precursores del monocito en la médula ósea se cree que deben madurar de dos a tres generaciones antes de que el monocito salga a la circulación. Este proceso de maduración se lleva a cabo en 6 días. Los monocitos humanos se ha calculado que tienen una vida media en circulación de 3 días; en el ratón la vida media de los monocitos en circulación, una vez estimulados es de 18 horas. (44)

No existen datos que muestren que los monocitos estén destinados a algún tejido en particular cuando salen de la médula ósea. Una vez en el tejido los monocitos no retoman a la circulación. En el órgano blanco el monocito es diferenciado a macrófago con algunas propiedades funcionales y morfológicas que son características del tejido en el cual reside, presumiblemente en respuesta a un estímulo específico de tejido. (6)

### Activación del Macrófago

El paso más importante en la maduración del macrófago es la activación. El concepto de macrófago activado se desarrolló en los años 60's del trabajo de Mackaness y colaboradores, quienes observaron que los macrófagos de animales que tienen una infección, presentan un incremento en la capacidad de eliminar

una gran variedad de microorganismos patógenos. Otros estudios han determinado que los macrófagos presentan cambios morfológicos, funcionales y metabólicos comparados con las células residentes no activadas. (1, 2)

El proceso de activación es complejo y ocurre en múltiples pasos secuenciales, esto se refiere a una cascada de activación. La cascada de activación generalmente comienza en macrófagos jóvenes que son necesarios, en donde se lleva a cabo un proceso inflamatorio, en ese momento existe una señal de inicio, los macrófagos residentes que se encuentran en tejidos, que no presentan procesos inflamatorios, presentan una respuesta débil a esta señal. (44)

La interacción de los macrófagos con una variedad de señales inductivas, que se denominan colectivamente *factores activadores del macrófago*. El macrófago está caracterizado por el hecho de tener ahora una sensibilidad a una segunda señal, la cual es necesaria para completar la cascada inductiva e interpretarse como macrófago activado. Los macrófagos completamente activados ahora son capaces de efectuar sus funciones con mayor capacidad. Los eventos inductores están sujetos a detenerse por una variedad de señales. (2, 44)

La señal molecular, la cual conduce al desarrollo de la cascada de activación no ha sido definida. Existe evidencia de que el IFN- $\gamma$ , es el principal estimulador de la activación del macrófago "*in vivo*" como "*in vitro*", debido a esto se le atribuye el aumento del poder destructivo del macrófago. (41) La segunda señal la induce el lípido A componente del lipopolisacárido. Alternativamente el lipopolisacárido puede desempeñar ambos papeles cuando se presenta en altas concentraciones.

La acción de estas señales es entonces transducido a varios niveles dentro del macrófago que regula la expresión de proteínas y por lo tanto su función. (2)

### Actividades funcionales

Los macrófagos son capaces de llevar a cabo varias funciones diferentes. Una función importante del macrófago es la capacidad para ingerir y eliminar parásitos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria*, *Leishmania*, *Toxoplasma* y algunos hongos, así como su capacidad para eliminar parásitos extracelulares como el pneumococo, también suprimen la infección viral, incluyendo al virus de inmunodeficiencia humana tipo uno. (6, 13, 43)

Los macrófagos pueden eliminar células tumorales por medio de diversos productos de secreción, incluyendo enzimas lisosomales, metabolitos de oxígeno como peróxido de hidrogeno, proteinasas citolíticas y TNF- $\alpha$ . (62) Las enzimas proteolíticas presentes sobre la membrana del monocito tienen un papel fundamental en el rechazo de tumores. Otra de sus funciones protectoras es la capacidad de sufrir diapedesis, es decir, a través de las paredes del endotelio de vasos sanguíneos y migrar hacia sitios de invasión de los microorganismos. Los factores quimiotácticos de los monocitos incluyen productos del complemento y quimiotradores derivados de los neutrófilos, linfocitos u otros monocitos y células cancerígenas. (2, 6, 24, 59)

Los macrófagos activados desarrollan mejor la capacidad de adherirse y migrar, en respuesta a los factores quimiotácticos, de esta manera, ellos pueden llegar a sitios de inflamación, infección y cáncer con mayor eficacia que los macrófagos no

activados. También están involucrados en la remoción de desechos de tejido y reparación de heridas. Secretan el *Factor de crecimiento- $\alpha$* , el cual regula el proceso de angiogenesis y restauración de la epidermis. Los macrófagos activados aumentan su capacidad de secretar o sintetizar una variedad de enzimas hidrolíticas y materiales potencialmente microbicidas que participan en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. (2, 6)

### *Funciones del macrófago en las etapas perinatales*

Las funciones del monocito/macrófago se han observado deficientes en las etapas perinatales, estas deficiencias se cree que son debidas a la inmadurez del sistema fagocítico en los neonatos. Por lo que es probable que la deficiencia en la función del sistema fagocítico juega un papel primordial en la defensa del huésped del recién nacido. (43)

En estudios "*in vitro*" la actividad fagocítica de los monocitos/macrófagos, aislados de los neonatos, se ha reportado como normal, sin embargo, los monocitos/macrófagos pueden tener muy baja actividad fagocítica que la del adulto. Se ha demostrado en diversos estudios que existe una deficiencia fagocítica en infantes con desordenes clínicos. También se observo la disminución de la actividad bactericida en infantes con sepsis, enfermedades respiratorias, hiperbilirubinemia y ruptura prematura de la membrana. (73, 74, 77, 81)

Los macrófagos juegan un papel importante en la modulación de la respuesta a anticuerpos, el procesamiento del antígeno por el macrófago neonatal es relativamente deficiente comparado con el procesamiento de antígeno realizado por un macrófago de un adulto. (56, 67)

Las funciones efectoras de los monocitos de neonatos, como son la fagocitosis y la actividad bactericida, son comparadas con los monocitos de adultos, pero la quimiotaxis se presenta disminuida. (75) Además, de la disminución en la quimiotaxis, también existe una disminución en la síntesis de IL-1, IL-6, y TNF- $\alpha$ , así como en los factores que promueven la fagocitosis, fibronectina C3 y el factor B. (61, 75, 79) Los linfocitos de recién nacidos presentan un deterioro en la producción del factor activador del macrófago, es decir, el IFN- $\gamma$ , por lo tanto, los macrófagos de recién nacidos no se activan normalmente a la exposición del IFN- $\gamma$ , lo cual podría crear en el infante una respuesta defectuosa a infecciones por una variedad de microorganismos. Estos hallazgos demuestran que las deficiencias en la función de los monocitos/macrófagos juegan un papel significativo en la disminución de la respuesta inmune-inflamatoria en el recién nacido. (56, 57)

La privación de proteína en ratones, resulta una disminución similar de la capacidad de los macrófagos para ser activados, el cual puede explicarse, en parte, a que la inmunidad celular está asociado con la desnutrición. (68)

El proceso de fagocitosis es observa afectada en la malnutrición proteico-energetica. Finalmente, en trabajos recientes, en humanos y animales, demostraron que la producción de IL-1, IL-2 e INF- $\gamma$  está disminuída en la malnutrición protéico-energética. La experimentación en animales de laboratorio ha extendido estas observaciones a la deficiencia ciertos micronutrientes. (23)

Sin embargo, la malnutrición humana es usualmente un síndrome compuesto de deficiencias de múltiples nutrientes. La deficiencia de zinc, adquirida o inherente, esta asociada con la disminución en la función del macrófago. Este defecto funcional puede contribuir al incremento de la susceptibilidad a infecciones y al desarrollo de tumores. (24, 67, 74)

## 2.6 EL ZINC Y LAS CITOCINAS

Las citocinas también conocidas como interleucinas, son mensajeros clave de las células, regulan múltiples aspectos de la biología de los leucocitos. Sus efectos están mediados a través de receptores de las células blanco. La producción o actividad biológica de múltiples citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , Factores inhibidores de migración) influyen en el desarrollo y funcionamiento de los linfocitos T y B así como el macrófago afectados por la deficiencia de zinc. (5)

### Efecto del zinc sobre las monocinas

Los niveles de zinc fisiológicos (0.012-0.016 mM) son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de la función inmune. Recientemente se ha demostrado que un exceso de zinc (0.25 mM) induce la liberación de IL-1 $\beta$ , IL-6 y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en monocitos y macrófagos, indicando que el papel inmunológico del zinc es probablemente de mediar la activación del macrófago y la liberación de monocinas. (18, 31)

En un modelo realizado "*in vitro*" comparando la situación "*in vivo*", se encontró que la secreción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  inducida por lipopolisacárido actúa de manera sinérgica por la adición de iones de zinc dentro del índice de concentración recomendado clínicamente, mientras que el estímulo con superantígenos de enterotoxinas de estafilococo A y E son inhibidas por el zinc. Además, el zinc aumenta la acción del lipopolisacárido sobre el monocito, dando como resultado la activación del monocito. (31, 66, 78).

El zinc actúa de manera sinérgica con el lipopolisacárido. El efecto sinérgico es causado por una interacción directa del zinc con el lipopolisacárido, los iones del zinc causan un cambio en el flujo de iones formando una fase activa biológicamente. (78,79) El lipopolisacárido es una endotoxina bacteriana que tiene un papel principal en la septicemia causada por bacterias Gram (-). El estímulo del monocito por el lipopolisacárido es dependiente de LBP, una proteína de unión a lipopolisacárido que interactúa con el lipopolisacárido en el medio de cultivo. El complejo LPS/LBP se une al antígeno CD14 presente en la superficie del monocito, lo cual provoca el estímulo del monocito y la liberación de monocinas. (32, 78)

El mecanismo por el cual el zinc induce la liberación de monocinas es desconocido, se cree que existe la posible intervención mensajeros intracelulares involucrados en las señales de trasducción mediadas por el zinc. La exacta vía de señalización, que induce la estimulación del monocito por el zinc es desconocida. (77)

### El zinc y el TNF- $\alpha$

La producción de citocinas derivadas del macrófago, como son la IL-1 y el TNF- $\alpha$  se ve afectada por la ingestión de una dieta deficiente de zinc así como en una restricción en la ingesta de alimento; el efecto, sin embargo, es mucho más profundo para el TNF- $\alpha$ . En un estudio realizado en un modelo murino deficiente de zinc en la dieta, se observa una disminución en la producción de TNF- $\alpha$ ; la

producción de TNF- $\alpha$  es tardía en estos animales, la alteración es en los ámbitos de la cinética y en la magnitud de la producción. (66, 67)

El posible papel del zinc, regulando la secreción de IL- $\beta$  y TNF- $\alpha$  en monocitos de humano, se ha investigado, recientemente se realizaron estudios "*in vitro*", con la característica de utilizar medio de cultivo libre de suero fetal, bajo estas condiciones, la adición de zinc a las células de cultivo más la adición del lipopolisacárido, estimula la secreción de TNF- $\alpha$ . (65)

En condiciones de deficiencia de tipo protéica, se tienen resultados contradictorios en la producción de IL-1, no así en el TNF- $\alpha$ , presentándose una tendencia hacia la disminución en la producción. En un estudio realizado por Fileau y colaboradores se observó, resultados contradictorios en la producción de TNF- $\alpha$  en animales con una desnutrición proteico-calórica se observó un aumento en la producción de TNF- $\alpha$ . (36)

Los mecanismos por los cuales la deficiencia de zinc regula la producción de TNF son desconocidos. El zinc puede ser requerido en el ámbito de transcripción, traducción del RNAm de TNF- $\alpha$  o en el ámbito de la secreción de la proteína. La secreción de TNF- $\alpha$  involucra una proteasa, una metaloenzima dependiente del zinc, sugiriendo que la deficiencia de zinc es quizás un factor limitante en la producción y secreción de TNF- $\alpha$ . El zinc limita la actividad catalítica de proteasas, las cuales hidrolizan el enlace entre la membrana y el dominio de la pro- TNF y ser secretada al medio como citocina. (18, 39)

Una característica común que desarrollan las sustancias tóxicas es el daño en el tejido y un subsecuente inicio de una respuesta inflamatoria involucrando la producción de citocinas. Una de ellas el TNF- $\alpha$ , diversos experimentos describen que altos niveles de TNF- $\alpha$  durante la gestación se asocian con una disminución en el suministro de zinc disponible para el desarrollo del embrión, resultando un efecto teratogénico, observándose severos defectos en el sistema nervioso central. (45, 71)

En un estudio realizado por Flieger y colaboradores se demostró que el zinc puede inhibir la citotoxicidad mediada por el TNF- $\alpha$  y evitar la muerte celular programada. El mecanismo por el cual sucede este efecto podría ser por que el zinc altera la estructura de las ceramidas, las cuales son mensajeros intracelulares del TNF- $\alpha$  aunque el zinc inhibe la apoptosis en general. (28, 63, 76)

La combinación de TNF- $\alpha$  y una deficiencia de zinc marginal proporciona un efecto altamente teratogénico, pero estos efectos se reducen por la acción de la suplementación con zinc. La suplementación con zinc puede disminuir la teratogenicidad del TNF- $\alpha$ , estos hallazgos son relevantes en mujeres embarazadas con condiciones que resultan en una respuesta de fase aguda caracterizada por inflamación y producción de citocinas así como sus implicaciones en la prevención de defectos en el nacimiento. (60, 71)

## 2.7 EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA

La denominación del "factor de necrosis tumoral", se aplica a un factor sérico identificado en ratones con shock endotóxico por Lloyd J. Old y colaboradores. Esta observación hizo que William B. Coley, estableciera las bases del tratamiento del cáncer con las "toxinas de Coley", a principios de este siglo. Edward O'Malley y colaboradores, señalaron que el efecto antineoplásico de la endotoxina era debido a un factor sérico endógeno potenciado por la propia endotoxina. Los experimentos realizados en el laboratorio de Old, confirmaron esta observación y señalaron que el factor de necrosis tumoral se sintetizaba por los macrófagos. (14)

El TNF- $\alpha$  es una molécula multifuncional secretada por los monocitos/macrófagos activados, ejerciendo una función clave en la red de citocinas consideradas en la patogénesis de muchas enfermedades infecciosas e inflamatorias. Fue originalmente caracterizado como un agente antitumor y como un factor citotóxico para muchas células malignas. Ahora es claro que juega un papel importante en la defensa contra infecciones parasitarias, víricas y bacterianas así como en enfermedades autoinmunes. La inducción natural del TNF- $\alpha$ , es protectora, pero la sobreproducción puede ser perjudicial o letal para el huésped. (33, 35)

Existe evidencia considerable que la sobreproducción o la producción inapropiada de TNF- $\alpha$  es clave en varias enfermedades inflamatorias crónicas. La gran cantidad producida de TNF- $\alpha$  por el macrófago en respuesta a un estímulo inflamatorio, como lo es el lipopolisacárido y la unión de TNF- $\alpha$  en los receptores presentes en la mayoría de las células en todo el cuerpo sistemáticamente

modifica las propiedades anticoagulantes de las células endoteliales, la activación de los neutrófilos y la inducción de otras citocinas inflamatorias, provocando un colapso cardiovascular. Por el contrario, los niveles bajos de TNF- $\alpha$  pueden contribuir a la respuesta inflamatoria. (7, 29)

### La molécula de TNF- $\alpha$

El TNF- $\alpha$  humano se sintetiza como una pro-proteína que consta de 233 aminoácidos, con una masa molecular de 26 Kda. La pro-proteína es desdoblada por una metaloproteasa, también denominada enzima convertidora-TNF (TACE), cediendo el paso a una forma monomérica de 17 KDa que tiene 157 aminoácidos no glicosilados, en condiciones fisiológicas el TNF- $\alpha$  forma una unión no covalente como un homotrímero.(18, 43)

La forma de la molécula aparece como un cono triangular, en el cual cada tres subunidades tiene una estructura típica de  $\beta$ -espiral. Cada subunidad consta de dos láminas  $\beta$ -plegadas. Las tres subunidades son reorganizadas al filo de la superficie. El exterior de las láminas- $\beta$  son ricas en residuos hidrofílicos, mientras el interior de la lámina es hidrofóbica y contiene el segmento C-terminal, el cual, está localizado en el eje central del trímero. La estructura es similar a algunas de las cápsidas de virus de animales y plantas. (7, 35)

### Receptores del TNF- $\alpha$

Los efectos del TNF- $\alpha$  son transmitidos a través de las moléculas unidas a sus receptores de membrana. Los receptores del TNF- $\alpha$  están presentes en casi todos los tipos de células, con pocas excepciones, como lo son los eritrocitos y los

linfocitos T no activados. El número de receptores varía de 200 hasta 10 000 y la constante de unión es de alrededor de  $2 \times 10^{-10} \text{M}$ . Aunque la presencia del receptor de TNF es un pre-requisito para llevar a cabo el efecto biológico, no hay correlación entre el número de receptores y la magnitud o dirección de la respuesta. (7, 35)

Existen dos tipos de receptores, los cuales pueden ser diferenciados por su peso molecular o por el reconocimiento de anticuerpos monoclonales. El primer receptor tiene un peso molecular de 55 Kd y se le conoce como TNF-R55 o TNF-RI (CD120a); el segundo receptor tiene un peso molecular de 75 Kd y puede distinguirse como TNF-R75 o TNF-RII (CD120b). El receptor de TNF-R55 parece ser ubicuo y se encuentra sobre células epiteliales y fibroblastos. El TNF-R75 está restringido a células de origen hematopoyético, por ejemplo se expresa fuertemente sobre la célula T. (35, 70)

La cadena DNAC del receptor TNF-RI en el humano tiene una secuencia de 426 aminoácidos con un dominio extracelular de 182 aminoácidos y dominio intracelular de 221 aminoácidos. Por el contrario la cadena de DNAC del receptor del TNF-RII está conformada por 439 aminoácidos, y consta de un dominio extracelular de 235 aminoácidos y un dominio intracelular de 174 aminoácidos. Por lo que existe una amplia ausencia de homología en el dominio intracelular de ambos receptores, sugiriendo que los receptores utilizan diferentes vías de señalización, por lo que los receptores modulan diferentes funciones. (70)

Se han identificado varias proteínas que están unidas intracelularmente a la familia de los receptores de TNF han sido identificadas. Las primeras en ser identificadas

son los factores asociados a los receptores-TNF (TRAFs), los cuales tienen una gran afinidad por el receptor TNF-R75. La mayoría contiene dos motifs con terminación de dedos de zinc y anillos. (7)

### Propiedades biológicas del TNF- $\alpha$

La capacidad inmunoestimuladora del TNF- $\alpha$  puede ser benéfica para el huésped. Existen numerosos indicios de que el principal papel del TNF- $\alpha$  es el de ser un importante mediador en la protección contra infecciones bacterianas, parasitarias y vírales. Hay múltiples vías en las cuales el TNF- $\alpha$  contribuye a combatir contra la infección como es: la activación de neutrofilos y plaquetas, aumenta en la actividad microbicida del macrófago y la activación del sistema inmune etc. Muchos tipos de células infectadas por virus o bacterias llegan a ser susceptibles al efecto citotóxico del TNF- $\alpha$ . (15, 29, 33, 35)

El TNF tiene múltiples actividades estimuladoras sobre las células T, incluyendo la respuesta proliferativa hacia el antígeno, incremento en la expresión de receptores de IL-2 e induce la producción de INF- $\gamma$ . Basados sobre la actividad antitumor de las "toxinas de Coley" en humanos, el TNF- $\alpha$ , el cual su nombre se basa en la capacidad de inducir la necrosis de tumor en ratones, ahora se considera un potente agente antitumor en la clínica. Los estudios preclínicos sobre el TNF- $\alpha$  revelan que es más citotóxico que la IL-1 para una variedad de líneas celulares tumorales "in vitro". Sin embargo, el efecto antitumor "in vivo" del TNF- $\alpha$  en el ratón no se basa sobre la eliminación directa de la célula tumoral si no en la inducción de la necrosis tumoral hemorrágica junto con un aumento en la

inmunidad celular rechazando así el tumor. El TNF- $\alpha$  junto con la cascada de citocinas puede también indirectamente promover el rechazo del tumor. (35, 40 69)

Varias moléculas de superficie inmunológicas son inducidas por el TNF- $\alpha$ , las moléculas de MHC clase I son inducidas por las células endoteliales y fibroblastos. Estos efectos en las estructuras involucradas en la presentación del antígeno hacia la célula T junto con la producción de IL-1 tienen un efecto positivo sobre la migración y activación de las células T y B. (33)

Los efectos de protección no específicos contra microorganismos patógenos son afectados por la producción de TNF- $\alpha$ . La actividad antiviral del TNF- $\alpha$  se ha demostrado en fibroblastos y parece estar mediado a través de la producción de IFN. Otro estudio también observó la actividad antiviral del TNF- $\alpha$  pero concluye que esta, es independiente de la producción de IFN- $\gamma$ .

Algunos de los principales efectos biológicos del TNF- $\alpha$  se resumen en la siguiente tabla.

---

**Tabla 4. Efectos biológicos del TNF- $\alpha$**

---

**A. Propiedades Inmunológicas**

Activación de linfocitos T

Incremento en la expresión del IL-2R

Activación de linfocitos B

Actividad de las células NK: sinergismo con IL-2 e IFN

Expresión del gen de linfocina

**B. Propiedades Proinflamatorias**

Fiebre, sueño, anorexia, liberación de neuropeptidos, expresión del gen para complemento; supresión de la síntesis de P450.

Activación de las células endoteliales, incremento en la expresión de moléculas de adhesión, degranulación de eosinófilos, hipotensión, shock, infiltración de neutrófilos al tejido vía IL-8, hiperlipidemia, expresión del gen ciclooxigenasa y lipoxigenasa, síntesis de colagenasa y colágeno; activación de osteoclastos.

---

Tomado de la referencia 29

Otra propiedad biológica no inmunológica del TNF- $\alpha$  es la de ser un potente pirógeno endógeno. Causa fiebre a través de un efecto directo sobre los centros reguladores del hipotálamo y a través de la inducción de IL-1. Así como el incremento en las proteínas de fase aguda y una disminución en la síntesis de albúmina. (29)

La prolongada secreción de grandes cantidades de TNF- $\alpha$ , está implicada en la patogénesis de síndromes clínicos como son el choque séptico y la caquexia que pueden eventualmente ser controlados por el bloqueo de TNF- $\alpha$ . (15, 30, 32)

### El TNF-alfa en las etapas perinatales

El TNF- $\alpha$  es un importante mediador de la respuesta del huésped hacia el estrés y la infección, pero poco se conoce acerca de sus actividades en la edad temprana. El deterioro en la respuesta inmune y febril en el período perinatal, puede ser el resultado de una regulación anormal de la monocina. (34)

Los resultados de estudios previos sobre la capacidad de las células de recién nacidos saludables para producir monocinas han sido contradictorios, presentándose normal o disminuida la producción de TNF- $\alpha$ , comparado con las células de adultos saludables. Se piensa que el daño en la respuesta inmune en infantes con complicaciones perinatales, podrían estar relacionados con las anomalías en la producción de citocinas específicas. (34, 60)

En el periodo perinatal se ha observado que existe un incremento en el riesgo a adquirir infecciones sistémicas. Se han obtenido resultados contradictorios, estudiando la secreción de TNF- $\alpha$  por monocitos del cordón umbilical, observándose que los monocitos de sangre periférica de infantes en término y pretermino, estimulados con lipopolisacárido, presentan una disminución en la secreción de TNF- $\alpha$  cuando es comparado con células de adultos. Una posible consecuencia es la disminución de la capacidad de responder con fiebre en el caso de una infección, una función fisiológica llevada a cabo por el TNF- $\alpha$ . (61)

En infantes con una severa infección perinatal, se ha observado que los niveles de IL-6 en el cordón umbilical se muestran elevados, mientras que los niveles de

TNF- $\alpha$  están disminuidos. Una posible explicación es el hecho de inducir con la infección la producción de PGE<sub>2</sub> (ya sea de la madre o el feto) puede suprimir la producción de TNF- $\alpha$ . El defecto funcional de los monocitos neonatales podría contribuir en el incremento de la susceptibilidad de los recién nacidos por infecciones sistémicas. (57, 61)

La deficiencia relativa en la producción de TNF- $\alpha$  por monocitos de infantes en pretermino puede tener la función de proteger y ayudar al crecimiento fetal. Las diferencias en la secreción de la monocina regulan la diferenciación del monocito durante la maduración del feto. La maduración funcional de los monocitos ocurre durante la gestación y puede explicar la asociación entre el TNF- $\alpha$  y la edad gestacional. (75)

### III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El zinc es un micronutriente esencial para la inmunocompetencia. La carencia o la deficiencia marginal de este elemento produce una serie de efectos negativos como trastornos en la gestación, retraso en el crecimiento, alteraciones tanto en la inmunidad celular como humoral. (9, 10, 38) Debido a la participación del zinc en la respuesta inmunológica se han realizado varios experimentos en el Laboratorio de Investigación en Inmunología en el sentido de encontrar resultados que ayuden ampliar el conocimiento actual sobre la influencia del zinc en diferentes aspectos de la respuesta inmune.

Por esta razón, se ha evaluado el efecto que provoca la administración de dosis moderadas de zinc durante las etapas de gestación, lactancia y destete en el ratón, mostrando que la intervención con zinc tiene un efecto positivo sobre algunas funciones de la respuesta inmune. (49, 50, 52, 53)

Sin embargo, se desconoce el efecto de la administración del metal en la producción de monocinas y su efecto en el sistema inmunológico. Para evaluar el efecto del metal en el macrófago se cuantificó la producción de TNF- $\alpha$ , citocina que tiene un papel importante en el metabolismo del cuerpo humano. Su liberación y acción se modifican por acción del zinc y en general por el estado nutricional, sugiriendo que el impacto en el huésped es de gran importancia. (7, 15, 29, 36)

Para observar este efecto, en el presente trabajo, se administró a ratones BALB/c en el agua de bebida, una concentración de 500 mg/L de acetato de zinc y se cuantificó la producción de TNF- $\alpha$  de macrófagos peritoneales a las tres y seis semanas de edad de la progenie.

## IV. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto que tiene la suplementación con zinc sobre la producción de citocinas de macrófagos peritoneales durante el periodo perinatal en ratones BALB/c.

### OBJETIVO PARTICULAR

Evaluar los efectos de la suplementación con zinc sobre la producción de TNF- $\alpha$  en un modelo murino en etapas perinatales.

## **V. MATERIAL Y METODOS**

### **5.1 Animales**

Se utilizaron ratones singénicos BALB/c los cuales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Química. Se les administró agua y alimento *ad libitum* (Lab Diet 5015 St Louis M063144). Para formar los grupos de experimentación los animales tanto macho como hembra debieron tener un peso promedio de 22 gramos, al cumplir este peso los animales se aparearon, cuando la hembra se observaba preñada, se sacrificó al macho; posteriormente se registró la fecha de nacimiento de sus crías, a partir de esa fecha se consideraron 3 semanas de vida de las crías y se seleccionaron las crías para trabajar en ese momento la madre se sacrificó y los ratones restantes cumplieron la edad de 6 semanas estos animales se utilizaron para trabajar al cumplir esta edad.

### **5.2 Peso de los animales**

El peso corporal de la camada de cada cruce, fue monitoreado cada tercer día durante las tres o seis semanas de vida de las crías. Así se obtuvieron las curvas de crecimiento de cada grupo de experimentación

### **5.3 Diseño experimental**

Los animales de experimentación tomaron agua desionizada con 500 mg/L de acetato de zinc (Mallinckrodt No. Cat. 8740, Kentucky), y los animales del grupo testigo tomaron agua desionizada. El suplemento con zinc se administró desde el momento de la cruce. Para el trabajo experimental se clasificaron en los grupos

correspondientes, grupo I las crías que se trabajaron a las 3 semanas de nacidos y recibieron zinc "in vivo", así como un grupo testigo, animales que no recibieron zinc pero que tenían 3 semanas de edad. En el grupo II se encuentran las crías que recibieron zinc con 6 semanas de nacimiento, así como su grupo testigo, crías que no recibieron zinc pero tenían la misma edad. Cada grupo experimental constó de 10 animales.

El suplemento con zinc, fue administrado en el agua de beber, durante las etapas de gestación, lactancia y destete, (Tabla I).

**Tabla I. Grupos de animales y periodos durante los cuales estuvieron en tratamiento**

GRUPOS	GESTACION animal progenitor cepa BALB/c	LACTANCIA progenie (F1) (6 semanas de tratamiento)	DESTETE progenie (F1) (9 semanas de tratamiento)
	Zinc administrado <i>in vivo</i> en mg/L		
Testigo	0	0	-
I	500	500	-
Testigo	0	0	0
II	500	500	500

El grupo I recibió el suplemento con zinc durante la gestación y la lactancia. El grupo II recibió el suplemento con zinc durante la gestación, la lactancia y el destete. A los grupos denominados como testigo no se les administro zinc. A las 3 y 6 semanas de edad de las crías, que corresponden a los periodos de lactancia y destete respectivamente, se realiza el estudio de la producción de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneales.

Los animales de los grupos de experimentación se sacrificaron, para la realización del cultivo de macrófagos peritoneales, se obtuvieron así los sobrenadantes para la cuantificación de la producción de TNF- $\alpha$ .

#### **5.4 Estudio de la producción de TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneales**

##### **a) Técnica de cultivo de macrófagos peritoneales**

Para la obtención de los macrófagos se utilizaron ratones hembras y machos de los grupos de experimentación. En condiciones de esterilidad se extrajeron los macrófagos del peritoneo, después de inyectar 5 mL de medio RPMI 1640 (Hyclone No. Cat. B-0304-Ax, Utah) y dar un masaje suave en el área durante 5 minutos. Las células obtenidas se lavaron dos veces por centrifugación a 400 g durante 10 minutos a 4°C.

El número de células se determinó mediante el conteo en una cámara de Neubauer, se observó una viabilidad celular mayor al 95%, usando la exclusión del colorante vital azul tripano (Flow Laboratories Va22102 USA). La concentración final de la suspensión de células se ajustó a  $1 \times 10^6$  células/mL en medio RPMI 1640 suplementado (ver anexo C) manteniéndose en un baño de hielo.

Los cultivos se realizaron en microplacas de poliestireno con 12 pozos de fondo plano (Costar No. Cat. 3512 Cambridge). En cada pozo se depositaron 500  $\mu$ L de la suspensión de macrófagos. La microplaca se mantuvo a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> durante una hora.

Después del periodo de incubación, las células no adheridas se retiraron por aspiración. Se depositaron en cada pozo 500  $\mu$ L de medio RPMI 1640 suplementado, adicionando 5  $\mu$ L de lipopolisacárido (LPS) (Sigma No. Cat. L-2880 St. Louis), para la activación de las células. En otros pozos no se adicionó el lipopolisacárido, solo se adicionaron 500  $\mu$ L del medio RPMI 1640 suplementado. La microplaca se mantuvo a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas, el tiempo óptimo de acuerdo a la cinética de producción del TNF- $\alpha$ . Al terminó del cual, se recogieron los sobrenadantes de cada pozo y se centrifugaron a 660 g durante 10 minutos para posteriormente cuantificar la concentración de TNF- $\alpha$ . (sección c)

#### **b) Cinética de Producción de TNF- $\alpha$ .**

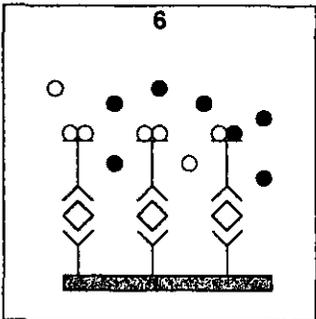
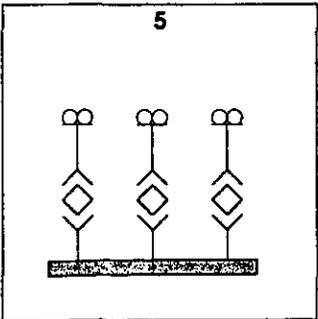
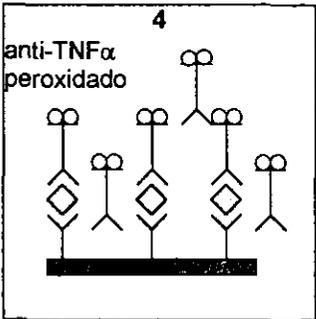
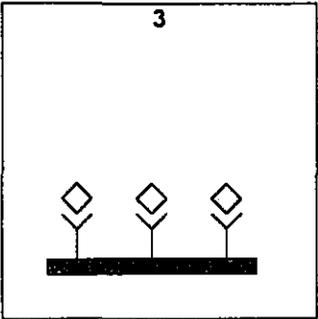
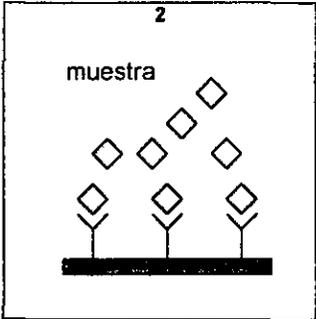
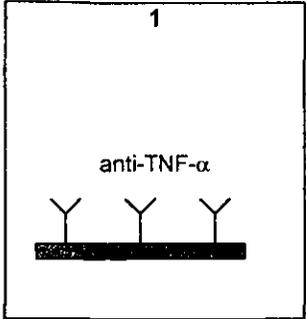
Se realizó el cultivo de macrófagos, con células de animales testigo, el cultivo siguió las condiciones antes descritas, para la producción de TNF- $\alpha$ . Se recogieron los sobrenadantes de cada pozo a diferentes tiempos de incubación 12, 24 y 48 horas, se cuantifico la concentración de TNF- $\alpha$ . (sección c)

#### **c) Determinación de la concentración de TNF- $\alpha$ por medio de un ensayo inmunoenzimático.**

Se realizó el ensayo inmunoenzimático con un equipo de reactivos comercial, Genzyme Mouse TNF ELISA Kit, (Cambridge No. Cat. 80-2903-00A), el cual se fundamento en el método del doble anticuerpo y se describe a continuación:

1. Se utilizó una microplaca de 96 pozos previamente recubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$ , para capturar el TNF- $\alpha$  presente en los sobrenadantes de cultivo y estándares. (Cuadro 1, fig. 1)
2. Se adicionaron en cada pozo de la microplaca, 100  $\mu$ L de los sobrenadantes obtenidos del cultivo de macrófagos peritoneales, se selló la placa con cinta adhesiva y se incubó durante 2 horas a 37°C. (Cuadro 2, fig.1)
3. Después del periodo de incubación, se removió el líquido por inversión de la placa, se procedió a lavar la placa 4 veces. (Cuadro 3, fig. 1)
4. Se adicionaron en cada pozo de la microplaca, 100  $\mu$ L de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  peroxidado, y se procedió a incubar la microplaca durante 1 hora a 37°C. (Cuadro 4, fig.1)
5. Se repitió el paso no.3, eliminando así los reactivos no unidos. (Cuadro 5, fig. 1)
6. Se adicionaron en cada pozo 100  $\mu$ L del sustrato (mezcla de peróxido de hidrogeno 0.01 N y tetrametilbenzidina en metanol), el anti-TNF- $\alpha$  peroxidado reaccionó con el sustrato, generando un cambio de color, mediante la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se adicionaron 100  $\mu$ L de la solución de paro ( $H_2SO_4$  1M) por cada pozo. (Cuadro 6, fig.1)
7. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (BECKMAN Biomeck 1000). En cada ocasión se incluye en la placa una curva patrón, con 100  $\mu$ L de cada una de las soluciones que contenían 35, 140,560 y 2240 pg/mL del estándar de TNF- $\alpha$  recombinante de ratón. Ver anexo.

**Fig.1** Ensayo inmunoenzimático por la técnica del doble anticuerpo. Los números corresponden a los de la lista en la pagina anterior

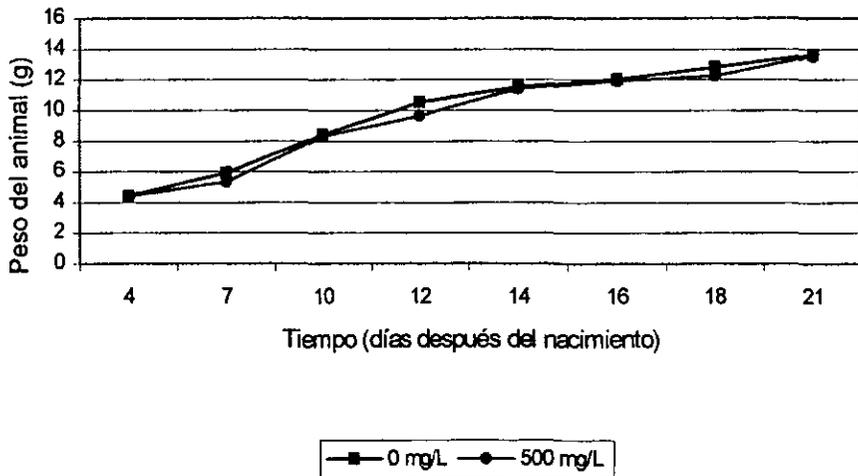


## VI. RESULTADOS.

### Efecto del zinc en el crecimiento de los animales.

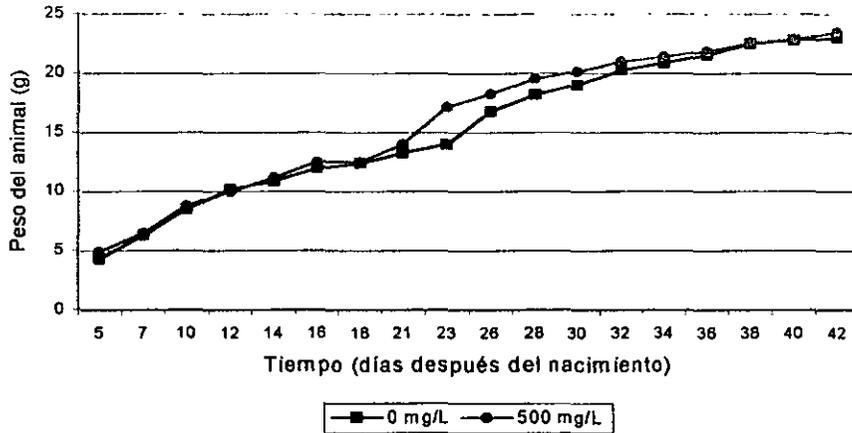
El consumo adecuado del zinc durante el embarazo mantiene las concentraciones adecuadas de zn en el plasma de la madre, lo cual tiene un efecto positivo en el peso de las crías al nacimiento, mientras que, como se ha descrito en diferentes modelos animales la deficiencia de zinc afecta el crecimiento y desarrollo de las crías, (9,10) por tal razón en el presente trabajo, se realizaron las curvas de crecimiento de los diferentes grupos de estudio, tomando el peso corporal como parámetro medible. Los resultados se presentan en las Gráficas 1 y 2.

Gráfica 1. Curva de crecimiento de los animales suplementados con zinc, comparados con el grupo testigo a las 3 semanas de edad



Los resultados se muestran como el promedio de 5 camadas. Diferencias no significativas.

Gráfica 2. Curva de crecimiento de los animales suplementados con zinc, comparados con el grupo testigo a las 6 semanas de edad.



Los resultados se muestran como el promedio de 5 camadas. Diferencias no significativas.

Ambas gráficas muestran que no hubo diferencias significativas entre las curvas de crecimiento de los animales suplementados con zinc y sus grupos testigo a las edades estudiadas. No se observaron efectos de toxicidad por la suplementación crónica del zinc.

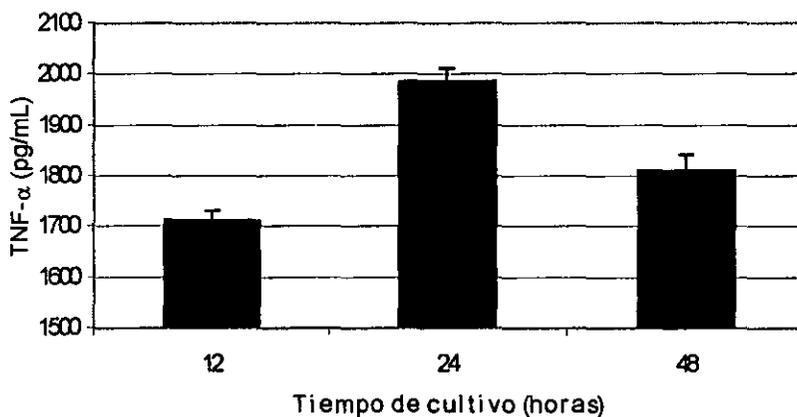
### **Evaluación del tiempo óptimo de recolección de sobrenadantes para la cuantificación de TNF- $\alpha$**

Con la finalidad de determinar el tiempo óptimo para la recolección de sobrenadantes del cultivo de macrófagos, se realizó un cultivo de macrófagos

peritoneales y se recogiendo los sobrenadantes a las 12, 24 y 48 horas de incubación después de la adición de lipopolisacárido (1µg/mL), determinando en cada tiempo la concentración de TNF-α por medio de un ensayo inmunoenzimático.

Los resultados se presentan en la siguiente Gráfica, (Gráfica 3)

Gráfica 3 Tiempo óptimo de recolección de sobrenadantes



La gráfica presenta los resultados como las medias ± la desviación estándar de 3 determinaciones.

Con estos resultados se tomó la decisión de que el tiempo óptimo de recolección fuese de 24 horas de incubación, tiempo en el cual se observó mayor producción de TNF-α.

## Efecto de la suplementación con zinc en la producción de TNF- $\alpha$ en etapas perinatales.

Los resultados correspondientes se presentan en la siguiente tabla 1.

**Tabla1. Producción de TNF- $\alpha$**

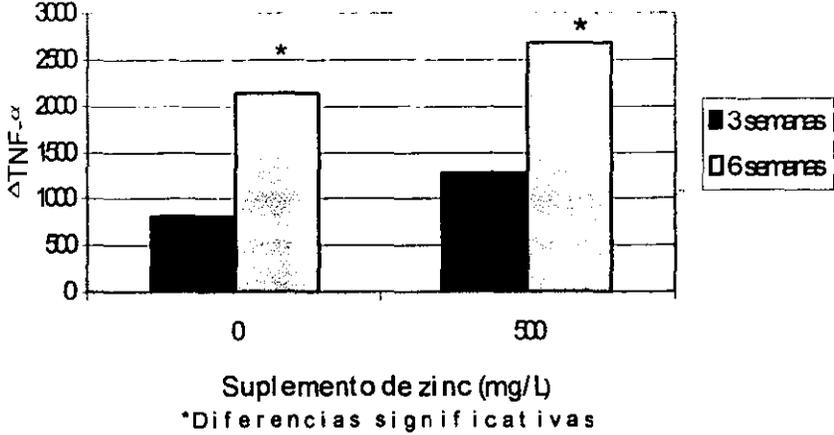
	$\Delta$ TNF- $\alpha$
Testigo	818
Grupo I	1275.8
Testigo	2140.9
Grupo II	2675.5

Los resultados presentados en la tabla son  $\Delta$  de la concentración de TNF- $\alpha$  es decir la diferencia entre la concentración de TNF- $\alpha$  de macrófagos estimulados con lipopolisacárido y los macrófagos no estimulados con lipopolisacárido. Con una n=10 por cada grupo.  $p<0.05$ .

Los ratones jóvenes (3 semanas de edad) produjeron menor cantidad de TNF- $\alpha$  con respecto a los animales de 6 semanas de edad. Se observa que en el grupo I hubo un aumento significativo en la producción de TNF- $\alpha$  de aproximadamente el 30% respecto al testigo, mientras que en el grupo II se observó un incremento también significativo del 20% en relación, a su testigo.

La gráfica 4 muestra la producción de TNF- $\alpha$  de ratones de tres y seis semanas de edad.

Gráfica 4. Producción de TNF- $\alpha$



Al aumentar la edad, la producción de TNF- $\alpha$  se incrementó; lo que probablemente se debió al desarrollo de las capacidades funcionales de los macrófagos. La maduración funcional de los macrófagos ocurrió en parte durante la gestación se observa que existe una asociación entre la expresión del TNF- $\alpha$  y la edad. (8, 75)

La capacidad funcional del macrófago relacionado al aumento de la producción de TNF- $\alpha$  se ve favorecido con la suplementación con zinc, de acuerdo a los resultados obtenidos; este hallazgo es de gran importancia debido a que en la etapa perinatal, normalmente se encuentra disminuida la producción de TNF- $\alpha$ .

(56,61)

En investigaciones previas se observó un efecto sinérgico del lipopolisacárido y los iones de zinc. (65, 76,78) En el modelo murino utilizado en nuestro estudio se observó también el efecto sinérgico de la adición del lipopolisacárido y la suplementación con zinc, los resultados obtenidos aparecen en la siguiente tabla, (Tabla 2).

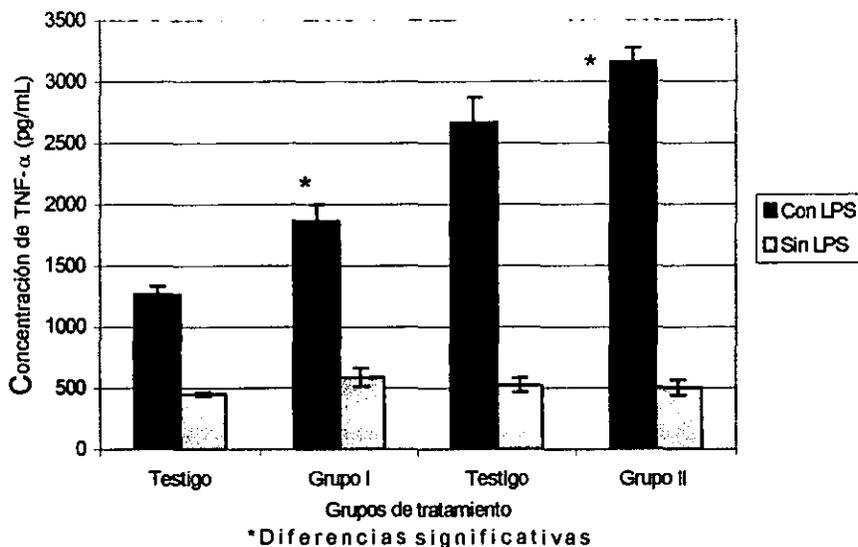
**Tabla. 2 Influencia del lipopolisacárido sobre la producción de TNF- $\alpha$**

	Sin lipopolisacárido	Con lipopolisacárido
Testigo	451.3 $\pm$ 66.5	1269.3 $\pm$ 66.5
Grupo I	588.6 $\pm$ 77.9	1864.4 $\pm$ 137
Testigo	525.0 $\pm$ 59.8	2665.9 $\pm$ 206.4
Grupo II	501.3 $\pm$ 62.3	3158.8 $\pm$ 115.9

Los resultados presentados en la tabla son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de la concentración de TNF- $\alpha$  de macrófagos peritoneales a los que se adicionó lipopolisacárido (1  $\mu$ g/mL).  $p < 0.05$

Los resultados obtenidos muestran que la adición de lipopolisacárido a los macrófagos peritoneales, aumentó la producción de TNF- $\alpha$  y más aún en el caso de los macrófagos de animales suplementados con zinc (grupo I y grupo II), cuando se comparó con los macrófagos a los que no se adicionó lipopolisacárido, esto se muestra en la gráfica 5.

Gráfica 5. Producción de TNF- $\alpha$  por cultivo de macrófagos estimulados con lipopolisacárido



El valor promedio de TNF- $\alpha$  liberado, en los grupos a los que no se les adicionó lipopolisacárido permanece constante, no así en el grupo I donde se observó un ligero aumento, con significancia estadística ( $p < 0.05$ ), con respecto a su testigo. Ese incremento, que puede explicarse como efecto de la suplementación con zinc, no se observó así en el grupo II.

En diversos trabajos realizados "*in vivo*" como "*in vitro*", se ha reportado un aumento en la liberación de citocinas después de suministrar o adicionar zinc a

células mononucleares de animales y humanos, datos que son confirmados con nuestros resultados. (31, 65, 66, 78, 79)

Estos resultados muestran la importancia de este elemento traza en la función del macrófago, específicamente en la producción de citocinas, sugiriendo la posibilidad de la regulación de las funciones del macrófago en etapas perinatales.

Los niveles de zinc y la edad son factores que afectan la respuesta inmune y predisponen al huésped a ser susceptible a enfermedades infecciosas. (22, 24) Los efectos benéficos del TNF- $\alpha$  en la resistencia a infecciones se deben a la producción de pequeñas cantidades en los sitios locales de la infección. La producción de estas cantidades de TNF- $\alpha$ , se observan en presencia de infecciones causadas por bacterias Gram (-), nuestros datos sugieren que los niveles de zinc pueden ser un importante elemento regulador en la respuesta inmune durante la infección por bacterias Gram (-).

Nuestros resultados, indican que la suplementación con zinc, eleva la concentración de TNF- $\alpha$  que puede ser de gran ayuda en el periodo perinatal, donde existe una mínima producción de TNF- $\alpha$ . (61)

En una situación de balance, el TNF- $\alpha$  se comporta como el principal mediador en la lucha frente a la inflamación y a microorganismos invasores. Sin embargo, TNF- $\alpha$  puede producir efectos colaterales, ya que una excesiva producción de TNF- $\alpha$  causa serios trastornos en el huésped, es responsable de las principales alteraciones clínicas y bioquímicas del shock endotóxico, (33, 35) por lo que se sugiere que la suplementación con zinc debe de ser administrada cuidadosamente.

## VII. CONCLUSIONES

- ◆ Este trabajo permite observar que el zinc administrado "*in vivo*" (500 mg/L) en las etapas de gestación, lactancia y destete aumenta la liberación de TNF- $\alpha$  en macrófagos peritoneales estimulados con lipopolisacárido.
  
- ◆ Los resultados de esta tesis comprueban que el zinc es un elemento esencial en la respuesta inmune, afectando el funcionamiento del macrófago, provocando un incremento en la producción de TNF- $\alpha$ , sin producir efectos secundarios en los animales suplementados.

## ANEXO

### A. ANALISIS ESTADISTICO

Para determinar las diferencias significativas entre los grupos de estudio, los resultados se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA. Y se considera  $p < 0.05$  como significativa.

**Tabla 1 Los resultados obtenidos del cultivo de macrófagos donde se adiciono lipopolisacárido.**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Edad	18104779	1	18104779	822.1044	0.0000
Dosis	2959251	1	2959251	134.3741	0.0000
Edad-dosis	26112	1	26112	1.1857	0.2834
Error	792774	36	22021.5		
Total	21882528.1	39			

**Tabla 2 Los resultados obtenidos del cultivo de macrófagos donde no se adiciono lipopolisacárido.**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Edad	465.806	1	465.806	0.1213	0.7298
Dosis	32279.442	1	32279.442	8.3970	0.0064
Edad-dosis	64778.352	1	64778.352	16.8511	0.0002
Error	138576.62	36	3849.35		
Total	235893.57	39			

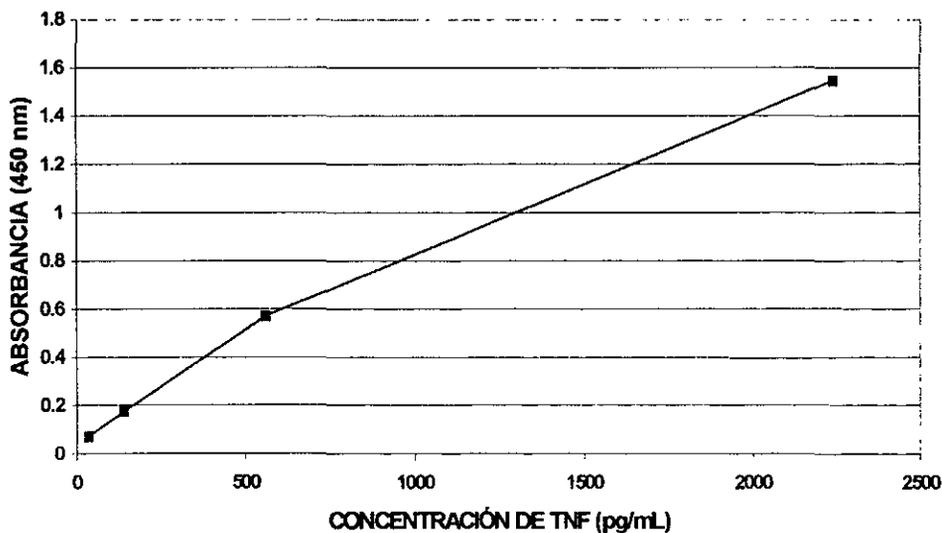
Para poder concluir que existen diferencias significativas se considera que el valor de p obtenido deberá ser menor que 0.05, y en caso de ser mayor se concluye que no hay diferencias significativas.

### B. Determinación de la concentración de TNF- $\alpha$

Para calcular la concentración de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de cultivo de macrófagos se tomaron los datos de absorbancia obtenidos en muestras de ambos grupos de trabajo y sus respectivos controles.

La curva patrón se gráfico, (figura 1) y con los datos que conforman cada una de las rectas se hace un análisis de regresión lineal.

**Fig. 1 Curva patrón**



Las absorbancias de las muestras que quedan dentro de la parte recta de la curva patrón se transforman a concentración de TNF- $\alpha$  (pg/mL) con los datos de la regresión lineal. (Tabla 1)

**Tabla. 1 Datos de regresión lineal de la curva patrón**

Concentración de TNF(pg/mL)	Absorbancia	Regresión lineal
35	0.070	$r= 0.995$
140	0.176	$m=0.001$
560	0.570	
2240	1.547	

### **C. Contenido del medio de Cultivo RPMI 1640 suplementado**

El medio de cultivo RPMI 1640 suplementado contiene una concentración final de 10% de suero fetal bovino(Sigma Chem. St. Louis USA No. Cat. F-2442), 2mM L-glutamina (Hyclone Road Utah USA No. Cat. B-3000-D), 0.5% de aminoácidos no esenciales (Microtab México), 0.5% de piruvato de sodio (Microtab México), penicilina 200 U/mL, estreptomicina 100 $\mu$ g/mL (Hyclone Road Utah USA No. Cat. B-3001-D).

## BIBLIOGRAFIA

1. Adams DO, Hamilton TA: "The cell biology of macrophages activation" **Ann Rev Immunol 1984 2:283-318**
2. Adams DO: "Macrophages activation" in: Roit (Ed) **Encyclopedia of immunology, Academic Press, 1992 pp 1020-1026.**
3. Agget PJ, Campbell DM and Page KR: "The metabolism of trace elements in pregnancy" in Chandra RK (Eds) **Trace element in Nutrition of Childre II, Worshop series vol. 23 Nestle Ltd, New York 1991.**
4. Agget PJ: "Zinc" **Annales Nestle 1994 52:103-117**
5. Arai K, Lee E, Miyajima A, Miyatake S: "Cytokines: coordinator of immune and inflammatory responses" **Annu Rev Biochem 1990 59:783-836.**
6. Auger MJ, and Ross JA: "The biology of the macrophage" in: Lewis CE and McGee JO (Eds) **The Natural Immune System, The Macrophage, Oxford University Press 1992.**
7. Bazzoni F and Beutler B: "The tumor necrosis factor ligand and receptor families" **New Engl J Med 1996 334:1717-1725**
8. Bradley SF, Vilohagool A, Kunkel SL and Kauffman CA: "Monokine secretion in aging and protein malnutrition" **J Leukoc Biol 1989 45:510-514**
9. Beach RS and Beutler B: "Reversibility of developmental retardation following murine fetal zinc deprivation" **J Nutr 1982 110:1169-1181**
10. Beach RS, Gershwin EM, Makishima RK and Hurley L: "Impaired Immunologic ontogeny in postnatal zinc deprivation" **J Nutr 1980 110:805-815.**
11. Beach RS, Gershwin EM and Hurley L: "Gestacional zinc deprivation in mice: persistence of immunodeficiency from three generations" **Science 1982 218:469-471**
12. Beck FW, Prasad AS, Kaplan J, Fitzgerald JT and Brewer G: "Changes in cytokine production and T cell subpopulation in experimentally induced zinc-deficient humans" **Amer Physiol Societ 1997 E1002-E1007.**
13. Berstein MS, Tong-starksen SE and Locksley RM: "Activation of human monocyte-derived macrophages with lipopolysaccharide decreases human

- immunodeficiency virus replication *in vitro* at the level gene expression" **J Clin Invest** 1991 88:540-545.
14. Beutler B, "Los factores de necrosis tumoral, caquetina y linfoxina" **Hospital Practice** 1992 1:178-189.
  15. Beutler B and Cerami A: "Cachetin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin" **Nature** 1996 320:584-588
  16. B Mutch and Hurley L: "Effect of zinc deficiency during lactation on postnatal growth and development of rats" **J Nutr** 1974 104:828-842.
  17. Betteger WJ and O'Dell BL: "Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells" **J Nutr Biochem** 1993 4:194-207.
  18. Black RA, Rauch CT, Koztosky JC: "A metalloproteinase desintegrin that releases tumor necrosis factor  $\alpha$  from cells" **Nature** 1997 385:729-733.
  19. Böttcher ML, Jenmalim MC, Garofalo RP and Bjorkstén B: "Cytokines in breast milk from allergic and nallergic mothers" **Pediatrs Res** 2000 47:157-162
  20. Bramblia CEM and Gonzalez VE: "Zinc: función e interacción con las moleculas de los sistemas biologicos" **Boletín de Educación Bioquímica** 1994 13:36-45.
  21. Brandao-Neto J, Stefan V, Mendoca BB and Castro AVB: "The essential role of zinc in growth" **Nutr Res** 1995 15:335-358.
  22. Chandra RK: "Trace elements and Immune Response" in: Chandra RK (Eds) **Trace element in Nutrition of Childre II, Workshop series vol. 23 Nestle Ltd, New York 1991 pp 201-214.**
  23. Chandra RK: "Single nutrient deficiency and cell-mediated immune responses: I:Zinc" **Am J Clin Nutr** 1980 33:736-738.
  24. Chandra RK: "Nutrition and Immunoregulation. Significance for host resitance to Tumors and infectious diseases in human and rodents" **J Nutr** 1992 122:754-757.
  25. Chandra RK: "Excessive intake of zinc impairs immune responses" **JAMA** 1984 252:1443-1446.
  26. Chvapil M, Stankova L, Bernhard DS, Weldy PL, Carlson EC and Campbell JB: "Effect of zinc on peritoneal macrophages *in vitro*" **Infect Immun** 1977 16(1):367-373.

27. Cook-Mills JM and Fraker PJ: "Functional capacity of the residual lymphocytes from zinc-deficient adult mice" **British J Nutrition** 1993 69:835-848.
28. Cunningham-Rundles S: "Zinc modulation of immune function: specificity and mechanism of interaction" **J Lab Clin Med** 1996 128:9-11.
29. Dinarello CA: "Role of Interleukine-1 and Tumor Necrosis Factor in systemic responses to infection and inflammation" in: Gallim JL and Goldstein IM (Eds) **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates, Raven Press Ltd New York, cap. 12, 1992 pp 211-231.**
30. Dinarello CA: "The proinflammatory cytokines Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor and treatment of the septic shock syndrome" **JID** 1992 163:1177-1184.
31. Driessen C, Hirv K, Kirchner H and Rink L: "Zinc regulates cytokine induction by superantigens and lipopolisaccharide" **Immunology** 1995 84:272-277.
32. Driessen C, Hirv K, Wellinghausen N, Kirchner H and Rink L: "Influence of serum on zinc, toxic shock syndrome toxin-1 and lipopolisaccharide-induced production of INF- $\gamma$  and IL-1 $\beta$  by human mononuclear cells" **J Leukoc Biol** 1995 57:904-908.
33. Eigler A, Sinha B, Hartman G and Endres S: "Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine" **Immunol Today** 1997 18:487-491.
34. English BK, Burchett SK and English JD: "Production of Lymphotoxin and Tumor Necrosis Factor by human neonatal mononuclear cells" **Pediatr Res** 1988 24:717-722.
35. Fiers W: "Tumor Necrosis Factor: characterization at the molecular, cellular and *in vivo* level" **FEBS Letter** 1991 285:199-212.
36. Filteau SM, Nicholas RS and Hal PhD: "Increased production of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 by peritoneal macrophages from severely undernourished mice: lack of correlation with serum corticosterone" **Nutr Res** 1991 11:1001-1011.
37. Fosmire GJ: "Zinc toxicity" **Am J Clin Nutr** 1990 51:225-227.
38. Fraker PJ, Gershwin ME, Good RA and Prasad A: "Interrelationships between zinc and immune function" **Federation Proc** 1986 45:1474-1479.

39. Goetzl EJ, Band MJ and Leppert D: "Matriz metalloproteinases in immunity" **J Immunol** 1996 **156**:1-4.
40. Hamilton TA, Jansen MM, Somers SD and Adam DO: "Effects of bacterial LPS on protein synthesis in murine peritoneal macrophages: relationship to activation for macrophages tumoricidal function" **J Cell Physiol** 1986 **128**:9-17.
41. Jameson S: "Zinc status in pregnancy: the effect of zinc therapy on perinatal mortality, prematurity and placental ablation" **Ann NY Acad Sci** 1993 **678**:178-192.
42. Jones EY, Stuart DI ND Walker PC: "Structure of Tumor Necrosis Factor" **Nature** 1989 **338**:225-228.
43. Johnston RB: "Monocytes and Macrophages" in: Lachmann PJ et al (Eds) **Clinical Aspects of Immunology 5<sup>th</sup> Ed. Blackwell Scientific Publication, Inc. Cambridge Massachusetts, vol.1 cap.25 1993 pp 467-479.**
44. Keen CL: "Zinc deficiency and immune function" **Annu Rev Nutr** 1990 **10**:415-430.
45. Keen CL, Taubeneck MW and Daston GP: "Primary and secondary zinc deficiency as factors underlying abnormal CNS development" **Ann NY Acad Sci** 1993 **678**:37-47.
46. King LE, Osati-Ashtiani F and Fraker PJ: "Depletion of cells of the B lineage in the bone marrow of zinc-deficient mice" **Immunology** 1995 **85**:69-73.
47. Kirskey A and Wachs TD: "Relation of maternal zinc nutriture to pregnancy outcome and infant development in an Egyptian village" **Am J Clin Nutr** 1994 **60**:782-792.
48. Krebs NF: "Zinc supplementation during lactation" **Am J Clin Nutr** 1998 **68**(Suppl) 509s-512s.
49. Lastra MD Pastelin R, Camacho A, Monroy B and Aguilar AE: "Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response" **J Trace Elem Med Biol** in press 2000
50. Lastra MD, Heras M, Saldivar L, Valiente L, Pastelín R, Aguilar AE: "Effects of zinc supplementation on the thymic index" in: PhColley, J Carbello, JL

- Domingo, JC Etienne (Eds) **Metal Ions and Biology and Medicine; John Libbey, Eurotext, Paris © vol.5 1998 pp418-422**
51. Lastra MD and Espinoza E: "Efectos del zinc como inmunomodulador" **Bioquimia 1993 18:17-21**
  52. Lastra MD, Aguilar AE, Pastelin R, Herrera M and Orihuela VD: "Incremento of immune response in mice perinatal stages after zinc supplementation" **Arch Med Research 1996 28:67-72**
  53. Lastra MD, Aguilar AE, Pastelin R, Monroy B, Arrona: "Zn effects on phagocytic responses during certain stages of ontogeny in mice" in: PhColley, J Carbello, JL Domingo, JC Etienne (Eds) **Metal Ions and Biology and Medicine; John Libbey, Eurotext, Paris © vol.4 1996 pp387-389**
  54. Lindsay Y, Duthie LM and Mcordi HJ: "Zinc levels in the rat fetal liver are not determined by transport across the placental microvillar membrane or the fetal liver plasma membrane" **Biol Reprod 1994 51:358-365.**
  55. Lockitch G: "Trace elements in the pediatrics" **JIFCC 1996 9:46-51.**
  56. Marodi L, Campbell DE, Polin RA and Johnston RB Jr: "Protein against systemic candidal infection in the newborn: normal function of macrophages mannan receptor but deficient activation of newborn macrophages by IFN- $\gamma$ " **Pediatr Res 1992 131:269-**
  57. Miller LC, Isa S, Lopreste G and Dinarello ChA: "Neonatal interleukin-1, interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor: cord blood levels and cellular production" **J Pediatr 1990 117:961-965.**
  58. Millet V: "Ontogeny of the immune system" **Ach Pediatr 1999 Suppl 1:145-195.**
  59. Nathan CF: "Secretory products of macrophages" **J Clin Invest 1987 79:319-326.**
  60. Odeh M: "The role of zinc in acquired immunodeficiency syndrome" **J Inter Medicine 1992 231:463-469.**
  61. Peters MJ, Bestram P and Garh: "Reduced secretion of interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor by neonatal monocytes" **Biol Neonate 1993 63:157-162.**

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

62. Romagnani S: "The TH1/TH2 paradigm" **Immunol Today** 1997 **18:263-266**.
63. Rosado JL, López P, Muñoz E, Martínez H and Hallen L: "Zinc supplementation reduced morbidity, but neither zinc nor iron supplementation affected growth or body composition of mexican preschoolers" **Am J Clin Nutr** 1997 **65:13-29**
64. Rothwell NJ and Grimble RF: "Metabolic and nutritional effects of TNF" in: **Tumor Necrosis Factors: The Molecules and their emerging role in medicine**, edited by Bruce Beutler, Raven Press Ltd. New York 1992
65. Scuderi Ph: "Differential effects of copper and zinc on human peripheral blood monocyte cytokine secretion" **Cell Immunology** 1990 **126:391-405**.
66. Serushago BA and Chandra RK: "Alteration in spleen cellularity and cytokine production in zinc-deficient mice challenge with lipopolisaccharide" **Nutrition Research** 1995 **15:369-380**.
67. Shankar AH and Prasad AS: "Zinc and immune function:the biological basis of altered resistance to infection" **Am J Clin Nutr** 1998 **68:447s-463s**.
68. Shenkin A: "Trace elements and inflammatory response: implications for nutritional support" **Nutrition** 1995 **11 (suppl 1)100-105**
69. Sherry B and Cerami A: "Cachetin/Tumor Necrosis Factor exerts endocrine, paracrine and autocrine control of inflammatory responses" **J Cell Biol** 1988 **107:1269-1277**.
70. Tartaglia LA and Goeddel DV: "Two TNF receptors" **Immunol Today** 1992 **13:151-153**.
71. Taubeneck MW, Daston GP, Rogers JM, Ansari A and Keen CL: "Tumor Necrosis Factor alters maternal and embrionic zinc metabolism and is developmentally toxic in mice" **J Nutr** 1995 **125:908-919**.
72. Vega Franco Leopoldo "Papel del zinc en la nutrición" **Revista Mexicana de Pediatría** 1995 **62(4): 157-164**
73. Walsh CT, Sandtead HH, Prasad AS, Newberne PM and Fraker PJ: "Zinc: Health effects and reseach priorities for the 1990's" **Environ Health Perspect** 1994 **102(suppl 2) 5-46**

74. Wasawic W, Walcain P and Bedraski M: "Plasma trace element (Se, Zn, Cu) concentrations in maternal and umbilical cord blood in Poland: relation with weight, gestational age and parity" **Biol Trace Elem Res 1993 38:205-213.**
75. Weatherstone KB and Rinch EA: "Tumor Necrosis Factors/Cachectin and Interleukin-1 secretion by cord blood monocytes from premature and term neonates" **Pediatr Res 1989 25:342-346**
76. Wellinghausen N and Rink L: "The significance of zinc for leukocyte biology" **J Leukoc Biol 1998 64:571-577**
77. Wellinghausen N, Kircher H and Rink L: "The immunobiology of zinc" **Immunol Today 1997 11:80-82.**
78. Wellinghausen N, Scromm AB and Seydel U: "Zinc enhances lipopolysaccharide-induced monocyte secretion by alteration of fluidity state of lipopolysaccharide" **J Immunol 1996 157:3139-3145.**
79. Wellinghausen N, Fischer A, Kircher H and Rink L: "Interaction of zinc ions with human peripheral blood mononuclear cells" **Cell Immunol 1996 171:255-261.**
80. Wirth JJ, Fraker PJ and Kirszenbaum F: "Zinc requirement of macrophages function: effect of zinc deficiency on uptake and killing of protoan parasite" **Immunology 1989 68:114-119.**
81. Wirth JJ, Fraker PJ and Kirszenbaum F: "Changes in the levels of marker by mononuclear phagocytes in zinc-deficient mice" **J Nutr 1984 1826-1833**