



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DEL ZINC EN LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE IL-1 ALFA Y DEL TNF ALFA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA-FARMACÉUTICA-BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ROCÍO HERNÁNDEZ ALANÍS



MÉXICO, D.F.

2002



FALLA DE ORIGEN  
TESIS CON

EXAMENES PROPEDÉUTICOS  
FACULTAD DE QUÍMICA  
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO :**

**Presidente:** MARÍA DOLORES LASTRA AZPILICUETA  
**Vocal :** HOMERO HERNÁNDEZ MONTES  
**Secretario:** SATURNINO DE LEÓN CHAPA  
**1er Suplente:** JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE.  
**2do Suplente:** PATRICIA ELVIRA BERRÓN RUIZ.

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA :**

*Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química. UNAM*

**Asesor del tema:**

María Dolores Lastra Azpilicueta

Ma. Dolores Lastra

**Supervisor Técnico:**

Ana Esther Aguilar Cárdenas

Ing. Esther Aguilar C

**Sustentante:**

Rocío Hernández Alanís

Rocío Hernández Alanís

***Dedicada a:***

***Mis padres Javier H y Concepción A, por su apoyo, cariño y confianza, ¡los quiero mucho!***

***Mis hermanos : Moisés A, Alma, Juan y Macrina por su apoyo y consejos.***

**Gracias:**

**A la Facultad de Química.**

**Maestra Ma. Dolores Lastra Azpilicueta por su asesoramiento y consejos para la realización de este proyecto.**

**Dra. Ana E. Aguilar Cárdenas por sus consejos, paciencia y brindarme su amistad.**

**Al maestro Rodolfo Pastelín Palacios por su apoyo.**

**A todos los que forman parte del Laboratorio de Investigación de Inmunología por su apoyo.**

**Y a mis amigos y amigas que son parte fundamental de mi vida.**

## ÍNDICE

	Páginas
<b>Resumen</b> .....	I
<b>I. Introducción</b>	
1. El zinc.....	01
1.1 El metabolismo.....	02
1.2 Efectos de la deficiencia de zinc en la fisiología.....	04
<b>2. El zinc en las etapas perinatales</b> .....	05
2.1 La gestación.....	05
2.2 La lactancia.....	06
2.3 La infancia.....	07
<b>3. El zinc y el sistema inmunológico</b> .....	08
3.1 Los efectos del zinc sobre las barreras y la inmunidad natural.....	09
3.2 Los efectos del zinc sobre la inmunidad específica o adquirida.....	09
3.3 Efecto de la suplementación con zinc.....	12
3.4 Las citocinas secretadas por el macrófago.....	14
3.4.1 La interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ).....	17
3.4.2 El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ).....	20
<b>4. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b> .....	23
<b>II. Justificación del estudio e hipótesis</b> .....	25
<b>III. Objetivos</b> .....	27
<b>IV. Metodología</b>	
1. Muestra biológica.....	28
2. Obtención de los macrófagos.....	28
3. Cinética de expresión del ARNm de cada citocina.....	28
4. Aislamiento de ARN.....	29
5. Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	30
6. Análisis de los productos de PCR por electroforesis.....	31
<b>V. Resultados</b>	
Figura 1. ARN total de macrófagos peritoneales de ratón durante una cinética de estimulación con lipopolisacárido.....	33

<b>Figura 2. Cinética de expresión del gen para IL-1 alfa en Macrófagos peritoneales.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 3. Efecto de la suplementación con zinc sobre la expresión del gen de IL-1 alfa en los macrófagos de ratones con 6 semanas de tratamiento (grupo I).....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 4. Efecto de la suplementación con zinc en la expresión del gen de IL-1 alfa en macrófagos peritoneales de animales con 9 semanas de tratamiento.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 5. Expresión del gen para beta-actina de macrófagos peritoneales de ratones.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 6. Cinética de expresión del gen para el TNF<math>\alpha</math> de macrófagos peritoneales de ratón.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 7. Efecto de la suplementación con zinc sobre la expresión genética del TNF alfa de los macrófagos de ratones con 6 y 9 semanas de tratamiento.....</b>	<b>47</b>
<b>VI. Discusión.....</b>	<b>48</b>
<b>VII Conclusiones.....</b>	<b>53</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>54</b>

## RESUMEN

El zinc es un elemento traza importante para la función de la respuesta inmune, la deficiencia de zinc se asocia a retardo en el crecimiento y lesiones dérmicas. En la respuesta inmune se observa depresión de la respuesta de anticuerpos y alteración de la función fagocítica, entre otros. Además el zinc es importante para los procesos de transcripción del ADN y en la expresión del ARNm de proteínas y enzimas que requieren de este metal para funcionar correctamente.

En este trabajo, se evaluaron los efectos de la suplementación oral con zinc, realizando ensayos en macrófagos de peritoneo estimulados con LPS, para evaluar la expresión del ARNm de la IL-1 $\alpha$  y del TNF $\alpha$ , por medio de la retrotranscripción- reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

El trabajo experimental se realizó con ratones BALB/c, los cuales se suplementaron con zinc en una concentración de 500 mg/L en el agua de beber. El grupo I recibió zinc durante los periodos de gestación y lactancia (3 semanas de edad) y el grupo II recibió zinc durante la gestación, lactancia y destete (6 semanas de edad) con sus respectivos grupos testigo, los cuales no recibieron el suplemento.

Los resultados obtenidos mostraron que la máxima expresión del gen de la IL-1 $\alpha$  fue a las 4 h después de la estimulación con LPS, por lo que se evaluó la expresión genética a las 4 h en los grupos de investigación observándose que en el grupo I (6 semanas de tratamiento) la expresión del gen es 3 veces mayor que el grupo testigo los cuales no recibieron zinc. Con respecto al grupo II (9 semanas de tratamiento) la expresión es 4 veces mayor con respecto al grupo testigo.

Con relación al TNF la máxima expresión del gen fue a las 3 horas después de la estimulación con LPS, por lo cual se llevó a cabo la evaluación a las 3 horas en los grupos I y II, resultando que en el grupo I, la expresión genética es 4 veces mayor



con respecto al grupo testigo y en el grupo II la expresión del gen es 3 veces mayor con respecto al grupo testigo.

Estos resultados sugieren que los suplementos orales de zinc aumentan la expresión de las monocinas, las cuales son importantes en la respuesta inmune natural como específica, aunque puede existir controversia por el aumento en la producción de la IL-1 y del TNF, en este trabajo se indica que el zinc puede favorecer el incremento de algunas respuestas inmunológicas en etapas perinatales y tener una acción benéfica si se administra con una vigilancia cuidadosa, en dosis y periodos específicos.

## **I. Introducción**

### **1. El zinc**

El zinc es un metal divalente que en soluciones a pH 7, interacciona y forma carbonatos, fosfatos e hidróxidos de baja solubilidad. En los fluidos biológicos el Zn se solubiliza al formar complejos con cuatro ligandos en arreglos tetraédricos, también es un cofactor de más de 300 enzimas. La intervención del zinc en diversos sistemas enzimáticos, se asocia al papel de las metaloenzimas. Aunque en el hombre se han descrito la participación de aproximadamente 20 de estas enzimas, las restantes se han encontrado en diversas especies animales. Las metaloenzimas son proteínas conjugadas capaces de ligar una variedad de metales, se encuentran presentes en todos los tejidos principalmente en hígado, riñón, páncreas e intestino, las enzimas aisladas de hígado humano contienen exclusivamente zinc, éstas se encuentran involucradas en el metabolismo energético, en la degradación y síntesis de los ácidos nucleicos, en la biosíntesis del grupo hemo, en el transporte del dióxido de carbono (anhidrasa carbónica) y en otras reacciones bioquímicas. Otras proteínas como las metalotioneínas cuando se saturan con sales de zinc o cadmio fijan 7 átomos del metal <sup>9,13,59,69</sup>

El zinc es importante para el crecimiento y reproducción. Es un componente estructural y funcional de biomembranas y estabilizador de la estructura del ARN, ADN y ribosomas y puede participar en la estructura de los factores de transcripción. El zinc se requiere para la proliferación celular y estabilización de complejos de hormona-receptor. <sup>45</sup>

La distribución del zinc en el organismo se resume en la Tabla I

Adulto 2.2 g	músculos huesos próstata hígado, tejidos tegumentarios, riñón y cerebro coroides y la retina plasma	60% 30% 1% 2% 400 µg/g de tejido fresco 12 -16 µg/L
Recien nacidos 140 mg	hígado	25%

**Tabla I. Distribución del zinc**<sup>9,69</sup>

### 1.1 Metabolismo

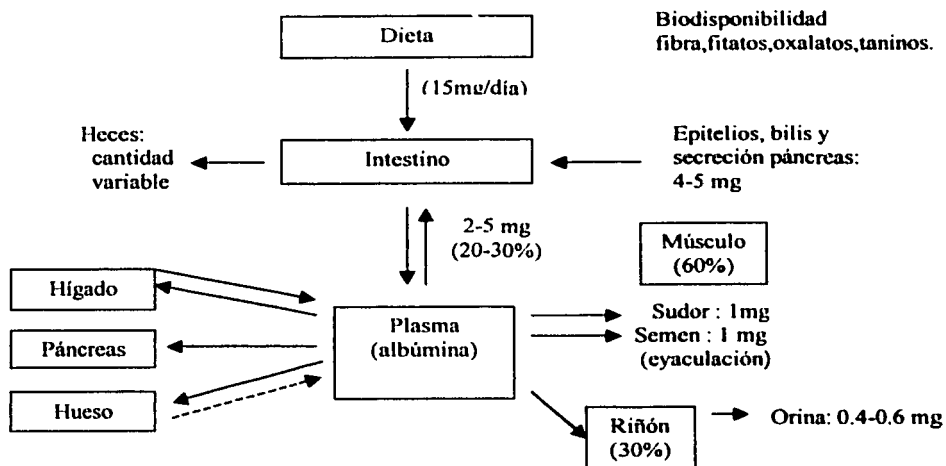
**Biodisponibilidad:** Se absorbe sólo el 20% de zinc presente en la dieta; los fitatos, oxalatos, taninos, fibra dietética de los alimentos vegetales interfieren con la absorción del microelemento, además de la penicilina y diyodoxiquinoleína

**Absorción:** se recomienda el consumo de 15 mg de zinc en la dieta diaria. La mayor parte de la absorción del mineral se realiza en la porción distal del intestino delgado en el yeyuno.<sup>45</sup> Una vez que el zinc pasa a los enterocitos una parte se retiene y se une a las metalotioneínas, estas proteínas juegan un papel importante en la regulación del metabolismo en la absorción del zinc en el intestino.<sup>69</sup>

**Transporte:** El zinc que sale de las células epiteliales intestinales, pasa a los capilares de la lámina propia de las vellosidades y se incorpora a la circulación porta. En el plasma, la albúmina constituye el mayor transportador de zinc intercambiable (60%); alrededor del 30% se une a una alfa-2-macroglobulina y

cerca del 10% se encuentra ligado a aminoácidos como la histidina y cisteína; menos del 1% se encuentra en estado iónico.

**Almacenamiento y excreción:** la mayor excreción del zinc endógeno es por la vía digestiva perdiéndose de 4 a 5 mg, sin embargo 20% se recuperan en la circulación enteropática, en la orina se elimina entre 0.4 y 0.6 mg; en los tegumentos y en el sudor se pierde cerca de 1 mg. La leche humana contiene entre 1 y 2 µg/mL. Estos datos se resumen en la figura 1.<sup>69</sup>



**Figura 1. Metabolismo del zinc**<sup>69</sup>

**Otras funciones fisiológicas:** El zinc es esencial en el crecimiento corporal, interviene en la síntesis de las proteínas, de los ácidos desoxinucleico (ADN) y ribonucleico (ARN) y participa en la conformación de los polisomas, además interacciona con la vitamina A, preservando las funciones de este nutriente porque el zinc forma parte de las deshidrogenasas involucradas en el metabolismo de los pigmentos de la retina, dependientes de vitamina A. También el zinc es necesario para que el hígado sintetice la proteína transportadora del retinol.

- 
- |                            |                             |
|----------------------------|-----------------------------|
| • Crecimiento celular      | • Replicación celular       |
| • Mecanismos inmunológicos | • Visión nocturna           |
| • Sentido del gusto        | • Apetito                   |
| • Maduración sexual        | • Fertilidad y reproducción |
- 

**Tabla II. Algunas funciones biológicas en las que interviene el zinc**

### **1.2 Efectos de la deficiencia de zinc en la fisiología**

Se han atribuido diversas manifestaciones clínicas a la deficiencia de zinc, algunas de estas son el retardo en el crecimiento, la pérdida del apetito, letargia, el hipogonadismo y las lesiones dérmicas; además de un deterioro en el sistema inmune en la disminución de la reacción de células T, en los niveles de la hormona timulina y quimiotaxis atenuada por neutrófilos y monocitos.<sup>20,58,59</sup> La desnutrición proteico-energética suele asociarse a la deficiencia de zinc y otros nutrientes.<sup>69</sup> En estudios en niños en la India se observó que la suplementación con zinc disminuyó los episodios de diarrea severa y con una baja concentración del microelemento en plasma ( $\leq 8.4 \mu\text{mol/L}$ ).<sup>6,10</sup> También se ha asociado un estado de deficiencia secundaria de Zn a enfermedades como síndrome de Down, SIDA, anemia de células falciformes y algunos cánceres. En 1992, se informa que la prevalencia de preescolares en México con una inadecuada ingestión del elemento, sin síntomas de deficiencia fue del 25 % en un poblado de la región rural, Valle de Solís. La frecuencia de ingestión inadecuada se debió a las dietas altas en fitatos por consumo de maíz y frijol.<sup>61</sup>

El zinc se ha considerado como un suplemento no tóxico particularmente cuando se ingiere por vía oral, sin embargo, se puede presentar síntomas de intoxicación como náusea, vómito, letargia, fatiga, dolor muscular y fiebre como consecuencia de contaminación en un medio localizado. Las dosis altas de zinc causan problemas gastrointestinales como úlceras gástricas y la disminución de cobre por

competencia en la absorción con el zinc.<sup>45</sup> Se han realizado estudios en humanos, sobre los efectos producidos por dosis altas del elemento, los cuales demostraron que la administración de 300 mg de Zn al día, cantidad 20 veces mayor a la ingestión diaria, produce alteraciones en la relación LDL/HDL (aumento de LDL y disminución de HDL) y deficiencia de cobre.

Los índices de laboratorio más utilizados para valorar el *status* del zinc son la determinación sérica del elemento, la excreción urinaria, la concentración de fosfatasa alcalina en suero, el contenido del zinc en leucocitos y pelo, la prueba del gusto y metalotioneinas en glóbulos rojos y monocitos. También se ha propuesto utilizar el índice de saturación de timulina como un indicador.<sup>3,6,14,45,57,66</sup>

## **2. Zinc en las etapas perinatales**

### **2.1 La gestación**

La deficiencia moderada de zinc durante la gestación tiene efectos adversos en animales de laboratorio como alteraciones en el tiempo gestacional y retardo del crecimiento intrauterino.<sup>57</sup> Algunos datos sugieren que la deficiencia de Zn durante el embarazo humano causa complicaciones similares aunque los hallazgos son inconsistentes.<sup>16,34</sup> En mujeres no gestantes, la cantidad de zinc absorbido que se requiere para reemplazar la pérdida de Zn endógeno, se estima en 2.5 mg/día.<sup>34</sup>

Durante la gestación la concentración de zinc en el líquido amniótico se incrementa, hace algunos años se ha propuesto que la disminución del elemento en este fluido se relaciona con alteraciones en el feto y durante el parto.<sup>46</sup>

En un estudio realizado por Bloxam se identifica a un subgrupo de mujeres que durante la gestación muestran el nivel de alfa fetoproteína en suero elevado con disminución en la concentración de zinc. Ellas tuvieron bebés con bajo peso al nacimiento como resultado de un periodo gestacional corto o menor crecimiento

intrauterino.<sup>12</sup> El Zn es un nutriente esencial para el crecimiento y el feto requiere 60% del elemento durante el tercer trimestre del embarazo (24 a 40 semanas de gestación) cuando el peso fetal se incrementa al máximo. Los infantes pretérmino tendrán una reserva de Zn menor y debido a que sus órganos son inmaduros pueden ser menos eficientes en absorber y retener Zn que los infantes a término.<sup>71</sup>

Además de los estudios en animales de laboratorio que informan acerca de malformaciones en las crías de progenitores deficientes, en humanos se ha informado que la deficiencia de zinc durante periodos críticos de la embriogénesis resulta en malformaciones de múltiples estructuras que incluyen el paladar, el cerebro y el sistema urogenital. Taubeneck *et al* demuestran *in vitro*, la capacidad del Zn de reducir los efectos teratogénicos del TNF $\alpha$  sobre embriones murinos.<sup>67,69</sup>

## 2.2 La lactancia

El interés por estudiar el papel del zinc en la nutrición de los lactantes se inició hace dos decenios.<sup>69</sup> El Zn es esencial para la producción de leche, Fung *et al* demuestran un incremento de la absorción materna del elemento durante la lactancia posiblemente en respuesta a la demanda de Zn para sintetizar la leche materna.<sup>34</sup> El contenido de Zn en la leche durante los 3 primeros meses de la lactancia es de 1.6 mg/L y disminuye con el tiempo postparto (0.5 mg/L a los 12 meses). En estudios con niños de 6 meses de edad quienes recibieron exclusivamente leche materna, no se registraron diferencias significativas en el zinc plasmático con respecto al observado en adultos. En otro estudio, en niños alimentados con una fórmula enriquecida con zinc a razón de 5.8 mg/L, la velocidad de crecimiento era mejor que el observado en niños con una fórmula que contenía 1.8 mg/L.<sup>69,70</sup>

Así fue que la Academia Americana de Pediatría, hizo en 1976 recomendaciones acerca de la cantidad de oligoelementos que deben contener las fórmulas lácteas. Considerando la biodisponibilidad de los minerales, la sugerencia fueron fórmulas

conteniendo entre 3.7 y 12 mg/L de Zn y para niños prematuros una concentración mayor de este mineral. <sup>69</sup>

### 2.3 La infancia

En la década pasada, varios estudios apoyaron la hipótesis de que la deficiencia moderada de zinc, es una de las razones por la cual los niños crecen a una velocidad menor. <sup>16</sup> La suplementación con zinc en niños, puede ser benéfica en situaciones particulares como una dieta baja en productos animales, basada en cereales y legumbres con alta cantidad de fitatos; falta grave de crecimiento y concentración plasmática de Zn baja o episodios de diarrea persistente. <sup>2,4</sup>

Los productos animales son el origen más importante de zinc en la dieta, en términos tanto de contenido como de biodisponibilidad. Debido a que las dietas, en los países en desarrollo, se basan principalmente en vegetales con fitatos, los cuales inhiben la absorción de Zn, es difícil para los niños de estos países, obtener la ingestión recomendada, únicamente de su dieta. En un estudio realizado en fórmulas lácteas infantiles por Michel *et al*, se demuestra que a pesar de que las cantidades de Ca y Zn puedan ser mayores que en la leche humana, el porcentaje de los elementos en forma soluble disminuye como resultado del proceso de elaboración. <sup>51</sup>

En México el tratamiento de niños entre 18 y 36 meses de edad, redujo la morbilidad de diarreas, pero sin mejorar el crecimiento. <sup>5,10,61,70</sup>

Un factor determinante de la sobrevivencia después del nacimiento, es la capacidad del infante para resistir enfermedades respiratorias y diarreicas. El primer estudio acerca del uso terapéutico del zinc, en diarrea aguda, fue conducido por Sachdev *et al* en la India, en niños con una edad promedio de 9 meses. Sus resultados muestran una reducción del 9% en la duración de la diarrea. Al realizarse estudios en otros países subdesarrollados como,



Blangladesh, Gambia, Indonesia, Pakistán Perú, Vietnam, México, Guatemala y Nueva Guinea, se muestra que la suplementación de zinc en niños disminuye los episodios de diarrea y enfermedades respiratorias.<sup>10,61</sup>

El zinc también es un nutriente crítico para el desarrollo del sistema nervioso central, puede contribuir a su estructura y función. La deficiencia de Zn se ha relacionado con retardo en el desarrollo cognoscitivo y motor, durante la infancia y la adolescencia.<sup>10</sup>

Estos datos sugieren que muchos infantes y niños preescolares en países en desarrollo como México, no satisfacen sus requerimientos de zinc con la comida y que la suplementación o fortificación es particularmente útil durante este período de vida.<sup>5,61</sup>

### 3. El zinc y el sistema inmunológico

Se han estudiado por varias décadas los mecanismos inmunológicos por los cuales el zinc modula el decremento a la susceptibilidad a infecciones y está claro que afecta múltiples aspectos del sistema inmune, desde las barreras de la piel hasta la regulación genética de los linfocitos.<sup>24,33,57,59</sup>

El elemento es crucial para el desarrollo normal y funcionamiento de la inmunidad celular no específica tales como neutrófilos y células NK. La deficiencia de zinc además afecta el desarrollo de la inmunidad adquirida por influir tanto en el crecimiento como ciertas funciones de los linfocitos T como en su activación, la producción de citocinas Th1 y la cooperación con linfocitos B.<sup>57</sup> El macrófago, una célula fundamental en muchas funciones inmunológicas, en deficiencia de Zn se ve afectado al disminuir sus capacidades de fagocitosis, destrucción intracelular y producción de citocinas.<sup>56,57,70</sup> Se considera que la concentración de Zn en suero en el rango de 12-16  $\mu\text{M}$  modula positivamente la funcionalidad del sistema inmune.<sup>27,31,59,73</sup>

Muchos de los efectos del zinc sobre estos mediadores inmunológicos claves radican en los innumerables actividades del Zn sobre las funciones celulares básicas tales como replicación de ADN, transcripción, división y activación celular.<sup>57</sup> El Zn funciona además como un antioxidante y puede estabilizar membranas y su deficiencia potencia o inhibe la apoptosis.<sup>32, 42, 66,70,76</sup>

### **3.1 Efectos del zinc sobre las barreras y la inmunidad natural**

La evaluación de los efectos del zinc sobre la inmunidad del hospedero debe comenzar con los efectos del elemento sobre la inmunidad innata o natural. La deficiencia de Zn daña a las células epidérmicas, resultando en las lesiones de la piel, características en la acrodermatitis enteropática. En deficiencia de Zn también se observa daño en la superficie de los aparatos gastrointestinal y pulmonar, y sobre otros mediadores inespecíficos de la inmunidad como la función de leucocitos polimorfonucleares, células NK y la actividad del complemento.<sup>59,66,70</sup>

### **3.2 Efectos del zinc sobre la inmunidad específica o adquirida**

El contenido de zinc en los linfocitos es de 50-60  $\mu\text{g}/10^{10}$  linfocitos de sangre periférica. La linfopenia es común en humanos y animales de experimentación deficientes en zinc. Fraker *et al* informan que los ratones adultos alimentados por dos semanas con dietas deficientes en Zn tienen números reducidos de linfocitos T y B en sangre periférica, en bazo y la cantidad de macrófagos se reduce más de un 50%.<sup>57,70</sup>

Las deficiencias de zinc también deprimen la función de los linfocitos, en general la respuesta proliferativa a mitógenos de linfocitos T y B murinos se encuentra disminuida en animales deficientes comparada con sus testigos. En algunos estudios, el rango de supresión de los linfocitos T se observa entre 5 a 50%. Sin embargo, algunos datos basados en ensayos que miden la producción de

anticuerpos *in vitro* (PFC) sugieren que el efecto primario de la deficiencia de zinc es la deleción de los linfocitos, sin pérdida de la funcionalidad en las células sobrevivientes.<sup>59,66</sup>

#### a) Linfocitos T

Las investigaciones acerca de la deficiencia de zinc en modelos experimentales como el bovino, porcino, murino, rata y también en niños deficientes han descrito una reducción significativa del tamaño del timo. La reducción en el tamaño del órgano y su celularidad se observa principalmente en la corteza tímica, estos cambios no se encuentran en los animales testigos alimentados con dieta restringida, confirmando que el zinc es el responsable del efecto. En los órganos linfoides periféricos, el número de linfocitos T disminuye progresivamente en el bazo, en los ganglios linfáticos y en la sangre periférica.<sup>25,57</sup>

#### b) Linfocitos B

La deficiencia de zinc bloquea el desarrollo de los linfocitos B en la médula ósea resultando en disminución en el número de linfocitos B en el bazo. En un experimento realizado por Fraker *et al*, cuando se alimentaron ratones con una dieta deficiente en zinc durante 30 días, se redujeron los linfocitos B y sus precursores un 75%. La pérdida fue predominantemente en linfocitos pre-B y linfocitos B inmaduros, los cuáles declinaron alrededor de un 59% y 25% respectivamente, mientras los linfocitos B maduros se afectaron menos.<sup>66</sup>

En relación a la respuesta de anticuerpos, en otros estudios de Fraker *et al* se muestra que la deficiencia moderada de zinc afectó la respuesta de anticuerpos a antígenos T dependientes pero no a antígenos T independientes. En una respuesta T dependiente cuando los animales retomaron a una dieta normal recuperaron el número de PFC IgM en una semana mientras la respuesta IgG tardó alrededor de un mes. La memoria inmunológica también se ve afectada por el *status* del zinc.<sup>65</sup>

Varios informes de estudios en humanos y animales muestran que la malnutrición proteico-energética disminuye la producción de citocinas y la deficiencia de un solo nutrimento también resulta en una respuesta inmunológica dañada.<sup>17</sup> La producción o las actividades biológicas de varias citocinas se ven afectadas por la deficiencia de zinc, existen informes sobre disminución de la producción de las citocinas IL-1, IL-2, IL-4 e IFN $\gamma$ . En algunos estudios se ha encontrado disminución de la expresión del receptor para IL-2 y en el número de linfocitos productores de la citocina.<sup>25,59,65</sup> Por su parte la IL-3 contiene un sitio de unión para zinc que es importante para su actividad y con el IFN $\gamma$  participa en la dimerización de la citocina lo cual también es necesario para su función.

### c) Monocitos y macrófagos

Se han observado efectos sobre la funcionalidad de los monocitos y los macrófagos durante la deficiencia de zinc. Hambidge informa que en humanos con acrodermatitis enteropática, la respuesta quimiotáctica de los monocitos se encuentra suprimida y se restaura después de adicionar Zn *in vitro*. Los monocitos de ratones deficientes en zinc tienen dañada la capacidad de fagocitar y destruir parásitos intracelulares, lo cual también se corrige adicionando Zn. Sin embargo, en algunos estudios se informa que la capacidad fagocítica de los macrófagos de animales deficientes se encuentra incrementada así como su actividad citotóxica.<sup>66</sup>

En relación a los efectos del zinc sobre la producción de radicales microbicidas de oxígeno y óxido nítrico por los macrófagos, no hay muchos datos.<sup>52</sup> Se conoce que el incremento de Zn y metales pesados puede disminuir la presencia de radicales libres contribuyendo a la destoxificación de grupos reactivos durante el proceso inflamatorio.<sup>49</sup> El elemento se involucra en la estimulación de la NADPH oxidasa a través de su papel como cofactor de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y de la fosfolipasa C, también estabiliza al ácido araquidónico contra oxidación por complejos de hierro.<sup>17,19</sup>

La deficiencia de zinc suprime la activación que aporta el macrófago a los linfocitos T inhibiendo la proliferación. Aunque los efectos alteran a ambas células, parece que la supresión funcional ocurre de forma temprana en el macrófago, pues James *et al* informan que la incubación de los macrófagos con sales de Zn dentro de los 30 minutos de incubación restaura la capacidad proliferativa de los linfocitos T. <sup>37,75</sup> Interesantemente, los monocitos contienen una concentración de Zn intracelular mayor que los linfocitos T. <sup>76</sup> Chavdil *et al* informan en 1977 que las concentraciones altas de zinc *in vitro* inhiben la activación de los macrófagos, la movilidad, la fagocitosis y el consumo de oxígeno. De igual manera se suprime la actividad fagocítica y fungicida de los monocitos de niños con marasmo y que se rehabilitaron con zinc. <sup>66</sup>

Se requieren más estudios para entender las condiciones bajo las cuales el zinc afecta a los monocitos y macrófagos en sus actividades como fagocitosis, producción de radicales libres, procesamiento y presentación de antígeno y producción de citocinas. <sup>1,50,66</sup>

En un estudio realizado por Serasushago y Chandra en ratones BALB/c, se evaluó el impacto de la deficiencia de zinc sobre la producción de las monocinas IL-1 $\alpha$  y TNF *in vivo*. Sus resultados muestran la disminución en las concentraciones de las citocinas y sólo existe diferencia significativa en la disminución de la producción del TNF. <sup>65</sup>

### **3.3 Efectos de la suplementación con zinc**

El zinc se ha considerado como un micronutriente no tóxico en un rango amplio alrededor de la dosis diaria recomendada, sin embargo cinco veces la ingestión diaria puede conducir a cambios bioquímicos evidentes como la presencia de deficiencia de cobre. La suplementación debe realizarse con precaución utilizando la cantidad mínima efectiva de zinc. <sup>17</sup>

Las investigaciones realizadas por Sazawal y Penny en Bangladesh, la India, Indonesia, Pakistán y Perú han examinado los efectos terapéuticos del zinc sobre diarreas agudas y persistentes y han demostrado que la suplementación con zinc reduce la duración de los episodios diarreicos. Black en EUA sugiere que la suplementación con zinc puede prevenir infecciones respiratorias agudas y neumonía. En estos estudios los efectos fueron significativos en los casos de desnutrición.<sup>70,76</sup>

También se ha discutido el uso de suplementos de zinc en mujeres embarazadas. Jameson y por su parte Swanson y King han informado que las concentraciones de zinc en las mujeres durante el embarazo pueden correlacionar directamente con el peso de los bebés al nacimiento e indirectamente con la posibilidad de partos prematuros.<sup>3,70</sup>

En un estudio realizado por Rosado y colaboradores se observa que la suplementación con zinc durante doce 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.<sup>61</sup>

En el Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química, estudios previos a este trabajo, indican que la suplementación con zinc durante las etapas perinatales aumentan algunas funciones inmunológicas.<sup>3,43</sup>

La administración oral de zinc a ratones BALB/c en los periodos de gestación y lactancia produjo un incremento significativo en el metabolismo de los macrófagos peritoneales y en la fagocitosis; respecto a los linfocitos B se observó un aumento considerable de la respuesta IgM. En los linfocitos T se encontró un efecto mitogénico del metal y se observa que la respuesta proliferativa máxima se

presenta con la concentración de 0.1 mM de zinc, y dosis mayores resultan tóxicas para las células.

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.<sup>41,42,43</sup>

### **3.3 Las citocinas secretadas por el macrófago**

Los macrófagos representan una familia de leucocitos mononucleares que se encuentran distribuidos ampliamente a través del cuerpo, dentro y fuera de los órganos linfohematopoyéticos. Varían considerablemente en su tiempo de vida y fenotipo dependiendo de su origen y microambiente local, por lo que se ha tratado de incluirlos dentro del llamado sistema fagocítico mononuclear y separándolos del sistema retículo endotelial que incluye además células de soporte, no necesariamente fagocíticas y de diferente origen.<sup>60,63</sup>

Los macrófagos se originan en la médula ósea a partir de una célula precursora común que se diferencia en el mieloblasto que dará origen a la línea granulocítica, y el monoblasto que originará al sistema fagocítico mononuclear. Por su parte los monoblastos proliferan y se diferencian a promonocitos en un lapso que va de 3 a 5 días y después a monocitos, estado en el cual pasan a la circulación y ahí se mantienen durante un periodo entre 1.5-4.5 días. A diferencia de los PMN circulantes, los monocitos son células que alcanzan la maduración hasta que se establecen en los tejidos en donde sobreviven durante semanas o meses como macrófagos.<sup>60</sup>

Los macrófagos procesan y presentan antígenos, producen quimiocinas y monocinas como la interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 y también producen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Pueden fagocitar patógenos extra e

intracelulares y células necróticas o apoptóticas eliminándolos en subcompartimentos apropiados de los órganos linfoides.<sup>35,63</sup>

Las funciones de los macrófagos dentro de los tejidos son homeostáticas, regulando el ambiente local y sistémico a través de diversos receptores de membrana y una variedad de productos secretados. Ellos reaccionan frente a señales o las generan influyendo sobre el crecimiento, la diferenciación y muerte de otras células. Cuando los macrófagos reconocen y fagocitan a los microorganismos, se estimulan para producir citocinas, que inducen inflamación local y efectos sistémicos. Los efectos sistémicos se denominan colectivamente respuesta de fase aguda, porque ocurre rápidamente tras ciertas infecciones. Las principales monocinas producidas son TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12. Además de los macrófagos los mastocitos también inducen inflamación, todos estos efectos innatos persiguen aumentar el número de células y moléculas en la zona infectada.

La respuesta de fase aguda se provoca por la acción de las monocinas sobre distintas células, tejidos y órganos. Entre estas acciones destacan el aumento del catabolismo de lípidos y proteínas del tejido adiposo, hepático y muscular induciendo un aumento de la temperatura corporal vía hipotálamo, movilización de neutrófilos de la médula ósea, de los endotelios y aumento de la síntesis y secreción de las proteínas de fase aguda por los hepatocitos.<sup>52</sup>

En las etapas perinatales la producción de monocinas puede encontrarse disminuida; Peters *et al* proporcionan datos de concentración baja en la secreción de citocinas por monocitos neonatales. En su estudio, los monocitos de sangre periférica de recién nacidos estimulados con lipopolisacárido mostraron disminución significativa en la producción de IL-1 y TNF $\alpha$  comparada con monocitos de adultos.<sup>30,55</sup>



Weatherstone *et al* informan que los monocitos estimulados con lipopolisacárido de bebés pretérmino producen también una menor cantidad de TNF $\alpha$ . Dada las actividades biológicas múltiples de estas citocinas, la disminución en su secreción puede ser un factor importante en el incremento de la susceptibilidad a infecciones de los recién nacidos.<sup>72</sup> También se ha demostrado la secreción de la IL-1 $\alpha$  y el TNF $\alpha$  por las células estromales tímicas y se ha indicado su participación durante el desarrollo fetal en la diferenciación de los linfocitos.<sup>77</sup> A este respecto, existe la posibilidad de estimular la producción de ambas citocinas con el metal; Scuderi , Driessen y Wellinghausen señalan que en humanos, la presencia de zinc *in vitro* estimula la producción de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\alpha$  y TNF $\alpha$  por monocitos.<sup>3,64,74</sup>

Lastra *et al* informan que la administración oral de zinc a ratones BALB/c en los periodos de gestación y lactancia produjo un incremento significativo en el metabolismo de los macrófagos peritoneales y en la fagocitosis, también se observó aumento en la producción de TNF alfa por macrófagos peritoneales en las mismas etapas.<sup>41</sup>

Prasad *et al* en un modelo experimental humano de deficiencia de zinc observan que la producción de TNF $\alpha$  por células mononucleares de sangre periférica se encuentra disminuida. Sin embargo, Abul *et al* sugieren que el Zn puede regular negativamente la producción de IL-1 $\alpha$  de macrófagos alveolares activados *in vitro* con LPS, de pacientes con tuberculosis pulmonar o con neumonía bacteriana.<sup>1,57</sup>

Wellinghausen *et al* por su parte también muestran que el zinc incrementa la inducción de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en cultivos de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con lipopolisacárido (LPS), ellos sugieren que el efecto sinérgico del Zn se debe a su interacción directa con el LPS alterando la fluidez de la molécula y por la influencia a nivel transduccional sobre segundos mensajeros.<sup>73,74</sup> Este grupo de investigadores también informan que la

concentración 100  $\mu\text{M}$  de zinc induce la expresión de ARNm para  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  y proponen que es posible lograr esta concentración *in vivo* sin inducir efectos colaterales adversos.<sup>74,75</sup>

Los datos citados anteriormente muestran la diversidad de resultados de los efectos del zinc sobre el macrófago algunos de ellos controversiales y la escasa información que hay de protocolos en las etapas perinatales.

### 3.3.1 Interleucina 1 (IL-1)

En 1972, Gery y Waksman detectaron la función biológica de la interleucina 1, la describieron como un factor activador de linfocitos (LAF), el cual aumentaba la actividad proliferativa *in vitro* en respuesta al estímulo de lectinas en timocitos murinos estimulando linfocitos de sangre periférica.<sup>47</sup>

El origen principal de la interleucina 1 (IL-1) es el monocito, los macrófagos activados de diferentes orígenes (macrófagos alveolares, células de Kupffer, células adherentes de bazo y macrófagos peritoneales) y los neutrófilos periféricos también producen la citocina.<sup>28,46,53</sup> Hay dos formas funcionales de interleucina 1, la  $\text{IL-1}\alpha$  (17 kDa, 159 residuos de aa,  $\text{pI}=5.0$ ) y la  $\text{IL-1}\beta$  (17 kDa, 153 residuos de aa,  $\text{pI}=7.0$ ) que son codificados por dos genes diferentes. La  $\text{IL-1}\beta$  es la forma predominante en humanos mientras la  $\text{IL-1}\alpha$  lo es en el ratón.<sup>47,53</sup>

A nivel de proteína la  $\text{IL-1}\alpha$  y la  $\text{IL-1}\beta$  muestran aproximadamente 27% de homología restringida principalmente a la región carboxilo terminal, los nombres por tanto sugieren una relación que realmente no existe. Sin embargo, las formas tridimensionales de las dos interleucinas son casi idénticas, ambas formas son esféricas carentes de regiones alfa-hélice y se unen al mismo receptor.<sup>53</sup>

Las IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se sintetizan como precursores de 35 kDa (el precursor de IL-1 $\alpha$  de 271 residuos de aa y el de IL-1 $\beta$  de 269 residuos de aa).<sup>47</sup> El precursor de IL-1 $\alpha$  es activo pero el de la IL-1 $\beta$  no, éste requiere ser procesado para poder unirse a su receptor. Los precursores de la interleucina 1 no contienen la secuencia hidrofóbica señal que permite el transporte de la proteína por las vías secretorias clásicas involucrando al sistema retículo endoplásmico/Golgi.<sup>53</sup> En el precursor de IL-1 $\alpha$ , se ha identificado una secuencia señal nuclear sugiriendo que esta citocina también puede actuar en el núcleo celular.<sup>21</sup>

Las proteínas maduras se producen por ruptura proteolítica de los precursores por varias proteasas, la IL-1 $\beta$  pueden generarse por la acción de la elastasa, de la catepsina G y de la colagenasa. En el propéptido IL-1 $\alpha$  la ruptura ocurre entre la arginina 112 y la serina 113, mientras en el precursor IL-1 $\beta$  es entre la asparagina 116 y la alanina 117.<sup>47</sup> Además de las formas secretorias de la interleucina 1, existe otra forma activa de 22 kDa. asociada a la membrana celular. Esta consiste principalmente de IL-1 $\alpha$  y se involucra con el control de crecimiento de células adyacentes. También existen formas de IL-1 de bajo peso molecular en suero y en orina.<sup>46</sup>

Las dos IL-1 se unen indistintamente al mismo receptor y por tanto muestran similitud en sus actividades biológicas. Se han descrito dos clases de receptores (IL-1R) con diferentes afinidades de unión ( $10^{-9}$  y  $10^{-11}$ M). Las actividades biológicas de la interleucina 1 se han observado también en un intervalo de concentraciones de  $10^{-13}$ - $10^{-15}$ M lo cual sugiere la existencia de conformaciones de alta afinidad del receptor o la existencia de otros receptores.<sup>15</sup>

El receptor tipo I (CD121a; 80kDa) se expresa predominantemente sobre linfocitos T y células de origen mesenquimatoso y une ambos tipos de IL-1 con igual afinidad. El gene que codifica este receptor se localiza en el cromosoma 2q12 humano. El receptor contiene tres dominios extracelulares y pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. La proteína completa tiene una longitud de

576 residuos de aa y contiene siete sitios de N-glicosilación. El receptor tipo II (CD121b; 60kDa) consiste de una proteína de 398 residuos de aa, se expresa sobre los linfocitos B, granulocitos y macrófagos. Ambos receptores además unen a IL-1ra.<sup>26,47,54</sup>

La unión de la IL-1 a su receptor puede activar al factor de transcripción NK-kappa-B e induce la expresión de los oncogenes *fos* y *myc*. Las señales de transducción mediadas por el IL-1R involucran a la adenilato ciclasa la cual incrementa transitoriamente los niveles de AMPc y a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y una proteína de unión a GTP de 46 kDa. También se ha involucrado en las vías de señalización de la IL-1 un factor similar a las proteínas STAT.

Algunas de las principales actividades biológicas de la IL-1 son el estímulo de linfocitos Th los cuales en respuesta, secretan IL-2 y expresan IL-2R; puede actuar directamente sobre los linfocitos B promoviendo su proliferación y la síntesis de inmunoglobulinas.<sup>53</sup> La proliferación de los linfocitos mediada por IL-1 se inhibe por TGFβ<sub>1</sub> y TGFβ<sub>2</sub>. La citocina además influye sobre la respuesta de las células B a la IL-5, estimula la proliferación y activación de células NK, fibroblastos y timocitos. La IL-1 promueve la adhesión de neutrófilos, monocitos y linfocitos T y B al incrementar la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y ELAM. También influye en las actividades funcionales y de diferenciación de las células de Langherhans de la piel.<sup>47</sup> La interleucina 1 es un quimioatrayente potente para leucocitos; la inyección de la citocina *in vivo* conduce a la acumulación local de neutrófilos en el sitio de aplicación y activa su metabolismo oxidativo.<sup>53</sup>

La IL-1 tiene un efecto sinérgico con muchos factores, potencia los efectos de los factores estimuladores de colonias (CSF) y promueve la generación de células progenitoras mieloides.<sup>47</sup> También funciona como pirógeno endógeno induciendo

la elevación de la temperatura por la liberación de prostaglandinas en el centro termorregulador del hipotálamo.<sup>53</sup>

En combinación con otras citocinas es un mediador importante de las reacciones inflamatorias, incrementa el metabolismo del ácido araquidónico en las células inflamatorias como fibroblastos, células sinoviales, condrocitos, células endoteliales, hepatocitos y osteoclastos y se puede observar el incremento de la secreción de proteínas inflamatorias como la colagenasa, la elastasa y el activador de plasminógeno.<sup>23,46</sup>

Esta monocina tiene varias aplicaciones clínicas debido a sus diversas actividades, se puede utilizar después de inmunosupresión o de terapia con drogas citostáticas por su actividad como estimulador de linfocitos T. La IL-1 $\alpha$  ha demostrado su utilidad en el tratamiento de trombocitopenia inducida por quimioterapia. Puede ser útil como estimulador de la hematopoyesis tanto sola como en combinación con otras sustancias. La IL-1 ha mostrado promover la curación de heridas, esta actividad involucra efectos sobre la angiogénesis, la proliferación de fibroblastos y la actividad quimiotáctica sobre neutrófilos. Sin embargo, su utilización directa se ve limitada por ser muy tóxica, capaz de inducir choque séptico o conducir a daño vascular.<sup>22</sup>

### **3.3.2 Factor de necrosis tumoral alfa**

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y la linfoxina (LT o TNF $\beta$ ) pertenecen a un conjunto de proteínas conocido como familia del TNF, existe alrededor de un 30% de homología entre el TNF $\alpha$  y la LT y son codificados por genes adyacentes.<sup>7</sup>

El TNF $\alpha$  es una citocina que se produce después de estimulación por macrófagos, monocitos, linfocitos T (CD4<sup>+</sup>) y células NK. Los neutrófilos estimulados o no también la secretan, así como se produce por los astrocitos, las células de

microglia, las células de músculo liso y los fibroblastos.<sup>53,68</sup> La síntesis de  $\text{TNF}\alpha$  se induce con diferentes estímulos incluyendo la acción del lipopolisacárido, IFN, IL-2, GM-CSF, bradicinina, complejos inmunes, inhibidores de ciclooxigenasa y el PAF. La producción de TNF se inhibe con IL-6,  $\text{TGF}\beta$ , vitamina D3, prostaglandina  $\text{E}_2$ , dexametasona, ciclosporina A y antagonistas del PAF.<sup>11,46</sup>

El factor de necrosis tumoral alfa es una proteína no glicosilada de 17 KDa con 157 residuos de aminoácido (el  $\text{TNF}\alpha$  murino se encuentra N-glicosilado), forma dímeros y trímeros y la homología con el  $\text{TNF}\beta$  es aproximadamente del 30%.<sup>38</sup> La molécula de 17 KDa se produce por el procesamiento de una proteína precursora de 233 residuos de aminoácido y ha sido descrita una molécula transmembranal de 26 KDa. Esta forma se encuentra predominantemente sobre monocitos y linfocitos T activados, es activa y mediadora del daño celular por contacto directo célula-célula.<sup>4,68</sup>

Los receptores de alta afinidad para el  $\text{TNF}\alpha$  ( $K_a=2.5 \times 10^{-9}\text{M}$ ), se expresan sobre todo tipo de células somáticas, excepto los eritrocitos. Se han descrito 2 tipos de receptores de alta afinidad; uno de 55 KDa (p55, TNF-RI, CD120a) y el otro de 75 KDa (p75, TNF- RII, CD120b), ambos receptores unen tanto  $\text{TNF}\alpha$  como  $\text{TNF}\beta$ . La proteína p55 se expresa sobre las células susceptibles a la acción citotóxica del TNF y p75, está presente especialmente en células de origen mielóide y linfóide. Un tercer receptor se encuentra en hígado humano (p60), éste une al  $\text{TNF}\alpha$  pero no al  $\text{TNF}\beta$ , se han hallado formas solubles de los tres receptores. La expresión de los receptores para el TNF se induce por  $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{IFN}\beta$  e  $\text{IFN}\gamma$  y se reduce por IL-1 y los ésteres de forbol.<sup>7,54</sup>

La secreción del  $\text{TNF}\alpha$  y de la IL-1 $\beta$  estimulada por lipopolisacárido en monocitos humanos, es dependiente de la actividad de dos enzimas de transducción: la proteína cinasa C (PKC) y la proteína tirosín-cinasa (PTK). El siguiente paso en la cascada de transducción de señales inducidas por el lipopolisacárido es la

activación de NFκB, un factor de transcripción que se encuentra en el citoplasma formando un complejo inactivo unido a la proteína inhibidora IκB. Una de las cinasas que fosforila directamente a IκB es la PKC. Cuando IκB se fosforila, NFκB se disocia y se transloca al núcleo en una forma activa que se une al ADN permitiendo la transcripción génica y la síntesis de TNFα y de la IL-1β.<sup>36,40</sup>

El TNFα muestra un amplio espectro de actividades biológicas, causa *in vitro* citólisis y citostasis de varias líneas celulares tumorales, las células sensibles mueren algunas horas después de la exposición en concentración picomolar a la citocina; *in vivo* causa necrosis hemorrágica de los tumores transplantados. El factor además, realiza la actividad antitumoral a través de inducción de apoptosis, incrementa la fagocitosis y la citotoxicidad de los neutrófilos y modula la expresión de otras proteínas incluyendo *fos*, *myc*, IL-1 e IL-6.<sup>4,8,53</sup>

El TNF es promotor de angiogénesis, esta actividad se inhibe con la acción del IFNγ, también es un factor de crecimiento para fibroblastos humanos donde promueve la síntesis de colagenasa y prostaglandina E<sub>2</sub>. En osteoclastos induce su activación y la reabsorción ósea y en adipocitos inhibe la síntesis de la enzima lipoproteína lipasa. En las células endoteliales y sinoviales estimula la biosíntesis de colagenasas y en las células de microglia estimula su proliferación.<sup>68</sup>

El TNFα es un potente quimioatrayente de neutrófilos e incrementa su adherencia al endotelio además incrementa las propiedades quimiotácticas del formil-metionina-leucina-fenilalanina sobre los neutrófilos. En los macrófagos no activados estimula la fagocitosis y la síntesis de superóxido dismutasa.<sup>68</sup>

En leucocitos y progenitores linfocitarios estimula la expresión de moléculas HLA clase I y clase II y antígenos de diferenciación, así como la producción de IL-1, CSF, IFNγ y estimula el metabolismo del ácido araquidónico. El TNFα en conjunto con la IL-2 promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos B y puede

incrementar la proliferación de los linfocitos T en respuesta a varios estímulos y en ausencia de IL-2.<sup>53</sup>

La sobreexpresión del TNF $\alpha$  tiene varias consecuencias patológicas, es el principal mediador de caquexia en pacientes con cáncer y es responsable de varios de los efectos severos durante choque séptico por microorganismos Gram negativos,<sup>53</sup> también participa en desórdenes autoinmunes como la artritis reumatoide y en la enfermedad de Crohn.<sup>8,29</sup>

#### **4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

En 1985 se desarrolló la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifica segmentos cortos (aprox. 100 –500 pb) de una molécula larga de ADN. Es capaz de producir selectivamente secuencias específicas de ADN por un factor de 10<sup>6</sup>.

La reacción incluye: la muestra de ADN, una polimerasa de ADN termoestable, dos oligonucleótidos (primers), desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), amortiguador de reacción y magnesio. Los componentes se mezclan y la reacción se coloca en un ciclador térmico, que lleva la reacción a través de diferentes temperaturas y tiempos.<sup>39,62</sup>

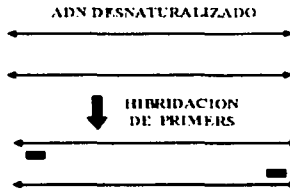
Cada ciclo de amplificación consiste en 3 etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión. En la primera etapa el ADN diana o blanco se desnaturaliza a cadenas sencillas por incubación aproximadamente a 95°C. En el proceso de desnaturalización, las dos hebras de ADN producen el molde de ADN para el anclaje de la polimerasa termoestable. Figura 2.





**Figura 2. PCR (desnaturalización)**

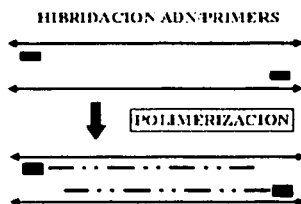
La siguiente etapa del ciclo reduce la temperatura a 40-60°C, a estas temperaturas los oligonucleótidos pueden formar asociaciones estables (alineación) con las hebras de ADN separadas y proporciona un sitio de anclaje para la síntesis de ADN por la ADN polimerasa, esta etapa es de aproximadamente 30-60 minutos.



**Figura 3. PCR (alineamiento)**

Finalmente, la síntesis del nuevo ADN comienza cuando la temperatura de reacción aumenta al óptimo de la ADN polimerasa. Figura 4. Para la mayoría de las polimerasas termoestables esta temperatura es aproximadamente de 74°C. La extensión tarda aproximadamente de 1 a 2 minutos. Esta etapa completa un ciclo

y el siguiente comienza con el retorno a 95°C para la desnaturalización. Cada ciclo de PCR duplica la cantidad de secuencia de ADN (amplificación) por ejemplo: en 10 ciclos se multiplica la amplificación en un factor cerca de 1000, 20 ciclos en un factor mayor de  $10^6$ . Después de 20-40 ciclos el ácido nucleico amplificado puede ser analizado respecto a su tamaño, cantidad, secuenciación, clonación, etc. <sup>39,42</sup>



**Figura 4. PCR (polimerización)**

Para analizar el nivel de expresión genética en el caso de ARN mensajero se emplea la actividad de la retrotranscriptasa que convierte el ARN en ADNc para su posterior amplificación mediante PCR.

## **II. Justificación e hipótesis del estudio**

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 a 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 del zinc tiene un efecto positivo sobre la respuesta inmune. <sup>41,42,43,44</sup>

Para determinar el efecto del zinc sobre el macrófago, en este trabajo se administró una concentración de 500 mg/L de zinc en el agua de beber a ratones BALB/c y se midió la expresión genética de IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$  de macrófagos peritoneales a las seis y nueve semanas de tratamiento, citocinas que tienen un papel importante en la respuesta inmune en el humano y en animales.

### *Hipótesis*

El macrófago es un componente celular modulador de la respuesta inmune y el zinc un elemento químico que afecta al sistema inmunológico, así pues consideramos que la administración de Zn durante las etapas perinatales puede coactivar a los macrófagos en la expresión de citocinas como IL-1 $\alpha$  y TNF $\alpha$ , con la posibilidad de reforzar la respuesta inmune celular.

### **III. Objetivos**

#### **1. Objetivo general**

- Evaluar el efecto que tiene el zinc sobre la expresión de los genes de IL-1 $\alpha$  y del TNF $\alpha$  en macrófagos peritoneales de ratón tratados con zinc en etapas perinatales

#### **2. Objetivos particulares**

- Estandarizar la técnica de aislamiento de ARN total de macrófagos peritoneales de ratón en etapas perinatales
- Determinar el tiempo óptimo de expresión de los genes de la IL-1 $\alpha$  y del TNF $\alpha$  en cultivos de macrófagos de ratones tratados *in vivo* con zinc y sin zinc
- Evaluar la concentración del amplificado (ADNc) de las monocinas para determinar el efecto del zinc en la expresión de estos genes

#### IV. Metodología

##### 1. Muestras biológicas

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, los animales se dividieron en dos grupos con sus testigos respectivos (Tabla 1). El suplemento de zinc se les administró en el agua de beber desde el día de apareamiento; después de dos semanas se separaron los machos de las hembras preñadas. Éstas recibieron el suplemento hasta que su progenie cumplió 3 o 6 semanas de edad.

GRUPO	PERIODO DE TRATAMIENTO CON ZINC EN mg/L		
	GESTACIÓN Progenitora → F1	LACTANCIA progenitora → F1	DESTETE F1
	3 semanas	6 semanas	9 semanas
I	500	500	
Testigo	0	0	
II	500	500	500
Testigo	0	0	0

Tabla I

##### 2. Obtención de los macrófagos

Los animales se sacrificaron a las 6 y 9 semanas de tratamiento por dislocación cervical, los macrófagos se obtuvieron de la cavidad peritoneal, las células se lavaron mediante centrifugación a 250 g y se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL con medio RPMI 1640 (GIBCO cat 430-1800 Laboratories New York USA) suplementado. Se realizaron los cultivos estimulándolos con 1  $\mu$ g de lipopolisacárido (*E. coli* serotipo 055:B5, S. Chem. Co. cat. L-2880, St. Louis Mo USA)

##### 3. Cinética de expresión del ARNm de cada citocina

Para conocer el tiempo óptimo de la expresión genética de cada citocina, se realizaron las cinéticas de expresión para la IL-1 $\alpha$  y el TNF $\alpha$  con animales de 9 semanas de tratamiento con zinc. Los macrófagos se depositaron en un frasco de cultivo (Costar, Cambridge, MA USA) y se estimularon con 1  $\mu$ g de lipopolisacárido por

cada  $10^6$  células. Los frascos se mantuvieron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, se tomaron muestras de 1 mL a las 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 y 24 horas después de estimular. Previo a la estimulación, también se separó 1 mL de células para conocer la expresión basal.

#### **4. Aislamiento de ARN**

El ARN total se extrajo de la suspensión de macrófagos peritoneales mediante el método de Chomczynski & Sacchi<sup>18</sup> que utiliza una solución de tiocianato de guanidina Ifenol. (*TriPure isolation reagent, Boehringer Mannheim Corp. Indianapolis USA*).

1. Se centrifugó un volumen de 1 mL de la suspensión de macrófagos a 1400 x g a 4°C, 10 minutos y se lavó con amortiguador de fosfatos pH 7.2 (PBS). Se resuspendieron  $1 \times 10^6$  células en 1 mL de solución de TriPure agitando vigorosamente en Vortex por 10 segundos.
2. Se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo (*JT Baker SA de CV, México*) y se mezclaron rápidamente por inversión y posteriormente por agitación en Vortex durante 10 segundos.
3. Se mantuvo la mezcla en hielo durante 10 minutos. Para separar las fases se centrifugó a 12 000 x g, 4°C durante 15 minutos, el ADN y las proteínas permanecieron en la interfase insoluble; la fase superior acuosa con el ARN (alrededor de 600  $\mu$ L) se transfirió a otro tubo.
4. Se precipitó el ARN con 500  $\mu$ L de isopropanol (*JT Baker SA de CV, México*), agitando durante 10 segundos en Vortex y se centrifugó a 12 000 x g a 4°C durante 10 minutos.
5. Se desechó el sobrenadante y se agregó al pellet 1 mL de etanol al 75% (*JT Baker SA de CV, México*) y se agitó en Vortex por 10 segundos y se centrifugó a 7500 x g a 4°C por 10 minutos.
6. El ARN se solubilizó en 100  $\mu$ L de agua y se confirmó su pureza y concentración, 1 UA a 260 nm equivale a 40  $\mu$ g/mL y la relación 260/280=2 indica una preparación libre de proteínas (*espectrofotómetro Beckman DU 650*).

## 5. Retrotranscripción – Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La retrotranscripción del ARN a ADNc y la amplificación del ADNc a través de la PCR se realizó utilizando la enzima rTth ADN polimerasa y un equipo de reactivos comercial (*GeneAmp PCR Reagent kit Elmer, NJ USA*) con las condiciones de reacción de la Tabla II.

Reactivo		Volumen por reacción
ARN	1 µg	
Iniciador 5' IL-1α / TNFα / βactina,	25µM	1µL
Iniciador 3' IL-1α / TNFα / βactina,	25µM	1µL
Amortiguador EZ	5X	10µL
DNTPs,	10 mM c/u	1.5µL c/u
rTth ADN pol,	2.5 U/µL	2µL
Solución de Mn(OAc) <sub>2</sub> ,	25mM	5µL
Agua		c. b.p 50 µL

**Tabla II**

El amortiguador EZ 5X consistió en bicina 250 mM, acetato de potasio 575 mM, glicerol 40% (w/v), pH 8.2.

Los oligonucleótidos iniciadores o primers fueron de origen comercial y sus secuencias son las siguientes:

Iniciador 5' IL-1α, secuencia : 5'-AAGTTTGTTCATGAATGATTCCCTC-3'

Iniciador 3' IL-1α, secuencia : 5'- GTCTCACTACCTGTGATGAGT-3'

(*Stratagene, La Jolla CA, USA*)

iniciador5'TNFα,secuencia:5'-TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC-3'

iniciador3'TNFαsecuencia:5'-GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG-3'

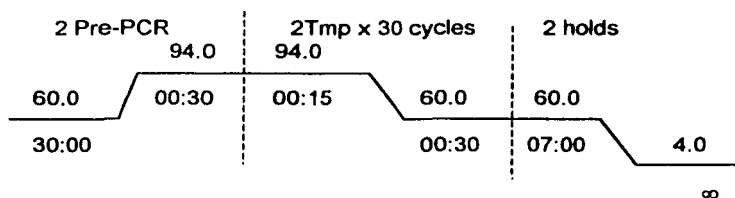
(*Clontech Laboratories Inc, Palo Alto CA USA*)

iniciador 5' β actina, secuencia:5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3'

iniciador 3'α,secuencia: 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3'

(*Biosintesis Inc, Texas USA*)

Se utilizó el siguiente ciclo de reacción:



1. transcripción 30 minutos a 60°C
2. etapa inicial 30 segundos a 94°C
3. desnaturalización 15 segundos a 94°C
4. alineamiento y extensión 30 segundos a 60°C
5. etapa final 7 minutos a 60°C

las etapas 3 a 4 se repiten; 30 ciclos para  $\beta$ -actina e IL-1 $\alpha$ , para el TNF $\alpha$  se repiten 35 ciclos. Los productos de PCR se almacenan a -70 °C para su análisis posterior

#### 6. Análisis de los productos de PCR por electroforesis.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa (*A-6013, S.Chem.Co. St. Louis Mo USA*) al 1.5%, se aplicó una fuerza electromotriz de 100 V y el corrimiento se realizó junto con marcadores de peso molecular (*54-1002-100 BIO-Ladder, USA*). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (*Sigma Chem, St. Louis Mo USA*) a una concentración de 0.5 mg/mL por 10 minutos y después se expusieron a luz UV, finalmente se fotografiaron (*Cámara Polaroid DS 3-J*).

El cálculo de la concentración relativa se obtuvo por análisis densitométrico de los productos de amplificación (*equipo documentador de geles Fotodyne Inc. Scimericas SA, programa Preg. Collage versión 2.0*)



## **V. Resultados**

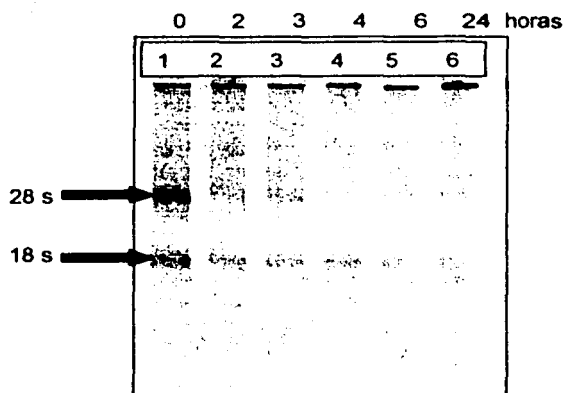
### **DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE LA IL-1 $\alpha$ .**

Se analizó la expresión del ARN mensajero (ARNm) para la citocina, con la finalidad de conocer el patrón de expresión del gen de IL-1 $\alpha$  en macrófagos de peritoneo de animales tratados con zinc 500 mg/L durante la gestación, la lactancia y el destete. Esto se realizó por RT-PCR, se realizaron los geles de electroforesis del ADNc y se analizaron por densitometría. Se muestran los experimentos más representativos.

#### **1. ARN total de macrófagos peritoneales de ratón durante una cinética de estimulación con lipopolisacárido.**

Los macrófagos de animales que recibieron zinc durante 6 y 9 semanas de tratamiento (grupos I y II) y sus respectivos testigos, se cultivaron en presencia de lipopolisacárido (1 $\mu$ g/mL), se tomaron muestras a las 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 y 24 horas para obtener el ARN total. La relación de absorbancia 260/280 nm de estas muestras de ARN siempre fue cercana a 2.0

En la figura 1 se presenta el ARN obtenido a las 0, 2, 3, 4, 6 y 24 horas y se observan las bandas que corresponden al ARN ribosomal de 28 s y 18 s de animales de 9 semanas.

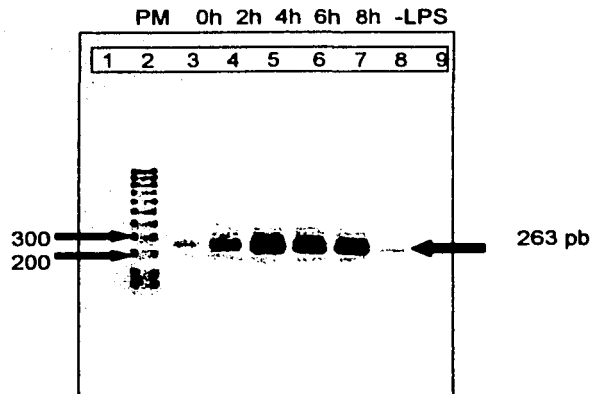


**FIGURA 1. ARN total de macrófagos peritoneales de ratón durante una cinética de estimulación con lipopolisacárido.** Las muestras que se presentan fueron tomadas a las 0 (carril 1), 2 (carril 2), 3 (carril 3), 4 (carril 4), 6 (carril 5) y 24 (carril 6) horas postestimulación con lipopolisacárido (*E. coli* serotipo 055:B5). Se observan las bandas del RNA ribosomal, 28 s y 18 s.

## **2. Cinética de expresión del gen para la IL-1 $\alpha$**

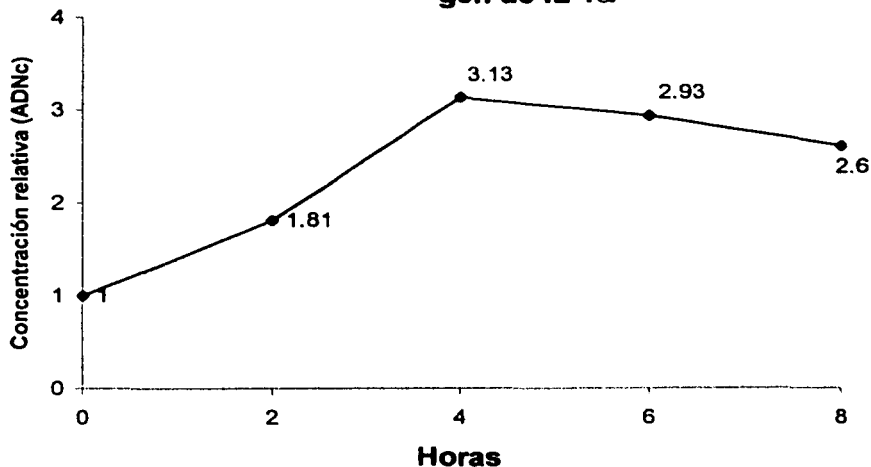
Se realizó la cinética de expresión del ARN mensajero de los macrófagos peritoneales estimulados con LPS, con el objetivo de evaluar la máxima expresión del gen de la citocina, de animales testigo de 9 semanas de tratamiento. En la figura 2 y en la gráfica 1 se muestra la cinética de expresión genética de la IL-1 $\alpha$  donde a partir de las 0 horas se observa el producto de ADNc esperado para la IL-1 $\alpha$  de alrededor de 263 pares de bases (pb) que permaneció hasta las 24 horas. Se observa la mayor intensidad del producto de expresión del gen a las 4 horas (carril 5).

A partir de la cinética de expresión del gen para IL-1 $\alpha$ , se consideró que el tiempo de cultivo más apropiado para evaluar la expresión del gen en los animales tratados con zinc fue a las 4 horas, donde se obtuvo la mayor expresión genética (concentración relativa de 3.13).



**FIGURA 2. Cinética de expresión del gen para la IL-1 $\alpha$  en macrófagos peritoneales.** El análisis del ARNm se llevó a cabo por RT-PCR de acuerdo en lo descrito en metodología. Se muestra el ADNc que se transcribió y se amplificó, del ARN obtenido de los macrófagos activados *in vitro* con LPS a las 0 h (carril 3), 2 h (carril 4), 4 h (carril 5), 6 h (carril 6) y 8 h (carril 7) de cultivo respectivamente. El producto tiene 263 pb y persiste durante 24 h siendo su intensidad mayor a las 4 h (carril 5). En el carril 2 se encuentran los marcadores de PM y en el carril 8, la expresión del gen sin estímulo de LPS.

**Gráfica 1. Cinética de expresión del gen de IL-1 $\alpha$**



**3. Efectos de la suplementación oral con zinc en la expresión del gen de IL-1 $\alpha$ .**

Para evaluar los efectos de la suplementación oral con zinc sobre la expresión del gen para IL-1 $\alpha$ , de animales en etapas perinatales, se determinó la expresión del ARNm de la citocina a las 4 horas después del estímulo con lipopolisacárido, en animales tratados con zinc desde la gestación a la lactancia (grupo I, 6 semanas de tratamiento) y su testigo. En la figura 3 se muestra la expresión del ARN

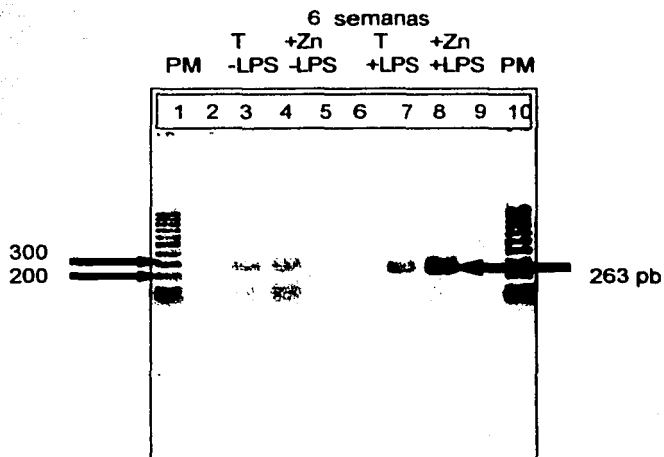
mensajero (ADNc de 263 pb) de la IL-1 $\alpha$ , también se muestra la expresión genética de macrófagos cultivados sin LPS en los mismos grupos.

En la figura 3 se observa que en los animales del grupo I es mayor la expresión del gen que en su testigo, este incremento es de 2.4 veces.

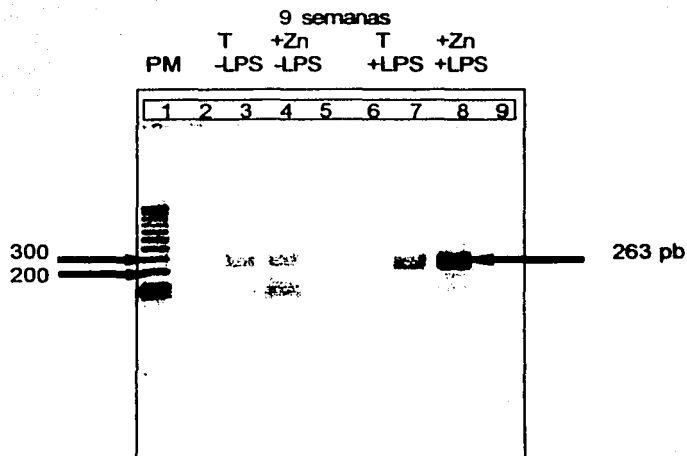
También se evaluó la expresión del gen en animales que recibieron el suplemento de zinc desde la gestación hasta el destete (grupo II, 9 semanas de tratamiento) con sus respectivos testigos, figura 4. Estos resultados indican que la suplementación con zinc incrementó la expresión genética de la citocina 3.7 veces, respecto al testigo.

En ausencia de lipopolisacárido también se observó la expresión basal de la citocina IL-1 $\alpha$  (ADNc de 263 pb). En la tabla III se muestran los resultados de la expresión del gen de IL-1  $\alpha$  de animales de 6 y 9 semanas de tratamiento con sus testigos. Se observa que la expresión del gen de IL-1  $\alpha$  se incrementa debido a la suplementación con zinc y a la estimulación con lipopolisacárido.

En resumen, los resultados nos indicaron un incremento en la expresión del gen de IL-1 en el grupo de ratones tratados con dosis de 500 mg/L desde la gestación hasta el final de la lactancia y desde la gestación hasta el destete (grupo I, 6 semanas de tratamiento y grupo II, 9 semanas de tratamiento) en comparación a sus grupos testigos.



**FIGURA 3. Efecto de la suplementación con zinc sobre la expresión del gen de la IL-1 $\alpha$  en los macrófagos de ratones con 6 semanas de tratamiento (grupo I).** Se muestra la expresión del ARNm de la IL-1 $\alpha$  (ADNc de 263 pb) de macrófagos estimulados con LPS durante 4 h de ratones que recibieron suplemento de 500 mg/L de zinc durante la gestación y la lactancia, 6 semanas de tratamiento y su grupo testigo (carril 8 y 7 respectivamente). Se observa que la suplementación con zinc incrementó la expresión del gen para la IL-1 $\alpha$  (carril 8). La expresión genética de los macrófagos cultivados sin LPS de los mismos grupos se encuentra en los carriles 3 y 4. Los carriles 1 y 10 corresponden a marcadores de PM.



**FIGURA 4. Efecto de la suplementación con zinc en la expresión del gen de IL-1 $\alpha$  en macrófagos peritoneales de animales con 9 semanas de tratamiento (grupo II). Se presenta el ARNm (ADNc de 263 pb), procedente de macrófagos estimulados con LPS de ratones que recibieron el suplemento de 500 mg/L de zinc durante la gestación, la lactancia y el destete. Se observa que el suplemento de zinc incrementó la expresión genética de la IL-1 en este grupo, respecto a su testigo (carril 8 y 7 respectivamente); la expresión genética de los macrófagos cultivados sin LPS de los mismos grupos, se encuentra en los carriles 4 y 3. En el carril 1 se encuentran los marcadores de PM.**

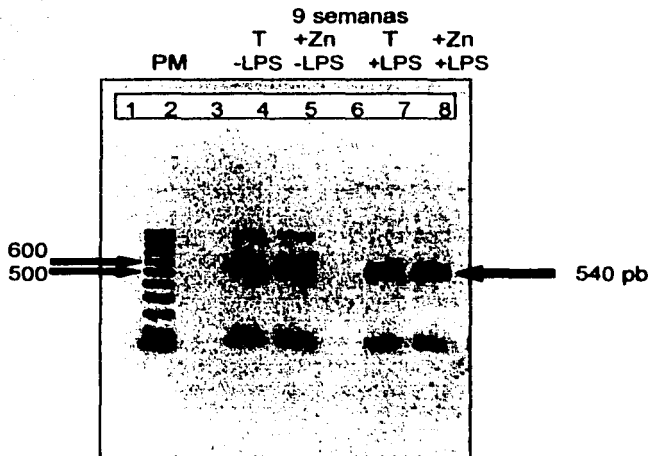


**Tabla III. Efecto de la suplementación con zinc en la expresión del gen de IL-1 $\alpha$  en animales tratados por 6 y 9 semanas**

Descripción	RT-PCR Concentración relativa de ADNc de IL-1 $\alpha$	Descripción	RT-PCR Concentración relativa de ADNc de IL-1 $\alpha$
6 semanas Grupo testigo -Zn , - LPS	1.00	9 semanas Grupo testigo -Zn , - LPS	1.00
6 semanas Grupo I +Zn , - LPS	1.30	9 semanas Grupo II +Zn , - LPS	1.05
6 semanas Grupo testigo -Zn , + LPS	1.00	9 semanas Grupo testigo -Zn , + LPS	1.00
6 semanas Grupo I +Zn , + LPS	2.40	9 semanas Grupo II +Zn , +LPS	3.74

#### 4. Expresión del gene de $\beta$ actina.

Para asegurar que la transcripción y amplificación de los genes estudiados fuera adecuada se analizó la expresión del gen de  $\beta$  actina (figura 5); a las 0 horas y sin estímulo se detectó un producto de 540 pb y durante la estimulación con LPS, la expresión genética se mantuvo constante. El análisis se hizo para IL-1 $\alpha$  y para el TNF $\alpha$ .



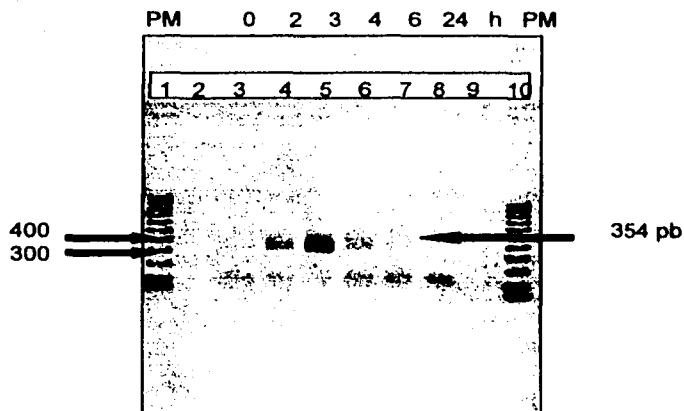
**FIGURA 5. Expresión del gen para  $\beta$  actina de macrófagos peritoneales de ratones (testigo control de RT-PCR).** En los carriles 7 y 8 se presenta el ARNm (ADNc de 540 pb) procedente de los cultivos estimulados con LPS, de ratones con 9 semanas de tratamiento que recibieron el suplemento de 500 mg/L de zinc durante la gestación, la lactancia y el destete y su grupo testigo. La expresión genética de los macrófagos sin LPS de los mismos grupos se encuentra en los carriles 4 y 5. Se observa que el suplemento de zinc y el LPS no modificaron la expresión genética de la  $\beta$  actina. En el carril 2 se encuentran los marcadores de PM.

## **DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DEL TNF $\alpha$**

Con la finalidad de conocer el patrón de expresión del gen de TNF $\alpha$  en los macrófagos de peritoneo de animales tratados con zinc (500 mg/L) durante la gestación, la lactancia y el destete, se analizó la expresión del ARN mensajero (ARNm) para la citocina. Se realizó el RT-PCR y mediante la aplicación de los geles de electroforesis del ADNc, se analizaron por densitometría. Se muestran los experimentos más representativos.

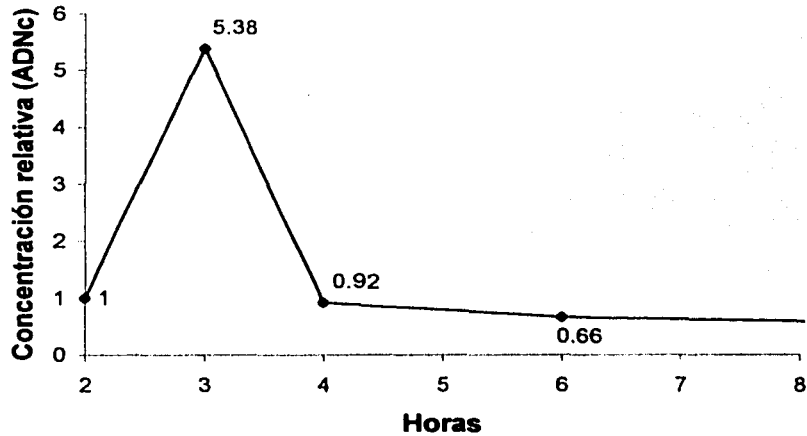
### **5. Cinética de expresión del gen para el TNF $\alpha$**

Para evaluar la máxima expresión del gen de la citocina se realizó la cinética de expresión del ARN mensajero (ADNc) de los macrófagos peritoneales estimulados con LPS, obtenidos de animales de 9 semanas de tratamiento, en la figura 6 se muestra la cinética de expresión genética de la TNF $\alpha$ , donde a partir de las 2 horas se expresa el producto de ADNc esperado, de alrededor de 354 pares de bases (pb) que permaneció hasta las 6 horas y se observa la mayor intensidad del producto a las 3 horas (carril 5). En la gráfica 2 se confirma que la máxima expresión es a las 3 horas después de la estimulación con LPS, (concentración relativa 5.38).



**FIGURA 6. Cinética de Expresión del gen para el TNF $\alpha$  de macrófagos peritoneales de ratón.** El análisis del ARNm se llevó a cabo por RT-PCR de acuerdo a lo descrito en metodología. Se muestra el ADNc que se transcribió y se amplificó del ARN obtenido de los macrófagos estimulados *in vitro* con LPS a las 0 h (carril 3), 2 h (carril 4), 3 h (carril 5), 4 h (carril 6), 6 h (carril 7) y 24 h (carril 8) de cultivo respectivamente. El producto fue 354 pb y persistió solo hasta las 6 h siendo su intensidad mayor a las 3 h (carril 5). En los carriles 1 y 10 se encuentran los marcadores de PM.

**Gráfica 2. Cinética de expresión del gen del TNF $\alpha$**



**6. Efectos de la suplementación oral con zinc en la expresión del gen de TNF $\alpha$ .**

Para determinar los efectos de la suplementación oral con zinc sobre la expresión del gen de TNF $\alpha$  en animales en etapas perinatales, se determinó la expresión del ARNm de la citocina, producida en los cultivos de macrófagos que se estimularon con lipopolisacárido durante 3 horas; de animales que recibieron zinc durante la

gestación hasta la lactancia (grupo I) y desde la gestación hasta el destete (grupo II) y sus respectivos grupos testigos.

En la figura 7 se muestra la expresión del ARN mensajero (ADNc de 354 pb) del  $TNF\alpha$  de macrófagos peritoneales estimulados 3 horas con LPS, de ratones que recibieron 500 mg/L de zinc por 6 y 9 semanas con sus respectivos testigos. Se observa que la suplementación con 500 mg/L de zinc en 6 semanas de tratamiento (grupo I) incrementó la expresión del gen de el  $TNF\alpha$ , alrededor de 3.9 veces respecto a su testigo.

En la figura 7 también se presenta el efecto de suplementación con zinc en los animales con 9 semanas de tratamiento (grupo II), mostrándose un incremento en la expresión del gen de  $TNF\alpha$  de alrededor de 2.6 veces, en comparación a su testigo. Estos análisis fueron hechos por densitometría.

Los resultados nos indican que la suplementación con zinc incrementa la expresión genética de la citocina y este incremento es mayor en los animales con 6 semanas de tratamiento (30%) comparado con los de 9 semanas de tratamiento.

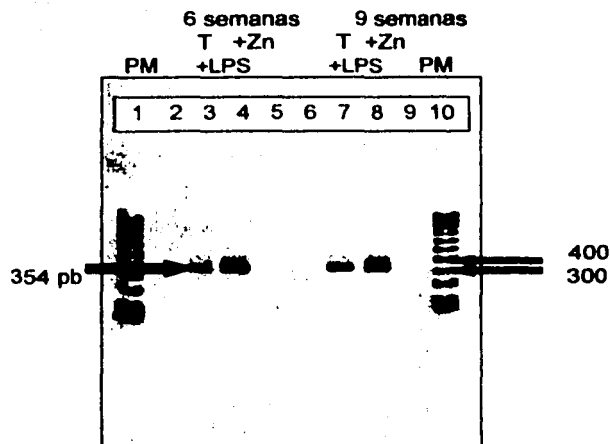
En ausencia de lipopolisacárido no se observó la expresión basal de el  $TNF\alpha$  (ADNc de 365 pb).

En el tabla IV se muestran los resultados de la expresión del gen de TNF $\alpha$  de animales de 6 y 9 semanas de tratamiento con sus testigos.

**Tabla IV. Efecto de la suplementación oral con zinc en la expresión del gen del TNF $\alpha$  en animales tratados durante 6 y 9 semanas**

Descripción	RT-PCR Concentración relativa de ADNc de el TNF $\alpha$	Descripción	RT-PCR Concentración relativa de ADNc de el TNF $\alpha$
6 semanas Grupo testigo -Zn , + LPS	1.00	9 semanas Grupo testigo -Zn , + LPS	1.00
6 semanas Grupo I +Zn , + LPS	3.94	9 semanas Grupo II +Zn , +LPS	2.63

Al igual que en la IL-1 $\alpha$  se analizó como testigo positivo del RT-PCR la expresión del gen para  $\beta$ -actina; a las 0 h y sin estímulo, se detectó un producto de 540 pb; durante la estimulación con LPS se mantuvo constante, figura 5.



**FIGURA 7. Efecto de la suplementación con zinc sobre la expresión genética del TNF $\alpha$  de los macrófagos de ratones con 6 y 9 semanas de tratamiento. En los carriles 4 y 3 se presenta el ARNm (ADNc de 354 pb), procedente de los macrófagos estimulados con LPS de ratones con 6 semanas de tratamiento, que recibieron el suplemento de 500 mg/L de zinc durante la gestación y la lactancia y el grupo testigo. En los carriles 8 y 7 se encuentra el ARNm de los macrófagos de ratones con 9 semanas de tratamiento, que recibieron el suplemento de zinc durante la gestación, la lactancia y el destete y el grupo testigo. Los animales tratados con zinc respondieron con un incremento de la expresión del gen para TNF $\alpha$  (carriles 4 y 8). En los carriles 1 y 10 se encuentran marcadores de PM.**



## VI. Discusión

La participación de los elementos traza en la salud es cada vez más evidente debido a la investigación experimental. En el caso del zinc, su deficiencia se relaciona con diversas manifestaciones clínicas como retardo en el crecimiento, hipogonadismo y las lesiones dérmicas además de un deterioro en el sistema inmune en la disminución de la reacción de células T, en los niveles de la hormona de la timulina, fagocitosis y quimiotáxis.<sup>20,58,59</sup> Se conoce que la deficiencia de zinc está presente en niños y adultos de muchos países, pues aunque el zinc está presente en muchos alimentos, en los países subdesarrollados se tiene una ingestión muy baja del elemento, debido a que la mayoría de los alimentos ingeridos contienen fibra y fitatos los cuales evitan una adecuada absorción del metal, dando como resultado en deficiencias marginales del metal.<sup>45,70</sup> Varios estudios han demostrado los beneficios de la suplementación con zinc en enfermedades infecciosas, las cuales adquieren diversas poblaciones humanas, demostrando entre otras ventajas que el zinc reduce la incidencia y duración de los episodios de diarrea aguda o crónica y también reduce la incidencia de infecciones respiratorias<sup>61,70</sup>

En la actualidad, existe un gran interés por entender tanto sus mecanismos de acción en las etapas perinatales como su papel en las funciones del sistema inmunológico.<sup>3</sup> Aunque no se conocen los eventos moleculares implicados en la acción del zinc sobre el macrófago, en diversos trabajos se indica que el zinc actúa principalmente sobre los macrófagos por inducción de la secreción de monocinas y la actividad de las células T representa un efecto secundario de la cascada de citocinas como la IL-1 $\alpha$  y el TNF $\alpha$ .

A ese respecto, en este trabajo el propósito fue evaluar los efectos de la suplementación con zinc durante etapas perinatales sobre, la expresión genética de dos monocinas, la interleucina 1-alfa y el factor de necrosis tumoral-alfa.

Con relación a la IL-1 se demostró que la suplementación con zinc aumenta la expresión del gen. En particular al administrar el suplemento de zinc (500 mg/L), *in vivo* en animales durante la gestación hasta la lactancia (grupo I, 6 semanas de tratamiento), se observa un incremento de 3 veces, en la expresión del gen para la IL-1 alfa respectó a su testigo, y al prolongar la suplementación hasta el destete (grupo II, 9 semanas de tratamiento) el incremento fue de alrededor de 4 veces. (Figuras 3 y 4). Estos resultados muestran a nivel de la expresión genética de la IL-1 $\alpha$ , que el incremento en la expresión del ADNc en el grupo II, es mayor que el aumento en el grupo I. También se observó al suplementar con zinc incrementa la expresión genética de la IL-1 $\alpha$  en los macrófagos, aún sin la presencia de un estímulo como el LPS. Esta acción del zinc también se ha informado en otras moléculas, como por ejemplo, la molécula de adhesión ICAM-1.<sup>49</sup>

También se ha observado cuando se estimula *in vitro* células de sangre periférica con zinc aumenta la expresión de la IL-1 y del TNF a diferencia de otros cationes como el cobalto, níquel y mercurio, los cuales no inducen la expresión de las monocinas.<sup>74</sup>

Estudios anteriores realizados en el laboratorio, demostraron que la concentración de la interleucina 1 en sueros y en sobrenadantes, disminuye aunque de manera por encima del testigo al prolongar la suplementación.<sup>34</sup> Lo que puede ser consecuencia de alteraciones a nivel de transducción o en el proceso de traducción y si existe una expresión del ARNm elevado no significa que al final se obtengan altas cantidades de la proteína.

La suplementación con zinc *in vivo* induce una mayor expresión de las citocinas, se prueba por tanto, que la administración de zinc *in vivo* aumenta la expresión genética de la IL-1 $\alpha$ . Los resultados sobre la interleucina 1 son importantes, porque esta monocina estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B, además de ser un mediador de la respuesta inflamatoria y participar en otras actividades importantes sobre el sistema inmune. Se logró en estos experimentos

conocer la acción del zinc al administrarse *in vivo*, facilitando y mejorando el desarrollo del sistema inmune en relación a una mayor expresión de la citocina, además, la presencia de zinc junto con la IL-1 contribuye estimular otros mediadores importantes como la interleucina 2, la interleucina 6 y la interleucina 8, las cuales son esenciales para regular el sistema de defensa de un individuo.<sup>23</sup> Así la suplementación de zinc podría ser de ayuda contra las infecciones en neonatos, sobre todo en aquellos, debido a problemas durante el embarazo están con bajo peso o con infecciones. En este sentido la administración de zinc durante un período cuidadosamente supervisado puede ser de beneficio en la salud de los recién nacidos.

Respecto a los efectos de la suplementación oral con zinc sobre la expresión del gen para el TNF $\alpha$ , se observa un aumento en la expresión del gen, esto es, en animales tratados desde la gestación hasta la lactancia (6 semanas de tratamiento), se observa un incremento del gen de 4 veces respecto a los testigos y en animales que recibieron el suplemento de zinc hasta el destete (9 semanas de tratamiento), también aumentó la expresión genética de la citocina aproximadamente 3 veces cuando se comparó con la expresión del testigo de la misma edad, Figura 7.

Los resultados del TNF, en relación a la menor inducción en la expresión genética de esta monocina, durante el tratamiento con zinc por un período más extenso, en el grupo II de 9 semanas, consideramos que una de las causas por la cual está disminuida podría ser como señala Brambilla *et al* en donde la participación ya conocida de las metalotioneínas puede afectar la distribución del zinc entre las proteínas, células y tejidos. De las proteínas que intervienen en el metabolismo del zinc son las metalotioneínas, moléculas dinámicas que tienen la capacidad de intercambiar metales, de esta forma, pueden modular algunos procesos genéticos activando o inactivando factores de transcripción que tienen en su estructura centros de zinc, por medio de la redistribución del zinc en estas moléculas; resulta posible que este mecanismo haya sido inducido por exceso de zinc, mostrándose

en el grupo II de nuestro modelo experimental con la disminución en la expresión genética de la citocina.<sup>13</sup>

Estudios anteriores realizados en el laboratorio, en los cuales la producción de TNF $\alpha$  en sobrenadantes de macrófagos de ratones con el mismo diseño experimental, en este trabajo, se produjo mas TNF $\alpha$  en ratones de 9 semanas de tratamiento con zinc, que en ratones de 6 semanas de tratamiento (1269 y 2665 pg/mL respectivamente),<sup>44a</sup> estos resultados se relacionan con los de un estudio llevado a cabo por Peters, en donde la producción de TNF $\alpha$  por monocitos neonatales estimulados con LPS (610 pg/mL) fue significativamente menor al compararlo con la secreción de células adultas (2230 pg/mL) mostrando una baja concentración de la citocina en la etapa neonatal.<sup>55</sup>

Los efectos benéficos del TNF $\alpha$ , en la resistencia a infecciones se deben a la producción de pequeñas cantidades en los sitios locales de infección. La producción de estas cantidades de TNF $\alpha$ , se observan en presencia de infecciones causadas por bacterias Gram (-), nuestros resultados sugieren que el zinc es un elemento importante para regular la respuesta inmune contra infecciones bacterianas. Sin embargo una excesiva producción de la monocina puede producir serios trastornos en el huésped ya que es responsable de las principales alteraciones clínicas y bioquímicas del shock endotóxico.<sup>29</sup>

Es importante señalar que la inducción del TNF $\alpha$  en nuestro modelo experimental, no produjo ningún signo patológico en los animales y la prolongación del tratamiento con zinc, aunque incrementó la expresión del gen y la síntesis de la proteína no pareció afectar el efecto fisiológico que pueda provocar la citocina, recordemos que los efectos del zinc pueda tener sobre el macrófago son de especial interés, ya que en las etapas alrededor del nacimiento la funcionalidad de ésta célula puede no ser la óptima y verse comprometida la respuesta inmune celular de los individuos.

Para nosotros fue importante estudiar el efecto del zinc en la expresión de la IL-1 $\alpha$  y del TNF $\alpha$ , ya que se conoce que estas citocinas son importantes en la respuesta inmune natural como específica, y al encontrarse que el zinc aumenta la expresión de las citocinas, observamos que cuando la IL-1 aumenta el TNF está disminuido, esto es de gran importancia ya que son monocinas pirogénicas.

Aunque puede existir cierta controversia con la posibilidad de incrementar la producción de las monocinas IL-1 y TNF, los resultados presentados en este trabajo indican que el zinc administrado oralmente por periodos controlados, puede favorecer el incremento de algunas de las respuestas inmunológicas, y tener una acción benéfica si se aplica en la dosis mínima efectiva, en los periodos de tiempo adecuados. Sin embargo, es importante hacer énfasis en que son necesarios estudios posteriores en modelos experimentales, para determinar la dosis óptima y los periodos durante los cuales tal ingesta puede ser benéfica, sin afectar el desarrollo de los individuos.

## **VII. Conclusiones**

- Al suplementar con 500 mg/L de zinc a ratones durante la gestación, la lactancia y el destete (6 y 9 semanas de tratamiento) se incrementa la expresión del gen de la IL-1 $\alpha$ .
- El incremento de la expresión del gen de IL-1 $\alpha$  es mayor en animales tratados por 9 semanas que en los tratados por 6 semanas de administración oral con zinc.
- La expresión del gen del TNF $\alpha$  se favorece al administrar oralmente el suplemento de zinc en animales durante el periodo perinatal.
- El incremento de la expresión del gen del TNF $\alpha$  es mayor en los animales tratados por 6 semanas que los tratados por 9 semanas, sin producir efectos secundarios en los animales suplementados.

## Bibliografía

1. Abul HT, Abul AT, Al EA, Behbehani AE, Khadadah ME, Dashti HM: Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) production by alveolar macrophages in patients with acute lung diseases: the influence of zinc supplementation. *Mol Cell Biochem* 146:139-145, 1995
2. Aggett PJ: Zinc. In: Oligoéléments en Pédiatrie, *Annales Nestlé* 52:103-117, 1994
3. Aguilar AE: Efectos de la suplementación de zinc sobre la respuesta inmunológica de ratones en etapas perinatales. *Tesis de Maestría, ENCB, IPN, 1996*
- 3a. Aguilar AE, Pastelin R, Pérez S and Lastra MD: Effects of Zn administration on interleukin-1 gene expression of murine macrophages. *Metal Ions in Biology and medicine, John Libbey, Eurotext, Paris*, 6:707-709, 2000
4. Aliprantis AO, Diez G, Mulder LCF, Zychlinsky A, Lang RA: Do macrophages kill through apoptosis?. *Immunol Today* 17:573-576, 1996
5. Allen LH: Zinc and micronutrient supplements for children. In: Black RE (Ed) *Zinc for Child Health, Am J Clin Nutr* 68 (suppl):495S-498S, 1998
6. Bahl R, Bhandari N, Hambidge KM, Bhan MK: Plasma zinc as a predictor of diarrheal and respiratory morbidity in children in an urban slum setting. In: Black RE (Ed) *Zinc for Child Health, Am J Clin Nutr* 68 (suppl):414S-417S, 1998
7. Bazzoni F, Beutler B: The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334:1717-1725, 1996
8. Beutler B, Bazzoni F: TNF, apoptosis and autoimmunity: A common thread? *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 24:216-230, 1998
9. Bettger WJ, O'Dell BL: Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells. *J Nutr Biochem* 4:194-207, 1993
10. Black RE: Therapeutic and preventive effects of zinc on serious childhood infectious diseases in developing countries. In: Black RE (Ed) *Zinc for Child Health, Am J Clin Nutr* 68 (suppl):476S-479S, 1998
11. Blondiau C, Lagadec P, Lejeune P, Onier N, Cavaillon JM, Jeannin JF: Correlation between the capacity to activate macrophages in vitro and the antitumor activity in vivo of lipopolysaccharides from different bacterial species. *Immunobiol* 190:243-254, 1994
12. Bloxam DL, Williams NR, Waskett RJD, Stewart SG: Disturbed zinc metabolism and reduced birthweight related to raised maternal serum alpha-fetoprotein in normal human pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 73:758-764, 1994
13. Brambilia EM, Lozano P: Metalotioneínas, bioquímica y funciones propuestas. *BEB* 8:21-27, 1999
14. Brown KH: Effect of infections on plasma concentration and implications for zinc status assessment in low-income countries. In: Black RE (Ed) *Zinc for Child Health, Am J Clin Nutr* 68 (suppl):425S-429S, 1998
15. Callard R, Gearing A (Eds): *The Cytokine FactsBook*, Academic Press, London, 1994

16. Caulfield LE, Zavaleta N, Shankar AH, Meriardi M: Potencial contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival. In: Black RE (Ed) **Zinc for Child Health, Am J Clin Nutr 68 (suppl):499S-508S, 1998**
17. Chandra RK: Nutrition and the immune system: an introduction. **Am J Clin Nutr 66:460S-463S, 1997**
18. Chomczynski P: A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques 15:532-536, 1993**
19. Coudray C, Rachidi S, Favier A: Effect of zinc on superoxide-dependent hydroxyl radical production *in vitro*. **Biol Tr Elem Res 38:273-287, 1993**
20. Cunningham S: Zinc modulation of immune function: Specificity on mechanism of interaction. **J Lab Clin Med 128:9-11, 1996**
21. Dinarello CA: Biology of interleukin 1. **Faseb J 2:108-115, 1988**
22. Dinarello CA, Wolff SM: The role of interleukin-1 in disease. **N Engl J Med 328:106-113, 1993**
23. Dinarello CA: Interleukin-1. **Advances in Pharmacology 25:21-43, 1994**
24. Donaldson DL, Kubo CH, Smith CC, Good RA: Effects of genetic diabetes and zinc nutriture on *in vivo* cell-mediated immunity in the mouse. **Am J Clin Nutr 43:263-271, 1986**
25. Dowd PS, Kelleher J, Guillou PJ: T-lymphocyte subsets and interleukin-2 production in zinc deficient rats. **BR J Nutr 55:59-69, 1986**
26. Dower SK, Sims JE: Interleukin-1 receptor. In: Roitt I (Ed). **Enciclopedia of Immunology**, Academic Press, 201-203, 1992
27. Driessen C, Hirv K, Kirchner H, Rink L: Zinc regulates cytokine induction by superantigens and lipopolysaccharide. **Immunology 84:272-277, 1995**
28. Durum SK, Schmidt JA, Oppenheim JJ: Interleukin 1: an immunological perspective. **Ann Rev Immunol 3:263-287, 1985**
29. Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S: Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunol Today 18:487-492, 1997**
30. English BK, Burchett SK, English JD, Ammann AJ, Wara DW, Wilson CB: Production of lymphotoxin and tumor necrosis factor by human neonatal mononuclear cells. **Pediatr Res 24:717-722, 1988**
31. Flynn A: Control of *in vitro* lymphocyte proliferation by copper, magnesium and zinc deficiency. **J Nutr 114:2034-2042, 1984**
32. Franker PJ, Telford WG: A reappraisal of the role of zinc in life and death decisions of cells **PSEBM 215:229-236, 1997**
33. Fraser JD, Urban RG, Strominger JL, Robinson H: Zinc regulates the function of two superantigens. **Proc Natl Acad Sci USA 89:5507-5511, 1992**
34. Fung EB, Ritchie LD, Roehl R, King JC: Zinc absorption in women during pregnancy and lactation: A longitudinal study. **Am J Clin Nutr 66 (suppl):484S-487S, 1997**
35. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF: Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. **Proc Natl Acad Sci. USA 87:2725-2729, 1990**



36. Higashida C, Gutierrez G: Lipopolisacáridos: Extraordinarias moléculas activadoras de señales de transducción celular. **Behv** 18:28-35, 1999
37. James SJ, Swendseid M, Makinodan T: Macrophage-mediated depression of T-cell proliferation in zinc-deficient mice. **J Nutr** 117:1982-1988, 1987
38. Jones EY, Stuart DI, Walker NPC: Structure of tumour necrosis factor. **Nature** 338:225-228, 1989
39. Kidd KK and Ruano G: Optimizing PCR. In: Pherson Mc, Hmes BD and Taylor GR (Eds) **PCR2: A practical approach**. Irl Press, New York, 1-15, 1995
40. Kovacs EJ: Control of IL-1 and TNF $\alpha$  production at the level of second messenger pathways. In: Kimball ES (Ed). **Cytokines and inflammation**, CRC press Inc, 89-103, 1991
41. Lastra MD, Pastelín R, Camacho A, Monroy B and Aguilar AE: Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response. **J Trace Elem Med Biol** 15: 5-10, 2001
42. Lastra MD, Heras M, Saldivar L, Valiente L, Pastelín R, Aguilar AE: Effects of zinc supplementation on the thymic index. In: Colley Ph, Carbello J, Domingo JL, Etienne JC (Eds) **Metal Ions and Biology and medicine**, John libbey, Eurotext, Paris, 5:418-422, 1998
43. Lastra MD, Aguilar AE, Pastelín R, Herrera M and Orihuela VD: Incremente of immune response in mice perinatal stages after zinc supplementetion. **Arch Med Reseach** 28: 67-72, 1996
44. Lastra MD, Aguilar AE, Pastelín R, Monroy B, Arrona: Zn effects on phagocytic responses during certain stages of ontogeny in mice. In: Colley Ph, Carbello J, Domingo JL, Etienne JC (Eds) **Metal Ions and Biology and medicine**, John libbey, Eurotext, Paris, 4:387-389, 1996
- 44a. Pastelín R, Aguilar AE, Cabañas M and Lastra MD: Zinc role on macrophages interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha secretion during mice perinatal stages. **Metal Ions in Biology and medicine**, John libbey, Eurotext, Paris, 6:747-750, 2000
45. Lockitch G: Trace elements in pediatrics. **IFCC** 9: 48-51, 1996
46. Lonnenmann G, Endres S, Van der Meer JWM, Cannon JG, Koch KM, Dinarello CA: Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin 1 $\alpha$ , interteukin 1 $\beta$  and tumor necrosis factor from human mononuclear cells. **Eur J Immunol** 19:1531-1536, 1989
47. Mahé Y, Oppenheim JJ: Interleukin 1. In: Roitt I (Ed). **Enciclopedya of Immunology**, Academic Press, 897-900, 1992
48. Mahomed K, Grant D, James DK: Amniotic fluid zinc and pregnancy outcome. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 52:157-161, 1993
49. Martinotti S, Toniato E, Colagrande A, Alesse E, Aleva C, Screpanti I, Morrone S, Scarpa S, Frati L, Hayday AC, Piovella F, Gulino A: Heavy - metal modulation of the human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) gene expression. **Biochimica et Biophysica Acta** 1261: 107-114, 1995
50. Mesna OJ, Steffensen IL, Hjertholm H, Andersen RA: Accumulation of metallothionein and its multiple forms by zinc, cadmium and dexamethasone

- in human peripheral T and B lymphocytes and monocytes. *Chem-Biol Interact* 94:215-224, 1995
51. Michel I, Lavigne C, Desrosiers T: Soluble and lipid-bound calcium and zinc during processing of infant milk formulas. *J Food Sci* 58:756-760, 1993
  52. Ogino K, Izumi Y, Ishiyama H, Murata T, Kobayashi H, Houbara T: Zinc hydroxide stimulates superoxide production by rat alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 185:1115-1121, 1992
  53. Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK: There is more than one interleukin 1. *Immunol Today* 7:45-56, 1986
  54. Oppenheim JJ, Rossio JL, Gearing AJH (Eds): *Clinical Applications of Cytokines*, Oxford University Press, New York, 1993
  55. Peters AMJ, Bertram P, Gahr M, Speer CP: Reduced secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  by neonatal monocytes. *Biol Neonate* 63:157-162, 1993
  56. Prasad AS: Marginal deficiency of zinc and immunological effects. In Prasad AS (Ed), *Essential and Toxic Trace Elements in Human Health and Disease: An Update* 380: 1-22 Wiley-Liss Inc, 1993
  57. Prasad AS: Zinc and immunity. *Mol Cell Biochem* 188:63-69, 1998
  58. Reinhold D, Ansorge S: Immunobiology of zinc and zinc therapy. *Immunol Today* 20:102, 1999
  59. Rink L, Kirchner H: Zinc-Altered immune function and cytokine production. *J Nutr* 130:1407S-1411S, 2000
  60. Rojas O: Bioquímica de la fagocitosis: una breve revision. *Bloquimia* 22:612-637, 1997
  61. Rosado JL, López P, Muñoz L, Martínez H, Allen LH: Zinc supplementation reduced morbidity, but neither zinc nor iron supplementation affected growth or body composition of mexican preschoolers. *Am J Clin Nutr* 65:13-19, 1997
  62. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491, 1988
  63. Scheibenbogen C, Andreesen R: Developmental Regulation of the cytokine repertoire in human macrophages: IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , and M-CSF. *J Leukocyte Biol* 50:35-42, 1991
  64. Scuderi P: Differential effects of copper and zinc on human peripheral blood monocyte cytokine secretion. *Cell Immunol* 126: 391-405, 1990
  65. Serasushago BA, Chandra RK: Alteration in spleen cellularity and cytokine production in zinc-deficient mice challenged with lipopolysaccharide. *Nutr Res* 15:369-380, 1995
  66. Shankar AH, Prasad AS: Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. In: Black RE (Ed) *Zinc for Child Health*, *Am J Clin Nutr* 68 (suppl):447S-463S, 1998
  67. Taubeneck MW, Daston GP, Rogers JM, Gershwin ME, Ansari A, Kenn CL: Tumor necrosis factor- $\alpha$  alters maternal and embryonic zinc metabolism and is developmentally toxic in mice. *J Nutr* 125:908-919, 1995

68. Vasalli P: The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10:411-452, 1992
69. Vega L: Papel del zinc en la nutrición. *Rev Mex Pediat* 62:157-164, 1995
70. Walsh CT, Sandstead HH, Prasad AS, Newberne, Fraker PJ: Zinc: health effects and research priorities for the 1990s. *Environ Health Perspect* 102: 5-46, 1994
71. Wastney ME, Angelus P, Barnes RM, Subramanian KNS: Zinc kinetics in preterm infants: a compartmental model based on stable isotope data. *Am J Physiol* 271:R1452-R1459, 1996
72. Weatherstone KB, Rich EA: Tumor necrosis factor/cachectin and interleukin-1 secretion by cord blood monocytes from premature and term neonates. *Pediatr Res* 25:342-346, 1989
73. Wellinghausen N, Schromn AB, Seydel U, Brandenburg K, Luhm J, Kirchner H, Rink L: Zinc enhances lipopolysaccharide-induced monokine secretion by alteration of fluidity state of lipopolysaccharide. *J Immunol* 157:3139-3145, 1996a
74. Wellinghausen N, Driessen C, Rink L: Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations. *Cytokine* 8:767-771, 1996b
75. Wellinghausen N, Ficher H, Kirchner H, Rink L: Interaction of zinc ions with human peripheral blood mononuclear cells. *Cell Immunol* 171: 255-261, 1996c
76. Wellinghausen N, Kirchner H, Rink L: The immunobiology of zinc. *Immunol Today* 18: 519-521, 1997
77. Zuñiga JC, Jiang D, Lenardo MJ: Requirement for TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  in fetal thymocyte commitment and differentiation. *Science* 268:1906-1908, 1995