



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EL ZINC COMO INMUNOMODULADOR EN LA
PRODUCCIÓN DE LA QUIMIOCINA CXCL10**

T E S I S

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

PRESENTA

GUADALUPE ELIZABET ORIVE MORA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: AGUILAR CÁRDENAS ANA ESTHER

VOCAL: Profesor: CASTELLANOS CHÁVEZ NORMA ANGÉLICA

SECRETARIO: Profesor: DÍAZ ARISTA PATRICIA

1er. SUPLENTE: Profesor: PÁRAMO RAMÍREZ JOSÉ IGNACIO

2° SUPLENTE: Profesor: MORENO EUTIMIO MARIO ADÁN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, LABORATORIO
1-D (ANEXO) LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOLOGÍA**

ASESOR DEL TEMA: DRA. ANA ESTHER AGUILAR CÁRDENAS

SUSTENTANTE (S): ORIVE MORA GUADALUPE ELIZABET

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Objetivos.....	2
1.3 Hipótesis.....	2
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 La quimiocina CXCL10.....	3
2.1.1 Generalidades de las quimiocinas.....	3
2.1.2 Características principales de la CXCL10.....	5
2.1.3 Estructura de CXCL10.....	7
2.1.4 Actividad mediada por el receptor CXCR3.....	9
2.1.5 Funciones principales de CXCL10.....	15
2.1.6 Patologías asociadas a CXCL10.....	17
2.2 EL ZINC	
2.2.1 Generalidades del zinc.....	19
2.2.2 Exposición al zinc.....	20
2.2.3 Distribución y transporte de zinc.....	21
2.2.4 Deficiencia de zinc.....	24
2.2.5 Suplementación con zinc.....	26
2.2.6 El zinc y la inmunidad.....	27
3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	30

4. RESULTADOS.....	35
5. DISCUSIÓN.....	44
6. CONCLUSIONES.....	50

Bibliografía

Anexo I Abreviaturas

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Debido a que la deficiencia de zinc está estrechamente ligada a una insuficiente ingesta diaria, en el laboratorio de investigación en inmunología se llevan a cabo estudios relacionados con este oligoelemento esencial, y el impacto que tiene sobre las diferentes células inmunes. En el laboratorio de inmunología se ha trabajado con diversas citocinas, pero es la primera ocasión en la que se registra la relación de zinc con una quimiocina inflamatoria, la CXCL10, por lo que los resultados obtenidos en esta investigación fungirán como guía para futuras quimiocinas a estudiar (por ejemplo, la quimiocina CXCL16).

Finalmente, se desea abrir un panorama más amplio acerca de las implicaciones que se tienen al tomar suplementos con base en la regulación del sistema inmunológico por el zinc.

1.2 Objetivos

Objetivo General

Determinar si existe una relación entre el consumo de elementos traza en la dieta y el buen funcionamiento del sistema inmune.

Objetivos Particulares

- Evaluar la concentración de la quimiocina CXCL10 (IP-10) en muestras de suero empleando un ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo, en ratones BALB/c suplementados con zinc.
- Cuantificar la producción de CXCL10 fisiológica en animales.
- Estimular *in vivo* la producción de la quimiocina CXCL10, simulando una infección, al administrar lipopolisacárido bacteriano a los animales de experimentación.

1.3 Hipótesis

La suplementación con zinc en roedores modificará la producción de la quimiocina CXCL10 lo que pondrá de manifiesto la modulación sobre el sistema inmune. Además, la simulación de una infección al estimular a los animales con una endotoxina, incrementará la producción de la quimiocina al menos en una concentración 2x con base en la concentración fisiológica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 La quimiocina CXCL10

2.1.1 Generalidades de las quimiocinas

Las quimiocinas son proteínas solubles de baja masa molar, de 8-13kD, que están implicadas en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos (van den Borne P *et al.* 2014) (Xu Z. *et al.* 2016). Son una subfamilia de las citocinas, cuya función principal es servir como factores de reclutamiento y migración de un amplio espectro de células inmunes circulantes hacia sitios de inflamación o lesión (Danesh A *et al.* 2008) (Vazirinejad R *et al.* 2014). Dichas proteínas comparten una estructura tridimensional común que está definida por 4 cisteínas conservadas: 2 cerca del extremo amino-terminal de la proteína, formando enlaces disulfuro con 2 cisteínas internas más (Van Raemdonck K *et al.* 2015). Las quimiocinas se dividen en 4 subgrupos con base en el espacio existente entre los dos residuos de cisteína conservados localizados en la región amino-terminal, figura 1:

1. Las quimiocinas C son aquellas en las que contienen solamente una cisteína.
2. Las quimiocinas CC cuyo par de cisteínas se encuentran adyacentes y reclutan monocitos.
3. Las quimiocinas CXC cuyo par de cisteínas se hallan separadas por un aminoácido "X" que es variable y se encuentran involucradas en el tráfico de leucocitos.
4. Las quimiocinas CX3C, cuyo par de cisteínas se encuentra separado por 3 aminoácidos variables.

Se han descrito aproximadamente 50 quimiocinas en total, que interactúan con 20 receptores acoplados a proteínas G (Colvin RA *et al.* 2006). Múltiples quimiocinas pueden unirse a un mismo receptor, y a su vez, una quimiocina única puede unirse a diversos receptores, pero el mismo ligando puede funcionar de maneras distintas dependiendo de la unión al receptor en la célula diana (Singh AK *et al.* 2013). Las subfamilias CC y CXC son las que contienen mayor número de miembros, mientras que las C y CX3C representan un número limitado de quimiocinas (Van Raemdonck K *et al.* 2015) (Van den Borne P *et al.* 2014).



Figura 1. Representación esquemática de los puentes disulfuro entre los residuos de cisteína conservados (C) en las quimiocinas CC y CXC. (Tomado de Kotyza J 2017)

Adicionalmente, las quimiocinas CXC pueden subdividirse en positivas si contienen los residuos de glutamina (E), leucina (L) y arginina (R) (ELR) localizado cerca de su extremo N-terminal, o como negativas si están ausentes (Xu Z *et al.* 2016) (Van Raemdonck K *et al.* 2015) y tienen las siguientes características:

- a) ELR positivas: Tienen propiedades angiogénicas, son quimioatrayentes de neutrófilos y se unen preferencialmente al receptor para quimiocinas CXCR2.
- b) ELR negativas: Tienen propiedades angiostáticas, son quimioatrayentes de linfocitos y se unen preferencialmente a CXCR3, específicamente a la isoforma CXCR3B.

Además existe otra clasificación de las quimiocinas con base en su función y las condiciones en las que se expresan (Romagnani P y Crescioli C 2012):

-Las quimiocinas inflamatorias o inducibles: Dirigen el reclutamiento de leucocitos en sitios de inflamación durante la infección, en lesiones de los tejidos y en tumores, para que al interactuar con su respectivo receptor, se induzcan cascadas de señalización intracelular con el fin de contrarrestar patógenos (Mehla R *et al.* 2012).

-Las quimiocinas homeostáticas o constitutivas: Controlan el tráfico de linfocitos y células dendríticas y se encargan de la vigilancia inmune.

El nombre de los ligandos se designa de acuerdo a su estructura (C, CC, CXC ó CX3C) seguidos de la sigla L y un número característico dentro de esa familia de ligandos. El nombre de los receptores se designa con base en la estructura de sus quimiocinas ligando, seguido por la sigla R y un número característico dentro de esa familia de receptores (por ejemplo el receptor CXCR3) (Czaja AJ 2014) (Van Raemdonck K *et al.* 2015).

2.1.2 Características principales de la CXCL10

La quimiocina CXCL10 es una proteína de 10kDa inducida por el IFN- γ y fue conocida anteriormente por sus siglas en inglés como IP-10 (interferon gamma-induced protein 10) (Liu M *et al.* 2011). Las moléculas Mob-1 y crg-2 son las proteínas homólogas en rata y ratón de la quimiocina humana CXCL10 al presentar un 70 y 78% de homología en la secuencia de aminoácidos (Dabiri S *et al.* 2016) (Vazirinejad R *et al.* 2014). Pertenece a la familia de las CXC ELR negativo que suprime la neovascularización y funciona como quimiocina angiostática (Lee EY *et al.* 2013).

Funcionalmente se describió como una quimiocina inflamatoria (Vazirinejad R *et al.* 2014) y se secreta bajo condiciones pro-inflamatorias por una variedad de células tales como leucocitos, neutrófilos activados, eosinófilos, células endoteliales, fibroblastos, y queratinocitos en respuesta al IFN- γ (Xia JB *et al.* 2016). El IFN- γ en combinación con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) logra ejercer un efecto sinérgico que aumenta la expresión de la quimiocina CXCL10 mediante mecanismos que implican la activación de las cascadas de señalización (Dhillon NK *et al.* 2007).

A pesar de ser una molécula angiostática, esta quimiocina y su correspondiente receptor, CXCR3, se han asociado a una mayor expresión con diferentes tipos de cánceres humanos en etapa avanzada (Liu M, Guo S, Stiles JK 2011). Se secreta principalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a la estimulación con IFN- γ , lipopolisacárido (LPS) bacteriano y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Lee EY *et al.* 2013). El mecanismo por el cual el LPS lleva a cabo la estimulación de citocinas inflamatorias se representa en la siguiente figura:

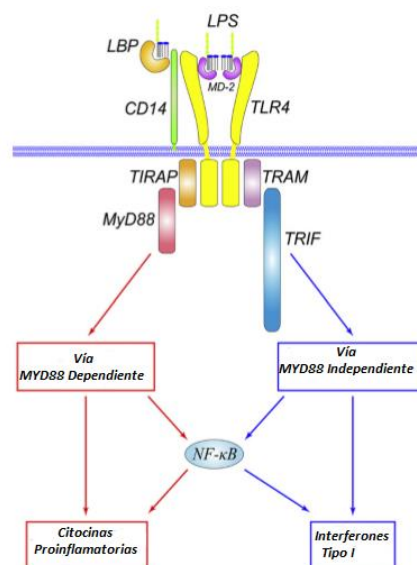


Figura 2. Descripción general de la señalización de LPS / TLR4 (Tomado y modificado de Lu YC *et al.* 2008)

La molécula CXCL10 es importante en el desarrollo de una respuesta Th1. En la activación de la respuesta Th1 se induce la producción de IFN- γ y TNF- α que a su vez estimulan la producción de la CXCL10 por lo propios linfocitos, pero también por otras células tales como neutrófilos, monocitos, células endoteliales, fibroblastos, tirocitos, queratinocitos, entre otros, lo cual conlleva a un circuito de retroalimentación positiva y de amplificación entre las células Th1 que producen IFN- γ (Mehla R *et al.* 2012) y las células residentes que generan CXCL10, lo que perpetua el proceso autoinmune como se muestra en la figura 3. Es por estas razones que cuando los niveles de CXCL10 se encuentran elevados en los líquidos periféricos se considera como un marcador de una respuesta inmune orientada a Th1 (Ferrari SM *et al.* 2015) (Liu M *et al.* 2011) (Antonelli A *et al.* 2014).

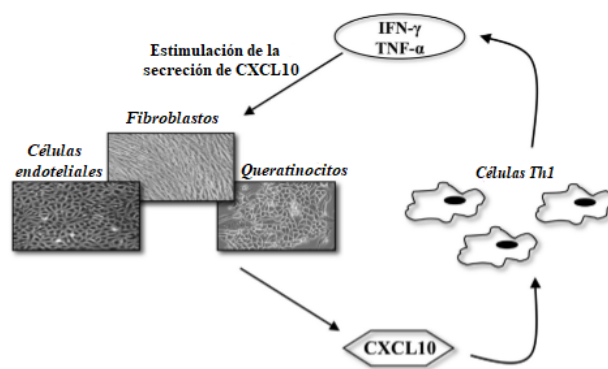


Figura 3. Ciclo de retroalimentación entre linfocitos Th1 y CXCL10. (Tomado y modificado de Ferrari SM *et al.* 2015)

2.1.3 Estructura de la CXCL10

El gen CXCL10 humano fue aislado en 1985 por Luster *et al.* y se identificó originalmente en células U937 humanas, una línea celular de linfoma con caracterización monocítica como producto inducible del interferón gamma (IFN- γ) (Xu Z. *et al.* 2016).

El gen de CXCL10 se encuentra en el cromosoma 4, contiene 4 exones y 3 intrones y codifica una proteína de 98 aminoácidos con una masa molecular de 10kDa (Vazirinejad R *et al.* 2014). El producto primario de la traducción del gen CXCL10 es una proteína de 12KDa que contiene dos puentes disulfuro internos. La acción de la peptidasa genera el polipéptido secretado de 10kDa con cuatro residuos de cisteína conservados en el extremo amino-terminal (Liu M, Guo S, Stiles JK, 2011) (Xu Z *et al.* 2016).

La proteína CXCL10 es una molécula catiónica de 98 residuos de aminoácidos con 10 residuos de lisina, 7 residuos de arginina, una carga neta total de 11(+) y un pI teórico de 9,93. Contiene una α -hélice en el extremo N-terminal, tres β -plegadas antiparalelas en el centro y una α -hélice en el extremo C-terminal como se representa en la figura 4 (Holdren GO *et al.* 2014).



Figura 4. Estructura tridimensional de CXCL10 modelo I-TASSER (Holdren GO *et al.* 2014)

2.1.4 Actividad mediada por el receptor CXCR3

La variabilidad de los efectos de la CXCL10 depende de la unión al receptor CXCR3, es decir, dependen de las células con las que interactúa (Van den Borne P *et al.* 2014). El receptor CXCR3 se expresa en linfocitos T activados, células dendríticas (CD), células asesinas naturales (NK), también en fibroblastos, células de músculo liso, epiteliales y endoteliales. La expresión de CXCR3 también es impulsado por el IFN- γ (Antonelli A *et al.* 2014).

Los diferentes subconjuntos celulares Th1 y Th2 se pueden diferenciar por la expresión de los diferentes receptores de quimiocinas. El receptor para quimiocinas CXCR3 está asociado con el fenotipo Th1 (Groom JR y Luster AD 2011).

En humanos, el CXCR3 se caracteriza por presentar 3 isoformas o variantes de empalme que se expresan diferencialmente por diferentes tipos de células (Van der Borne P *et al.* 2014) (Van Raemdonck K *et al.* 2015).

El corte y complementaridad del gen CXCR3 genera distintos receptores de quimiocinas, así como distintos ARNm, que resultan en tres exones diferentes como se muestra en la figura 5 (Romagnani P *et al.* 2004).

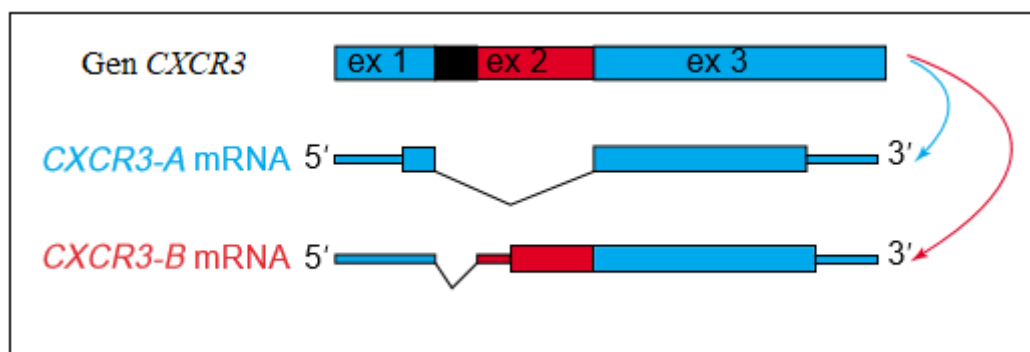


Figura 5. El corte y empalme alternativo del gen del receptor CXCR3 (Tomado y modificado de Romagnani P. *et al.* 2004)

Las 3 isoformas del receptor CXCR3 son:

- a) CXCR3-A: Se le conoce como isoforma angiogénica y se expresa por una gran variedad de células como leucocitos y células epiteliales. Está compuesto por 368 aminoácidos codificados por dos exones y separados por un único intrón y está asociado con una subunidad Gai o Gαq. La interacción de CXCL10 con esta isoforma promueve la proliferación celular y aumenta los niveles de calcio intracelular.
- b) CXCR3-B: También conocida como isoforma antiangiogénica, está compuesta por 415 aminoácidos, ya que tiene el extremo N-terminal más grande que CXCR3-A y es expresado principalmente por células epiteliales y endoteliales. La unión de la CXCL10 con esta isoforma inhibe la migración y promueve la apoptosis celular.
- c) CXCR3-alt: Está conformada solamente por 267 aminoácidos y muestra diferencias estructurales y funcionales atribuidas a un cambio en el marco de lectura. Tiene una secuencia C-terminal alterada drásticamente y presenta solamente de 4 a 5 dominios transmembranales (Singh AK *et al.* 2013). Se expresa con CXCR3-A a niveles muy bajos y se sabe que CXCL10 no se une a esta isoforma, únicamente presenta afinidad por el ligando CXCL11 (Boyé K *et al.* 2017)

La existencia de las dos isoformas principales, CXCR3-A y CXCR3-B, con efectos completamente divergentes puede explicar el efecto angiostático atribuido a ligandos de CXCR3 (Van Raemdonck K *et al.* 2015).

En los ratones, CXCR3 solamente se describe la isoforma que es comparable con la CXCR3-A en humanos que ejerce efectos de quimiotaxis, proliferación celular, migración y supervivencia celular.

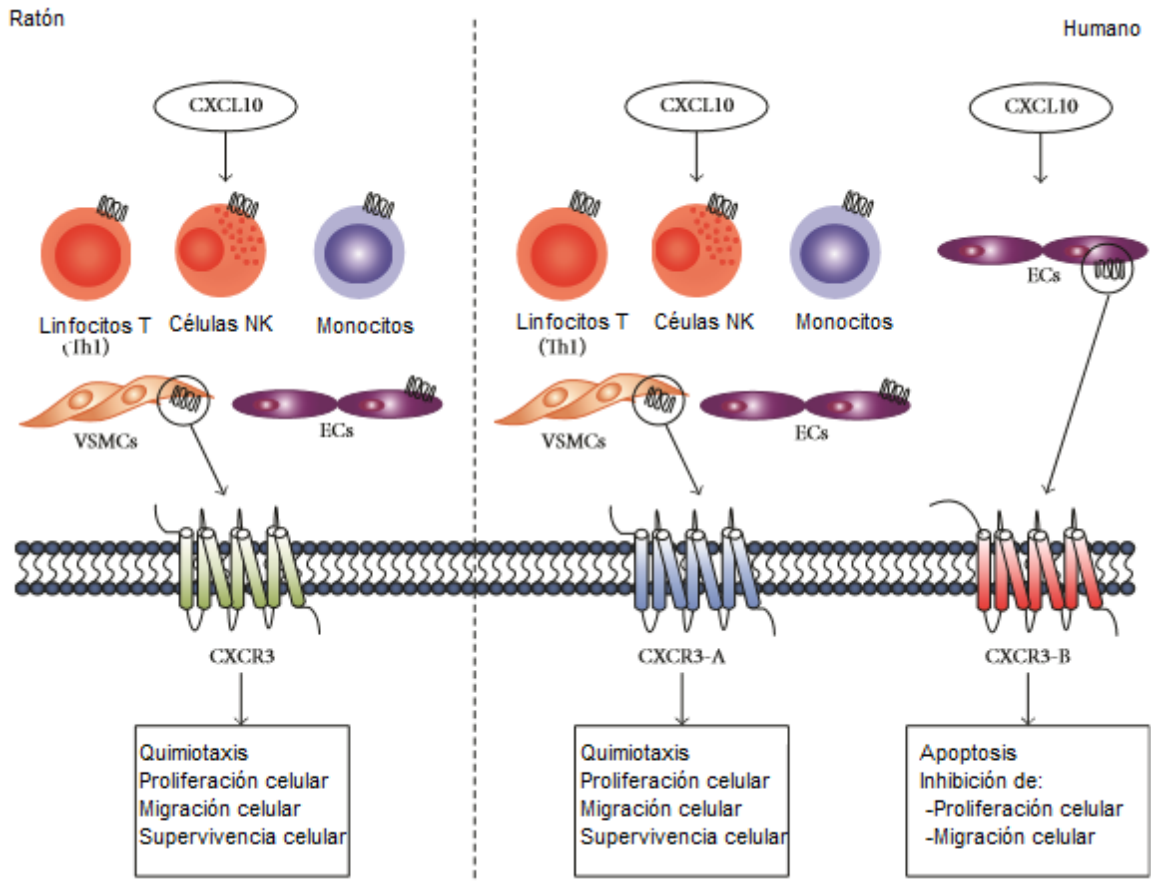


Figura 6. Efecto de CXCL10 en las isoformas CXCR3 en ratones y tejidos humanos (Tomado y modificado de Van der Borne P *et al.* 2014)

Debido a que no se ha descrito la expresión de las isoformas CXCR3-B y CXCR3-alt en ratones, se sugiere que las propiedades antiangiogénicas solamente aplican para humanos (figura 6) (Van der Borne P *et al.* 2014).

Basado en las diferencias en sus propiedades biológicas y bioquímicas las quimiocinas que se unen al receptor CXCR3 se pueden dividir en dos grupos (Van Raemdonck K *et al.* 2015):

El primer grupo lo conforman los ligandos que se unen tradicionalmente a CXCR3 y se caracterizan porque los genes de estas quimiocinas son altamente inducibles por IFN- γ . A este grupo pertenecen CXCL9 (también conocida como MIG), CXCL10 (también denominada como IP-10) y CXCL11 (comúnmente llamada I-TAC) y muestran un 40% de homología en su secuencia de aminoácidos (Mehla R *et al.* 2012). Debido a su similitud se puede plantear la cuestión de si las funciones de estas quimiocinas son redundantes, pero estudios realizados en ratones con genes dirigidos a la disrupción de CXCL9 y CXCL10 confirman que ejercen diferentes acciones individuales (Antonelli A *et al.* 2014) y presentan diferentes características de eficacia, potencia y unión al receptor. La quimiocina CXCL11 representa mayor afinidad por CXCR3, seguido de CXCL10 que tiene afinidad intermedia, mientras que la CXCL9 presenta la menor afinidad por el receptor. Sin embargo, CXCL11 induce la movilización de calcio y quimiotaxis en menor proporción que CXCL9 y CXCL10 (Groom JR y Luster AD 2011). Se considera que CXCL10 es el ligando más importante del CXCR3 debido a que es más receptivo a una amplia variedad de estímulos y se asocia a una multitud de condiciones fisiológicas y patológicas.

El segundo grupo lo conforman los ligandos derivados de plaquetas, CXCL4 (conocida también como PF4) y CXCL4L1, su expresión no es inducida por el IFN- γ si no que son liberados principalmente por plaquetas activadas y presentan una homología en su secuencia de aminoácidos de 96%. CXCL4L1 es una variante no alélica de la CXCL4 y se diferencia por tener solo tres sustituciones de aminoácidos cerca del extremo carboxi-terminal, alterando la

estructura tridimensional de la proteína, lo que hace que pierda actividad por glicosaminoglicanos (GAGs) y aumenta su poder angiostático.

El receptor para quimiocinas CXCR3 es un receptor transmembranal de 7 dominios acoplado a proteína G, está compuesto por la subunidad $G\alpha$, $B\beta$ y $G\gamma$. La unión de un ligando a CXCR3 conduce al intercambio de trifosfato de guanosina (GTP) por fosfato de guanosina (GDP), seguido por la disociación de la subunidad $G\alpha$ reguladora del dímero catalítico de la subunidad $G\beta\gamma$. Tras la activación, las subunidades de la proteína G pueden activar diferentes enzimas que conducen a la producción de fosfatos de inositol, la activación de la proteína cinasa, el aumento de la producción intracelular de Ca^{2+} y la reorganización de la actina (Van den Borne P *et al.* 2014).

Posteriormente, CXCR3-A se une a proteínas Gai o Gaq para activar la señalización de ERK1/2, p38/MAPK, JNK y PI3K/Akt, induciendo así la afluencia de calcio intracelular, la síntesis de ADN y la proliferación celular o la quimiotaxis (Liu M, Guo S, Stiles JK 2011) (Mehla R *et al.* 2012).

CXCR3-B, que es la otra isoforma variante, regula la acción antiproliferativa mediante Gos para activar la adenilato ciclasa. El cAMP estimula la proteína cinasa A (PKA) y provoca la inhibición de la proliferación y migración de células endoteliales (Liu M, Guo S, Stiles JK 2011) (Boyé K *et al.* 2017).

Actualmente se desconoce las razones precisas por las que las isoformas del receptor CXCR3 ejerce efectos totalmente opuestos, sin embargo se puede atribuir al hecho de que CXCR3-B tiene una cola amino-terminal más extensa que puede afectar la organización espacial y ejercer así un efecto distinto cuando se le une su ligando como se observa en la figura 7 (Boyé K *et al.* 2017)

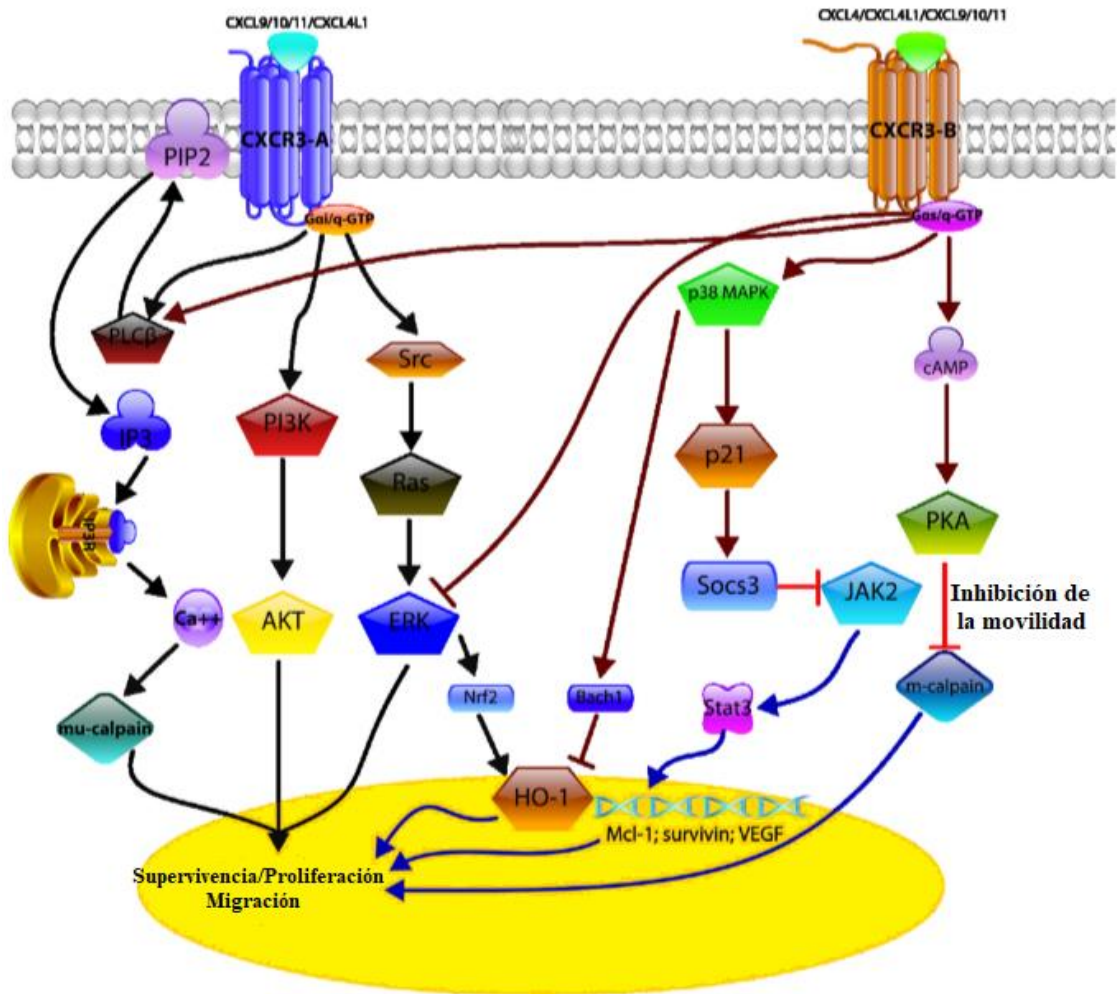


Figura 7. Las isoformas CXCR3 desempeñan papeles funcionales en direcciones opuestas (Tomado y modificado de Ma B, Khazali A y Wells A 2016)

El receptor CXCR3 sufre modificaciones post-traduccionales que son esenciales para la unión de sus ligandos y la activación del mismo. Se demostró que se requiere de la sulfatación de las tirosinas 27 y 29 localizadas en el extremo amino-terminal para la inducción de la actividad quimiotáctica y para la unión de los ligandos inducibles por IFN- γ . El residuo R216 localizado en el segundo bucle extracelular también desempeña un papel importante en la activación de la quimiotaxis y la movilización de calcio, pero no desempeña ningún papel como facilitador de la unión a los ligandos.

Los 16 aminoácidos localizados en el extremo amino-terminal y los residuos R197, R212, D112 y D278 resultan esenciales para la máxima unión y activación de CXCR3 para CXCL9, CXCL10 y CXCL11, mientras que los residuos D282 y E293 son importantes para la activación del receptor por los ligandos CXCL9 y CXCL10 pero no para CXCL11 (Colvin RA *et al.* 2006).

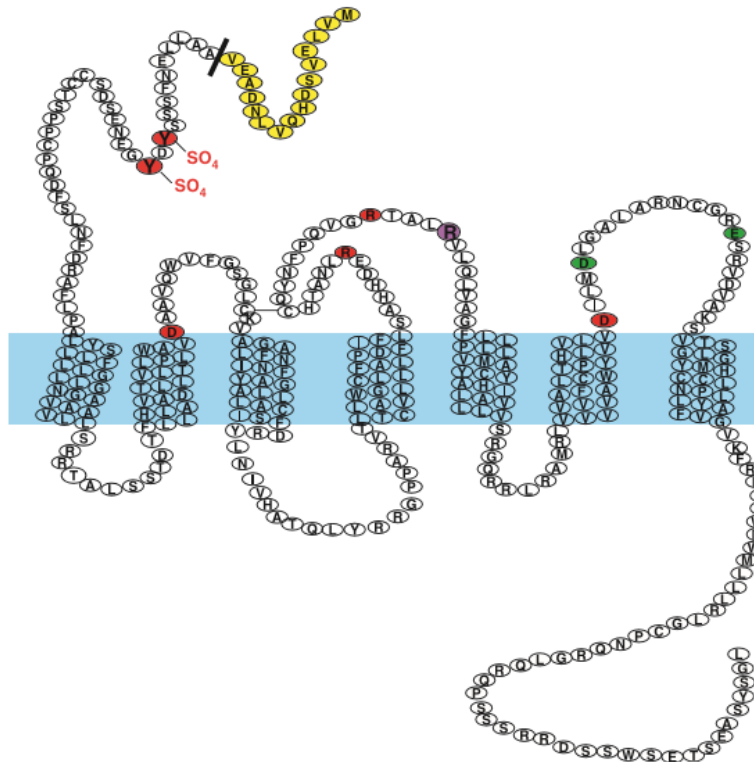


Figura 8. Estructura del receptor CXCR3 y sus residuos importantes para la activación por sus ligandos. Los residuos resaltados en rojo son necesarios para CXCL9, CXCL10, y CXCL11. En púrpura se muestra el residuo R216. (Colvin RA *et al.* 2006)

2.1.5 Funciones principales de CXCL10

Como se mencionó, la CXCL10 es una molécula pleiotrópica capaz de ejercer funciones biológicas potentes en las células CXCR3(+). Las principales funciones duales que ejerce esta quimiocina dependen del subtipo celular y/o de la isoforma del receptor CXCR3 y se enumeran a continuación (Xia JB *et al.* 2016) (Liu M *et al.* 2011):

1. Regulación de la quimiotaxis de células CXCR3(+)/inhibición de la migración celular.
2. Regulación del crecimiento celular y proliferación/apoptosis.
3. Regulación de la actividad angiogénica/angiostática.
4. Regulación de la infección/actividad antimicrobiana.

Se han observado niveles anormales de la CXCL10 en los fluidos corporales de individuos infectados con virus, bacterias, hongos y parásitos, lo que indica que ésta quimiocina desempeña un papel importante en la patogénesis de estas enfermedades (Liu M *et al.* 2011).

Estudios realizados por Liu M *et al.* mostraron que la alteración en la producción de CXCL10 incrementa la susceptibilidad a la infección. Generalmente, los niveles elevados de la quimiocina se correlacionan con el grado de daño de los órganos y carga de patógenos. El tratamiento anti-retroviral redujo el CXCL10 plasmático, lo que indica un papel importante de esta quimiocina en la patogénesis de las enfermedades virales. En infecciones bacterianas, uno de los hallazgos más relevantes que se ha demostrado es que el incremento de CXCL10 está asociado a la gravedad de la tuberculosis (TB) y puede ser utilizado como un marcador adicional para inmunodiagnóstico. A su vez, la disminución de la producción de CXCL10 condujo a una mayor susceptibilidad a la infección por *Legionella pneumophila*. Parece que incluso las enfermedades parasitarias provocan alteraciones significativas de la expresión de la CXCL10 en sangre periférica de huéspedes infectados (Liu M *et al.* 2011). Otros autores han reportado que cuando la CXCL10 se produce en la superficie de la piel o en la cavidad oral se puede potenciar la actividad antimicrobiana del huésped junto con otros péptidos, proteínas, enzimas y

lípidos antimicrobianos presentes en estas áreas, mejorando así la respuesta innata en presencia de microorganismos comensales u oportunistas selectivamente, tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium stratium* y *Candida albicans*. Sin embargo no se presenta actividad antimicrobiana para microorganismos tales como *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus sanguinis*, entre otros. El mecanismo exacto por el cual la CXCL10 ejerce efectos antimicrobianos aún no se conoce, aunque se relaciona con su estructura única, ya que tiene una carga neta de 11(+) y es probable que esto facilite su atracción a las superficies microbianas cargadas negativamente, al formar poros en la membrana citoplasmática microbiana lo que ocasionaría la pérdida de la integridad celular. (Holdren GO *et al.* 2014).

2.1.6 Patologías asociadas a la CXCL10

Algunos estudios han demostrado que los niveles circulantes de las quimiocinas pueden servir como predictores independientes o “biomarcadores” (Van den Borne P *et al.* 2014), por lo tanto la CXCL10 puede ser tanto una herramienta pronóstica potencial como una diana terapéutica debido a que se sabe tiene un papel clave como mediador inflamatorio en enfermedades infecciosas, autoinmunes y metabólicas (Xu Z *et al.* 2016).

El sistema nervioso central (SNC), la microglia, astrocitos y neuronas expresan y secretan a la CXCL10 soluble. Se sabe que la interferencia de la señalización CXCL10/CXCR3 está asociada a la iniciación y progresión de patologías relacionadas con el SNC. Una mayor producción de CXCL10 está relacionada

con enfermedades como esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Alzheimer, epilepsia y esclerosis lateral amitrófica (Liu M, Guo S, Stiles JK 2011).

La esclerosis múltiple comienza generalmente en la edad adulta temprana y se define como una enfermedad autoinmune con características clínicas de trastorno autoinmune crónico, inflamatorio y desmielinizante que afecta el sistema nervioso central. Se ha encontrado que más del 90% de las células T presentes en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con EM expresaron CXCR3 y las observaciones actuales sugieren que el eje CXCL10/CXCR3 participa en la patogénesis de la EM (Vazirinejad R *et al.* 2014).

Además, la quimiocina CXCL10 es conocida por tener propiedades neurotóxicas y está implicada en la demencia asociada al VIH (HAD), pues al interactuar con moléculas del hospedero tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) e IFN- γ da lugar a una disfunción neuronal gracias a la carga viral asociada al SIDA (Dhillon NK *et al.* 2007).

La CXCL10 se ha detectado en suero, líquido y tejido sinovial en pacientes con artritis reumatoide (AR). Esta quimiocina media la inflamación en la AR al dirigir a las células inflamatorias a la sinovia de las articulaciones (Lee EY *et al.* 2012).

La interacción CXCL10/CXCR3 promueve las propiedades relacionadas con la invasión y la metástasis en la tumorigénesis, que se atribuye a la alta expresión del CXCR3-A y aumento en las señales inhibitorias que disminuyen el receptor CXCR3-B, característico por tener propiedades anti-angiogénicas (Singh AK *et al.* 2013).

2.2 EL ZINC

2.2.1 Generalidades del zinc

El zinc se encuentra en el grupo 12 de la tabla periódica de los elementos, junto con dos metales tóxicos: el cadmio y el mercurio. Sin embargo, el zinc se considera no tóxico para los seres humanos. En conjunto con los otros dos metales, para los cuales se conoce poco acerca del papel en el organismo humano, el zinc es un oligoelemento esencial, no sólo para los seres humanos, sino para todos los organismos (Plum LM, Rink L y Haase H. 2010). La importancia del zinc para las plantas y los animales se ha sabido desde el milenio anterior, pero la función esencial que desempeña el zinc en los seres humanos fue reconocida hace más de 50 años en el Medio Oriente (Fraker PJ y King LE 2004), pues incluso hasta 1961 los libros de texto consideraban improbable que la deficiencia de zinc se produjera en humanos. Se sabe que los pacientes con deficiencia de zinc presentaron graves disfunciones en el sistema inmune y en esa época morían a los 25 años por infecciones (Prasad AS *et al.* 2009).

En 1974 la junta de alimentación y nutrición del consejo nacional de investigación de los Estados Unidos de América (National Research Council) tomó la decisión histórica de declarar al zinc como elemento esencial para los seres humanos y establecer la ingesta dietética recomendada, conocida por sus siglas en inglés como RDA (recommended dietary allowance) de 15 mg para hombres y mujeres adultos (Prasad AS 2008).

Actualmente se conoce que más de 300 enzimas requieren del zinc para ejercer sus actividades (Jansen J *et al.* 2012). El metabolismo de proteínas, así como en la división, crecimiento y función celular, requieren de una disponibilidad suficiente de zinc en el organismo (Costarelli L *et al.* 2014).

Así mismo se sabe que la deficiencia de este oligoelemento es prevalente en todo el mundo, sobre todo en países en desarrollo y afecta a 2,000 millones de personas (Prasad AS *et al.* 2009) (Costarelli L *et al.* 2014).

2.2.2 La exposición al zinc

Existen 3 vías principales por las que el zinc puede ingresar al organismo: mediante la inhalación, a través del contacto directo con la piel y por medio de la ingesta. Dependiendo de la vía de exposición será la cantidad de zinc absorbida (Plum LM, Rink L y Haase H 2010).

a) Por inhalación: La exposición a los humos que contienen zinc provienen generalmente de procesos industriales de galvanización, lo que hace a los trabajadores de fábricas propensos a esta exposición. También existen informes acerca de incidentes, por ejemplo, un grupo de soldados que fueron afectados por la inhalación de vapores de zinc desprendidos de bombas militares con humo que contenía óxido de zinc o cloruro de zinc y desarrollaron síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA) (Plum LM, Rink L y Haase H 2010).

Otro de los efectos más conocidos por exposición por vía aérea es la llamada fiebre de humo metálico (MFF), causada principalmente por la inhalación de metales con un tamaño de partícula menor a $1\mu\text{m}$ durante la fundición de zinc. Este síndrome agudo es reversible y no mortal y los efectos que presenta tales como fiebre, dolor muscular, náuseas y fatiga desaparecen después de transcurridos de uno a cuatro días (Plum LM, Rink L y Haase H 2010).

b) Contacto con la piel: La absorción del zinc a través de la piel está determinada por factores como el pH de la piel, la cantidad de zinc que se aplica y la especiación química en que se encuentra el zinc. En un estudio se comparó el efecto dérmico del zinc sobre la dermis en ratones y se concluyó que el cloruro de zinc fue el agente irritante más fuerte, seguido por el acetato de zinc en tanto que el óxido de zinc no presentó efectos irritantes. Sin embargo se sabe que el cloruro es un agente cáustico por sí solo por lo que la irritación no necesariamente es provocada por un efecto tóxico del zinc. Los autores concluyeron que la exposición dérmica de zinc no presenta un riesgo toxicológico notable e incluso el zinc es un suplemento y es utilizado para el tratamiento tópico de heridas y para diversas condiciones dermatológicas (Plum LM, Rink L y Haase H. 2010).

c) La absorción oral de pequeñas cantidades de zinc a través de los alimentos es esencial para la supervivencia. La principal causa de deficiencia de zinc en el organismo es la desnutrición, y la intoxicación por ingesta excesiva de este micronutriente es poco común.

2.2.3 Distribución y transporte de zinc

El cuerpo humano contiene 2-3 g de zinc, de los cuales el 90% se encuentra principalmente en músculo y hueso. La absorción oral de zinc conduce a la absorción del mismo a través del intestino delgado y la distribución se produce una vez que el oligoelemento se encuentra en el suero (Plum LM, Rink L y Haase H 2010). Debido a que el zinc desempeña un papel importante como componente estructural, catalítico y de señalización celular, su metabolismo y homeóstasis debe estar altamente regulado (Kimura T y Kambre T 2016).

Tras la captación del zinc por las células, un 50% del elemento se distribuye en el citoplasma, 30-40% en el núcleo y 10% en la membrana celular. La homeostasis del zinc celular está controlada de la siguiente manera (Kimura T y Kambre T. 2016):

- a) Puede unirse a metaloproteínas como componente estructural o a metaloenzimas para actuar como cofactor.
- b) El 5-15% de zinc puede estar unido a metalotioneínas (MTs).
- c) El zinc puede estar distribuido en organelos intracelulares para usarse como almacenamiento y reserva. Muchos tipos de células de mamíferos contienen estructuras vesiculares llamados zincosomas. Estas vesículas secuestran grandes cantidades de zinc (Plum LM, Rink L y Haase H 2010).
- d) Como resultado de las funciones anteriores, puede encontrarse zinc libre en el citosol aunque en concentraciones muy bajas (pM-nM).
- e) El zinc se moviliza dentro o fuera de los organelos y vesículas intracelulares por los transportadores ZnT y ZIP como se representa en la figura 9 (Giacconi R *et al.* 2015).

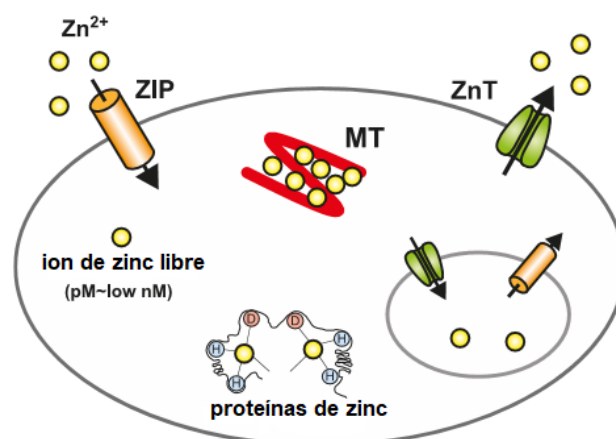


Figura 9. Homeóstasis del zinc controlada por la función cooperativa de metalotioneínas (MTs) y proteínas tipo ZIP y ZnT (Kimura T y Kambre T 2016)

Las metalotioneínas (MT) son proteínas de unión a metales de baja masa molar, que carecen de puentes disulfuro y contienen un tercio de residuos de cisteína. Las MT humanas tienen un total de 11 isoformas funcionales que se han dividido en 4 clases, denominadas MT-1 a MT-4. Las isoformas MT-1 y MT-2 están implicadas en el metabolismo del zinc. La función de éstas moléculas es mantener la homeóstasis celular del zinc y disminuir o atenuar la citotoxicidad inducida por metales pesados mediante quelación (Kimura T y Kambe T 2016). Además de la quelación y liberación por MTs, la movilización del zinc a través de las membranas biológicas es importante para mantener la regulación del zinc.

Aunque los iones de zinc pueden cruzar las membranas biológicas a través de varios canales de calcio, los transportadores ZIP y ZnT juegan un papel crucial para el transporte de zinc (Giacconi R *et al.* 2015).

En resumen, un total de 14 transportadores ZIP movilizan el zinc del espacio extracelular de los organelos hacia el citosol, mientras que un total de 9 transportadores ZnT ejercen el rol opuesto, movilizándolo al zinc desde el citosol hacia el espacio extracelular o hacia los organelos (Jansen J *et al.* 2012).

Existe un control de la expresión epigenética por lo que cada uno de los transportadores de zinc muestran un patrón de expresión específico de tejidos (Kimura T y Kambe T 2016).

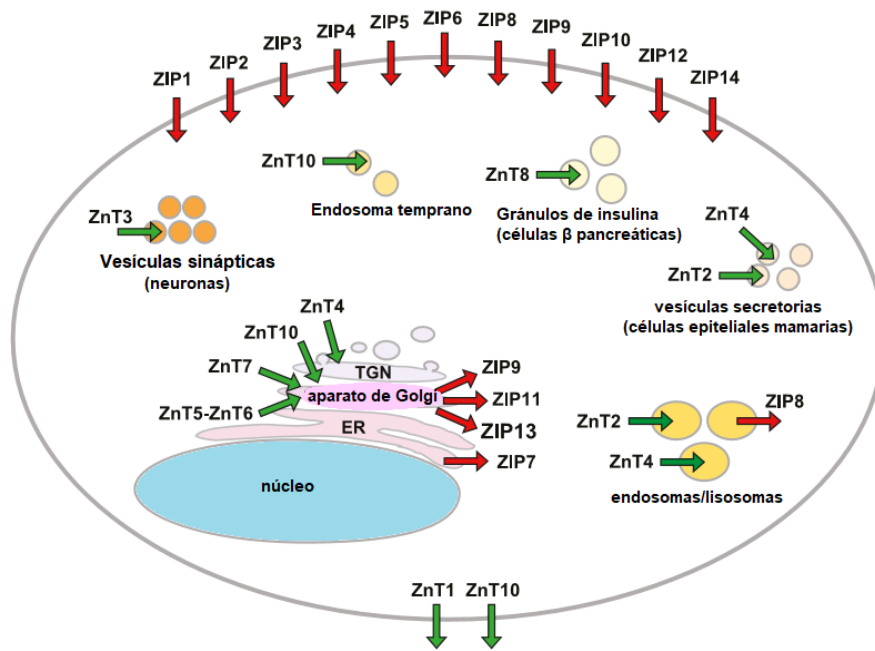


Figura 10. Localización subcelular de los transportadores de zinc ZIP y ZnT (Kimura T y Kambe T 2016)

2.2.4 Deficiencia de zinc

Las manifestaciones de la deficiencia de zinc pueden ser graves, aunque en general se manifiestan como marginales o leves (Prasad AS 2008). En la tabla I se enlista algunas de las manifestaciones de las deficiencias moderadas y severas de zinc:

Manifestaciones de una deficiencia moderada de zinc	Manifestaciones de una deficiencia severa de zinc
<ul style="list-style-type: none"> • Retraso del crecimiento • Piel áspera • Falta de apetito • Cicatrización retardada de heridas • Disfunciones del sistema inmune • Letargo mental • Hipogonadismo masculino en adolescentes 	<ul style="list-style-type: none"> • Alopecia • Diarrea • Trastorno emocional • Pérdida de peso • Infecciones debidas a disfunciones inmunitarias mediadas por células • Hipogonadismo en varones • Dermatitis pustulosa ampollosa

Tabla I. Manifestaciones de una deficiencia moderada y severa de zinc (Tomado de Prasad AS 2008)

La deficiencia severa de zinc puede ser heredada o adquirida. La forma más grave de deficiencia de zinc hereditaria es la acrodermatitis enteropática, que es un trastorno genético causado por una mutación en el transportador de zinc Zip4 (Fraker PJ y King LE 2004). En tanto que las formas de deficiencia de zinc grave adquirida han sido observadas en personas que reciben nutrición parenteral total sin suplementación con zinc ó después de ingestión excesiva de alcohol así como por tratamiento con histidina (Plum LM, Rink L y Haase H 2010).

Las manifestaciones clínicas de la deficiencia moderada de zinc se encuentran principalmente en pacientes con bajo consumo dietético de zinc, por sudoración excesiva en lugares tropicales, abuso de alcohol, enfermedad renal crónica e incluso como consecuencia de la enfermedad de las células falciformes (Plum LM, Rink L y Haase H 2010) (Prasad AS 2008). La deficiencia nutricional de zinc en los países en desarrollo es causada por una alta ingesta de proteínas de cereales, ricas en fitato orgánico, compuesto por fosfato orgánico que compleja al hierro y al zinc como se muestra en la figura 11, lo que hace que el zinc no esté disponible para la absorción (Prasad AS *et al.* 2009).



Figura 11. Del lado izquierdo se muestra la estructura del fitato y del lado derecho cómo se quela el fitato con el hierro y el zinc (Tomado de Manwaring HR, Bligh HFJ y Yadav R 2016)

Cabe señalar que la deficiencia de zinc causada por la desnutrición, el envejecimiento, ciertas enfermedades e incluso la homeostasis desregulada es un evento mucho más común que la intoxicación con zinc por exposición excesiva que es rara (Plum LM, Rink L y Haase H 2010).

Los suplementos de zinc a largo plazo, generan sus efectos tóxicos debido a que el zinc interfiere con la absorción de cobre.

De acuerdo con Prasad, como resultado de la deficiencia de zinc, los macrófagos son afectados y generan en respuesta citocinas inflamatorias tales como el TNF- α y la IL-1 β (Prasad AS 2008)

2.2.5 Suplementación con zinc

En diversos estudios realizados por Prasad y colaboradores se ha informado que los ancianos pueden presentar una concentración disminuida de zinc a nivel plasmático, aumento de marcadores oxidativos y aumento en la generación de citocinas inflamatorias. Después de la ingesta de suplementos con zinc, aumenta el nivel plasmático del metal, y disminuyen tanto los marcadores de estrés oxidativos como la expresión de citocinas inflamatorias.

En Estados Unidos, un estudio llevado a cabo por el NIH (National Eye Institute) se informó que el zinc y los antioxidantes (vitamina C, vitamina E, y β caroteno) redujeron significativamente las probabilidades de desarrollar degeneración macular relacionada a la edad avanzada y aunque el mecanismo exacto por el cual el zinc logra este efecto no se conoce (Prasad AS 2008) actualmente se propone que el zinc logra reducir el estrés oxidativo (Mocchegiani E *et al.* 2012).

Además el zinc logra reducir la duración de la diarrea aguda así como crónica y las infecciones del tracto respiratorio en los lactantes y los niños de países en desarrollo.

AS Prasad informa que la suplementación con zinc disminuye significativamente la incidencia de infecciones en sujetos de edad avanzada. También se ha reportado una reducción del 50% en la duración y gravedad del resfriado común después del tratamiento con acetato de zinc (Prasad AS *et al.* 2009).

2.2.6 El zinc y la inmunidad

Cuando existe deficiencia de zinc, las disfunciones inmunitarias pueden deberse a un desequilibrio entre las funciones de las células Th1 y Th2. El IFN- γ es el principal componente de una respuesta orientada a Th1, se ha observado que disminuye su expresión durante la deficiencia de zinc, lo que proporciona un mecanismo por el cual el zinc afecta probablemente la inmunidad, ya que las células Th1 promueven la activación de macrófagos y la producción de opsonizantes (Prasad AS 2008).

El estrés oxidativo es un factor importante que contribuye a varias enfermedades y procesos crónicos humanos, tales como la aterosclerosis, la neurodegeneración, cáncer y el proceso de envejecimiento (Prasad AS 2009).

El factor nuclear κ B (NF- κ B) existe en el citoplasma como un heterodímero P50 y P65 formando un complejo con la proteína inhibitoria I κ B. La fosforilación de I κ B por diferentes cinasas provocan la ubiquitinación y su degradación por proteosoma que da como resultado la activación y translocación del NF- κ B (Echeverri NP y Mockus I 2008).

El factor de transcripción NF-κB está implicado en la expresión de una variedad de genes específicos. El zinc inhibe la activación de NF-κB, lo que potencia la respuesta contra el cáncer (Prasad AS 2008), disminuyendo la angiogénesis y la inducción de citocinas inflamatorias, mientras que aumenta la apoptosis de células cancerosas.

El zinc es esencial para la actividad de la timulina, cuya función principal implica la diferenciación y maduración de las células. También se sabe que la expresión génica de IL-2 e IFN-γ citocinas Th1 dependen del zinc. La citocinas Th2 no se ven afectadas por la deficiencia de zinc, excepto la IL-10 que puede ser corregida por la suplementación con zinc (Prasad AS *et al.* 2009).

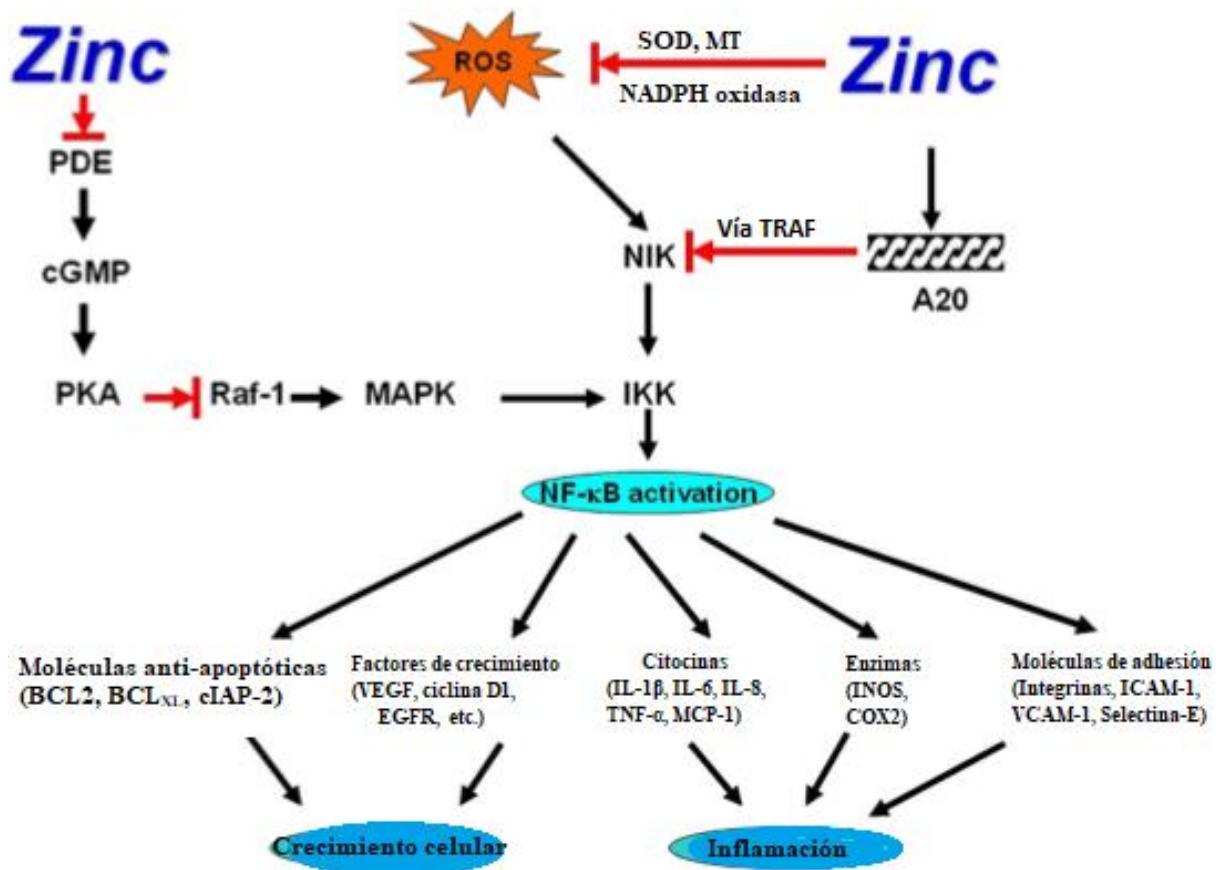


Figura 12. Vías de señalización del zinc en monocitos/macrófagos y células endoteliales vasculares (Tomado y modificado de Prasad AS *et al.* 2009)

Las Especies Reactivas de Oxígeno (conocidas por sus siglas en inglés como ROS) se generan *in vivo* en condiciones aeróbicas. El zinc regula negativamente la expresión génica de las citocinas inflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β , que se sabe que generan especies reactivas del oxígeno (ROS). Este puede ser un mecanismo adicional por el cual, el zinc puede funcionar como un antioxidante en los humanos (Prasad AS 2008). En el organismo las enzimas mitocondriales como el citocromo P450 de la cadena respiratoria, las flavoproteínas oxidasas y el metabolismo de los ácidos grasos peroxisomales son las fuentes más significativas de O₂, H₂O₂ y OH. Existen diferentes maneras en que el zinc logra disminuir la generación de ROS (Prasad AS et al. 2009) :

1. Las NADPH oxidasas son un grupo de enzimas que catalizan la producción del radical superóxido O₂⁻ a partir de oxígeno usando NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) como donador de electrones. El zinc es un inhibidor de esta enzima.
2. La dismutación del superóxido a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) que contiene tanto cobre como zinc. El zinc induce la producción de metalotioneína, que es rica en cisteína que es excelente eliminando hidroxilos OH.
3. El zinc compite con el hierro y el cobre para unirse a las membranas celulares, disminuyendo la producción de hidroxilo OH.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Animales de experimentación

Se emplearon ratones de la cepa BALB/c AnN, machos y hembras de 18-22g. Dichos animales se mantuvieron en cajas de plástico cubiertas de acero inoxidable y fondo de aserrín estéril y fueron alimentados *ad libitum* con alimento comercial Specially Formulated (PRO-LAB® RMH 2500 5P14 USA). Se mantuvieron en las condiciones de mantenimiento en bioterio de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio y las cruces se realizaron conservando la cepa singénica.

Suplementación con zinc

Para realizar el estudio de la relación entre el consumo de zinc en la dieta y la producción de CXCL10, se suministró acetato de zinc a los animales (Mallinckrodt-Baker 8740 México) en el agua de beber *ad libitum* en una concentración de 500 µg/mL. Para la ingesta de agua se emplearon botellas de vidrio con tapones de polietileno y tubos bebederos de vidrio.

Estimulación con Lipopolisacárido

Se realizó la curva de estimulación con Lipopolisacárido bacteriano (*Escherichia coli* O55:B5; SIGMA CHEM L-2880, St. Louis, MO, USA) para provocar una inflamación aguda, en una dosis de 1mg/Kg para un volumen final de 200µL en solución grado inyectable, por vía intraperitoneal, en los ratones de los diferentes grupos experimentales, en donde se encontró mayor producción de quimiocinas dentro de un rango de 2-4 horas y una disminución a su nivel basal después de las 6 horas.

Grupos experimentales

Los animales F1 fueron divididos en 8 grupos experimentales de acuerdo a la concentración de la suplementación recibida, la duración del tratamiento y la estimulación con Lipopolisacárido. Las crías recibieron suplementación con zinc 500 μ g/mL durante la gestación y la lactancia (tratamiento de 6 semanas) o durante la gestación, lactancia y destete (tratamiento de 9 semanas). Además, se llevó a cabo la estimulación *in vivo* con Lipopolisacárido bacteriano en una dosis 1mg/Kg vía intraperitoneal a las 3 horas. Los grupos testigo, de edades correspondientes (6 y 9 semanas respectivamente) no recibieron suplementación de zinc y recibieron agua desionizada *ad libitum*. La mitad de los grupos no fueron estimulados con Lipopolisacárido y se les administró un volumen igual de 200 μ L de solución salina. Cada grupo experimental cuenta con n=5 y los experimentos se realizaron por triplicado.

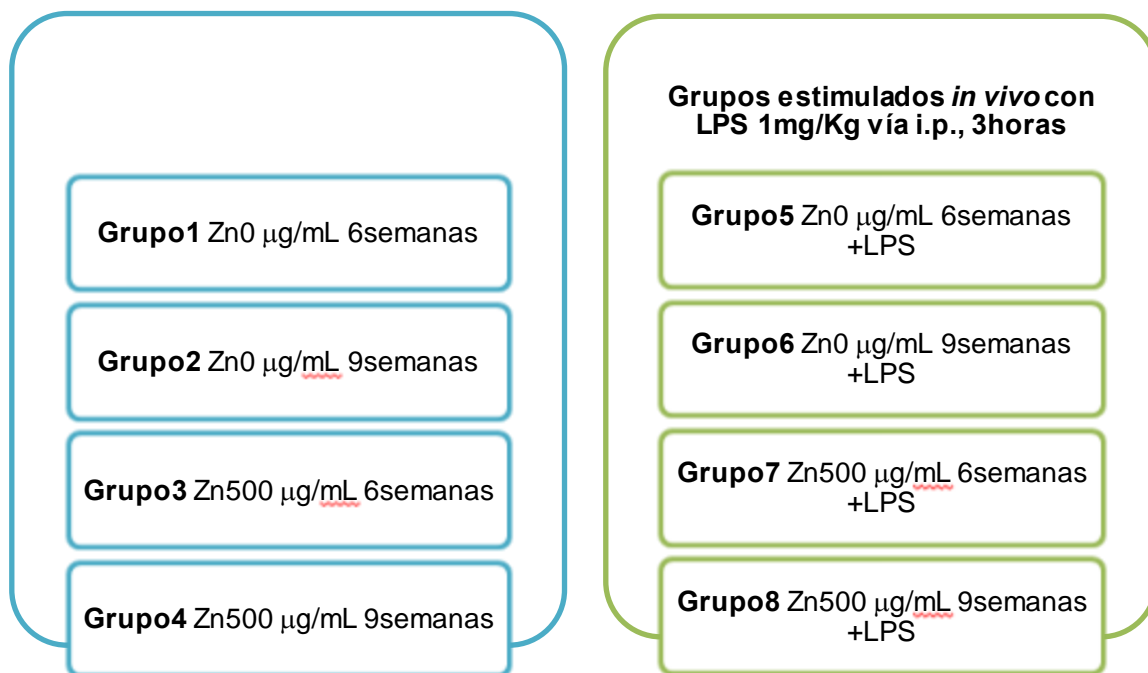


Tabla II. Grupos de experimentación

Efecto de la suplementación con zinc en la producción de la CXCL10

Para la detección de la quimiocina en suero, se empleó un ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo revelado mediante el sistema avidina-biotina-peroxidasa empleando reactivos PeproTech 900-M153 USA. La interacción antígeno-anticuerpo puede ser evaluada mediante métodos *in vitro*. En este caso se empleó un ensayo inmunoenzimático, el cual se apoya en tres características fundamentales: la especificidad de los anticuerpos, el elevado poder catalítico y la alta especificidad de las enzimas. Gracias a ello, este tipo de ensayos presenta grandes ventajas, como tener una elevada sensibilidad, detectabilidad y especificidad. Este ensayo conocido también como “sándwich” consiste en lo siguiente: Se tiene una fase sólida en la cual se adhiere un primer anticuerpo que captura el antígeno de interés presente en las muestras. Se realizan lavados para eliminar moléculas no adheridas y posteriormente se añade un segundo anticuerpo biotinilado, conocido como anticuerpo de captura, el cual reconoce un epítipo diferente del antígeno. Este segundo anticuerpo se une a la avidina marcada con la enzima que sirve como marcador, así que al añadir finalmente el ABTS+ H₂O₂ se desarrolla color que es cuantificable mediante espectrofotometría a una longitud de 405nm.

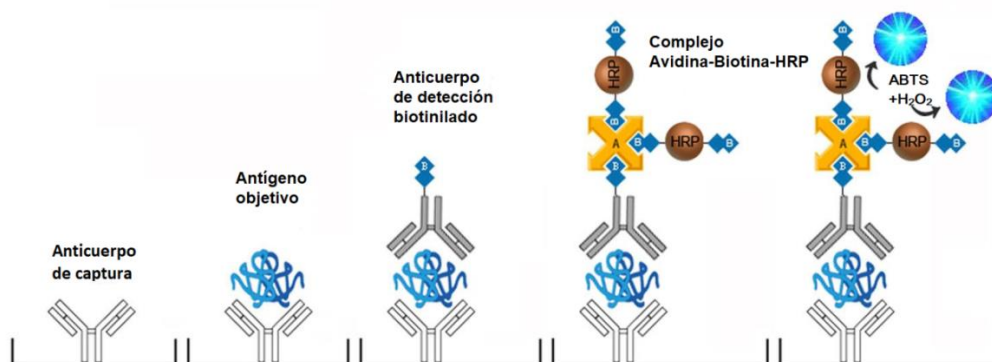


Figura 13. Ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo revelado mediante el sistema ABC (Tomado y modificado de LifeSpan BioSciences, Inc.)

Estandarización del método

1. Se fijó en microplacas para ELISA con 150 ng por pozo del anticuerpo α -CXCL10 en un volumen de 100 μ L de amortiguador salino de fosfatos y se incubó toda la noche a temperatura ambiente.
2. Se desechó el contenido de los pozos mediante inversión. Se lavaron 4 veces con 250 μ L de la solución de lavado (PBS con Tween-20 al 0.05%).
3. Se diluyó el estándar de CXCL10 murino a concentraciones que van de 32.5 a 1000 pg/mL.
4. Se adicionó a cada pozo 100 μ L de las muestras diluidas 1/10 del grupo a estudiar, por triplicado. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas.
5. Se desechó el contenido de los pozos y se lavó 4 veces con la solución de lavado (PBS con Tween-20 al 0.05%).
6. Se diluyó el anticuerpo de detección biotinilado hasta una concentración de 0.75ng por pozo en un volumen de 100 μ L, se incubó a temperatura ambiente durante 16 hrs, se desechó el contenido de los pozos y lavó 4 veces con la solución de lavado.
7. Se diluyó el conjugado Avidina-Peroxidasa 1:2000 y se adicionó 100 μ L a cada pozo. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el contenido de los pozos y se lavó 4 veces con la solución de lavado.
8. Se adicionaron 100 μ L de la solución de sustrato H₂O₂ +ABTS y se incubó 90 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo del color.

9. Se registró el desarrollo del color con un lector para microplacas a 405nm con la corrección de longitud de onda en 650nm.

10. Se realizó análisis estadístico (ANOVA y t-Student) con software el

GradPhad Prism 7.03.

SOLUCIONES	ESTANDARIZACIÓN
PBS	PBS pH 7.2 en agua estéril
Amortiguador de Lavado	PBS con Twee-20 al 0.05%
Amortiguador de Bloqueo	PBS con BSA al 1%
Diluyente	0.05% Tween-20, 0.1% BSA en PBS
Anticuerpo de captura	100µL Conc. 1.50µg/mL Cant/pozo=150ng OVERNIGHT Temperatura ambiente
Anticuerpo de detección	100µL Conc. 0.75µL/mL Cant/pozo=75ng 16 hrs. Temperatura ambiente
Lavados	250µL Amortiguador de Lavado 4 veces Con agitación 1 minuto
Estándares	Diluir estándar para una concentración : Std1 Cant/pozo= 100pg Std2 Cant/pozo= 50pg Std3 Cant/pozo= 25pg Std4 Cant/pozo= 12.5pg Std5 Cant/pozo= 6.25pg Std6 Cant/pozo= 3.125pg
Conjugado Avidina-HRP	Diluir a una concentración 1:2000
ABTS	100µL a cada pozo
Lectura	Tiempo de lectura óptimo: 90minutos

Tabla III. Condiciones de estandarización de Ensayo Inmunoenzimático de CXCL10 murino

4. RESULTADOS

Se monitoreó la cinética de estimulación con lipopolisacárido en ratones BALB/c AnN en un periodo de tiempo de 1 a 6 horas y los resultados obtenidos se muestran en la figura 1. Se puede observar que el gráfico presenta un comportamiento de parábola en donde la producción máxima de la quimiocina es a las 3 horas y posteriormente las concentraciones disminuyen nuevamente aunque al final de las 6 horas no decaen al nivel basal.

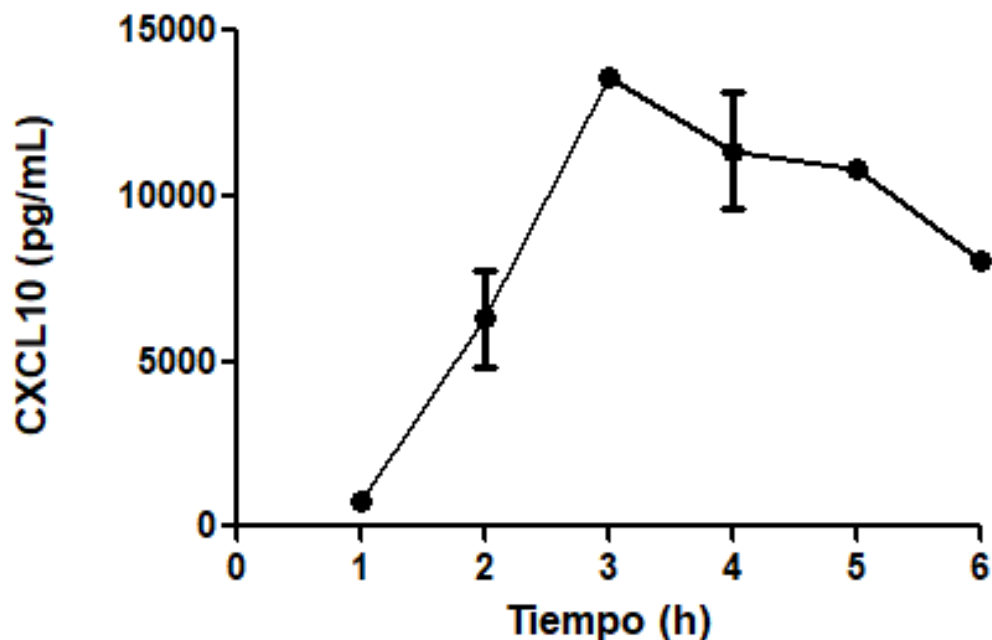


Figura 1. Cinética de estimulación *in vivo* con LPS de 1 a 6 horas en donde se muestra que el tiempo óptimo de estimulación es a las 3 horas, tiempo en el cual se obtiene un aumento del 95% de la concentración de CXCL10. Para la estimulación de la quimiocina en modelo murino se utilizó Lipopolisacárido bacteriano (*Escherichia coli* O55:B5; SIGMA CHEM L-2880, St. Louis, MO, USA)

Para determinar las concentraciones de la quimiocina se realizó una curva de calibración a partir de estándares. Los resultados obtenidos, así como la linealización de dicha curva se muestran en la figura 2 y 3, respectivamente.

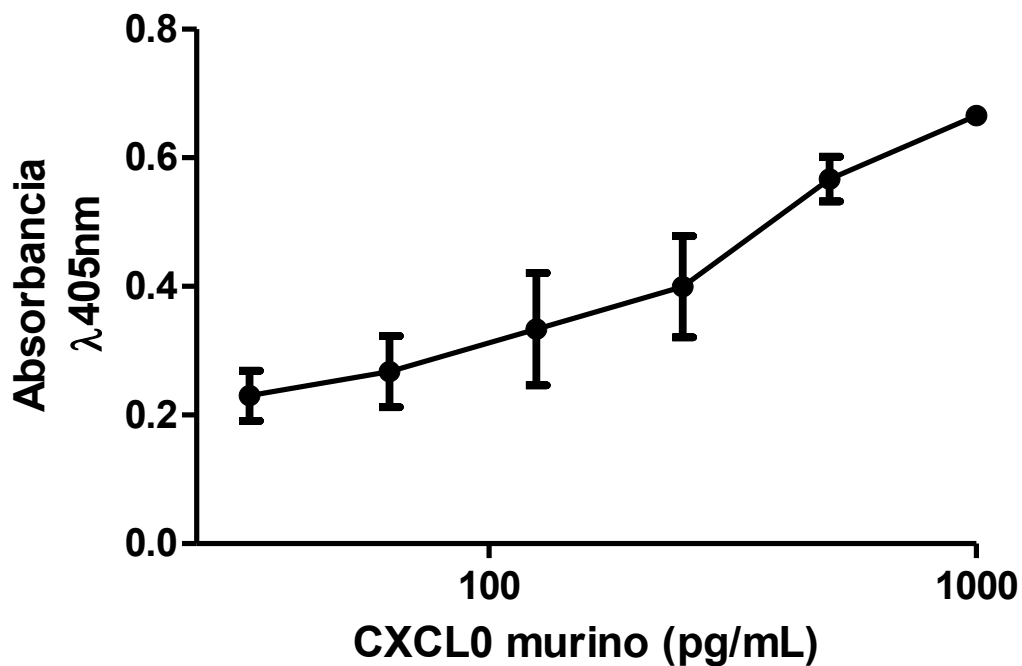


Figura 2. Curva estándar representativa del ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo de CXCL10 murino. Las concentraciones de la curva van desde 32.5 a 1000 pg/mL. La absorbancia fue medida en un lector para microtiras Behring EL301 a 405nm con filtro de corrección de 650nm.

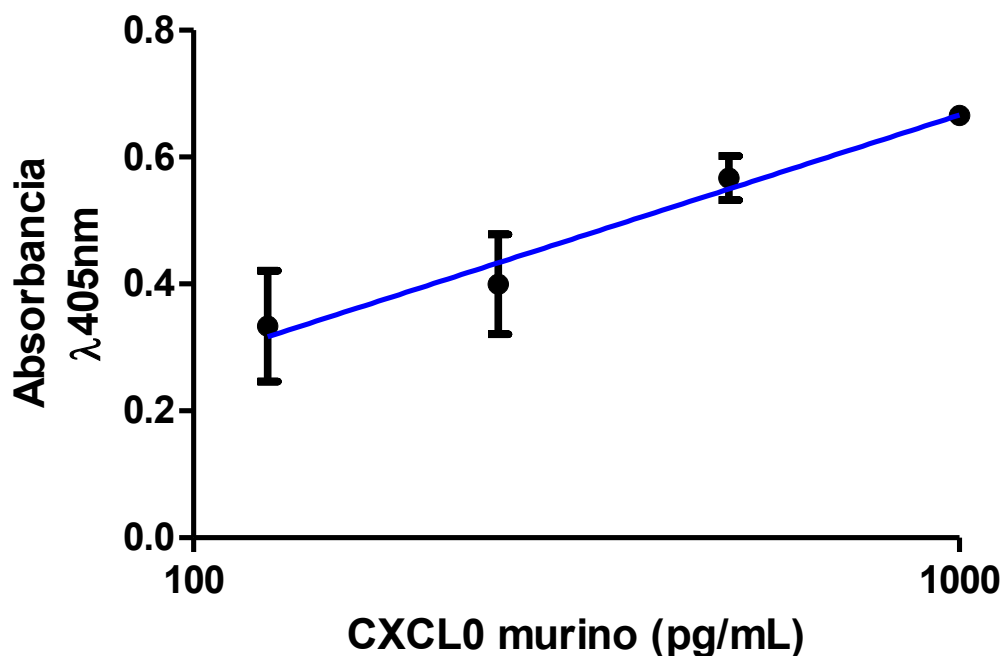


Figura 3. Linealización de la curva estándar representativa del ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo de CXCL10 murino. Las concentraciones de la curva van desde 125 a 1000 pg/mL. La absorbancia fue medida en un lector para microtiras Behring EL301 a 405nm con filtro de corrección de 650nm.

Para verificar el efecto que tiene el zinc en la producción de la CXCL10 se realizó un ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo con las 40 muestras de ratones divididas en 8 grupos con tratamientos diferentes, en donde las variables son: la concentración de la suplementación que recibieron los animales, la duración del tratamiento y la estimulación con lipopolisacárido. En la figura 4 se muestran todos los resultados obtenidos analizados mediante un ANOVA en donde se hace evidente que los grupos estimulados con LPS son los que muestran diferencias significativas del 90% o más.

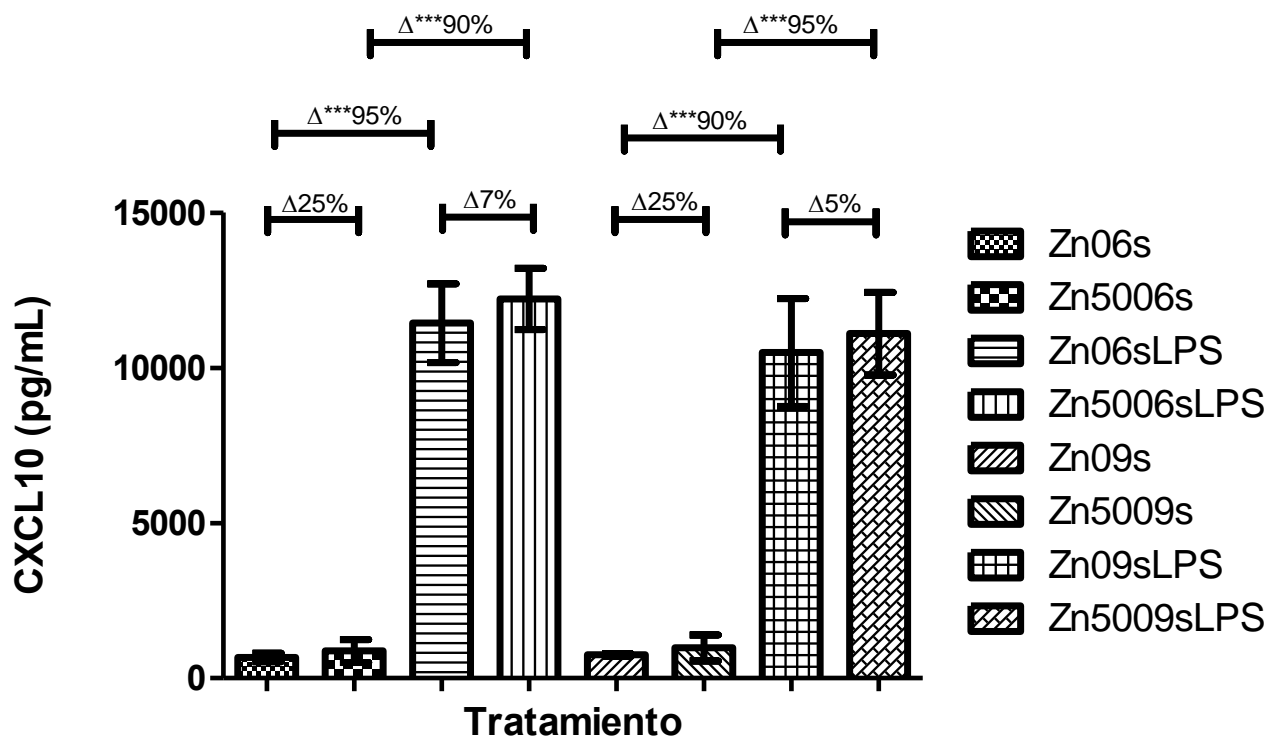


Figura 4. Resultados obtenidos de las concentraciones de CXCL10 en las muestras con tratamientos de Zn0 y Zn500 a las 6 y 9 semanas, con y sin estimulación de lipopolisacárido. Los resultados de las muestras fueron procesados con *GradPhad Prism 7.03* mediante ANOVA con $P < 0.05$.

De la figura 5 a la 12 se analizan por separados los grupos en los que se desea observar si existen diferencias significativas, analizados mediante la prueba t student.

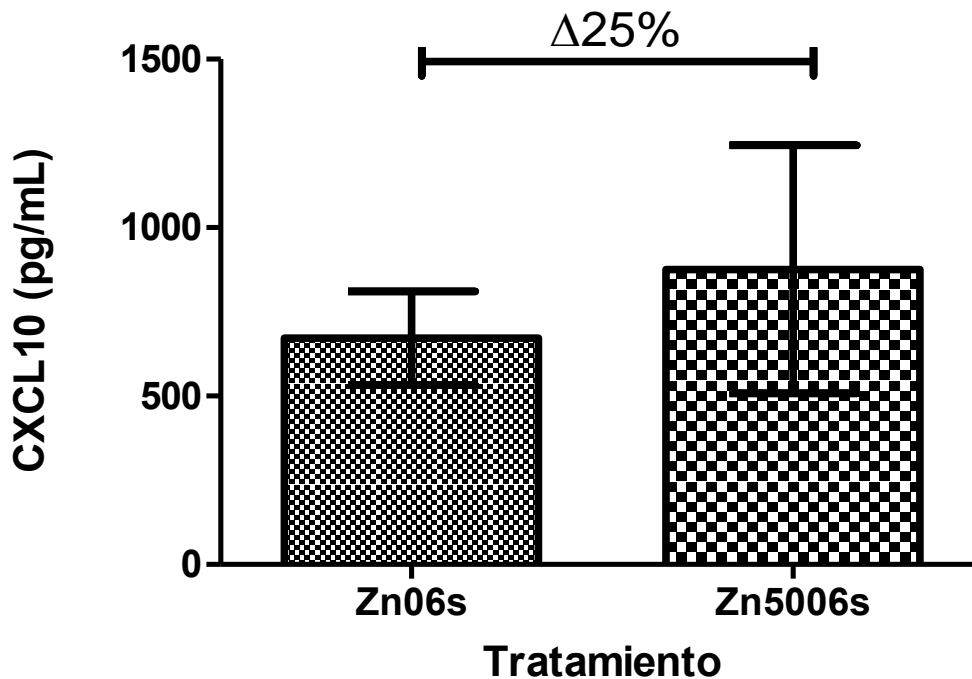


Figura 5. Resultados de la concentración de CXCL10 obtenidos en las muestras con tratamientos en ausencia y presencia de suplementación con zinc en una concentración de 500 μ g/mL durante 6 semanas. Los resultados de las muestras fueron procesados con *GradPhad Prism 7.03* mediante la prueba t student. Se observa un aumento de la concentración de CXCL10 con respecto al testigo del 25% con $P > 0.05$.

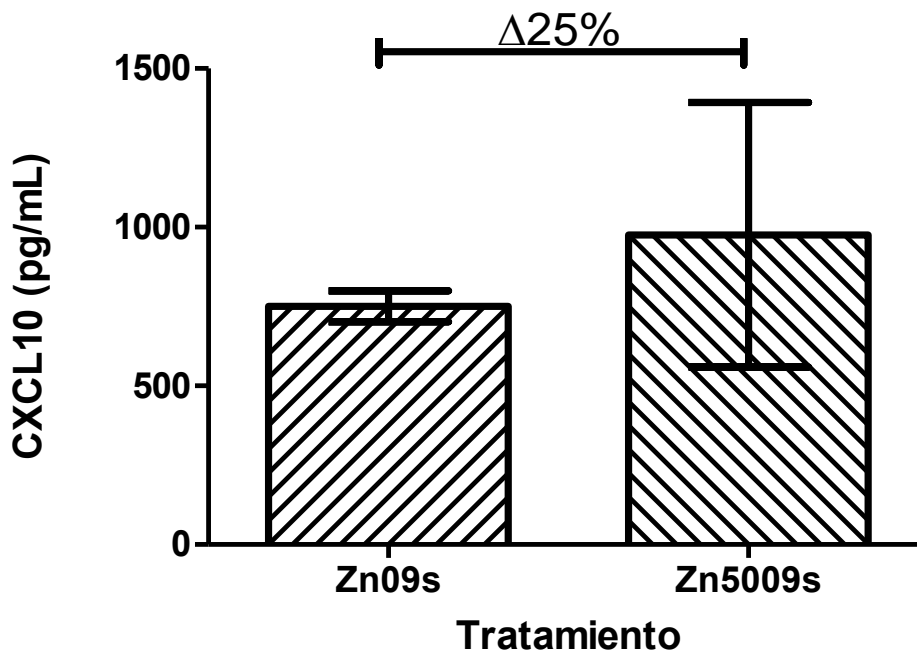


Figura 6. Resultados de la concentración de CXCL10 obtenidos en las muestras de animales suplementados con Zn500 con respecto al testigo Zn0, durante 9 semanas. Los resultados de las muestras fueron procesados con *GradPhad Prism 7.03* mediante la prueba t student. Se observa un aumento de la concentración de CXCL10 con respecto al testigo del 25% con $P > 0.05$.

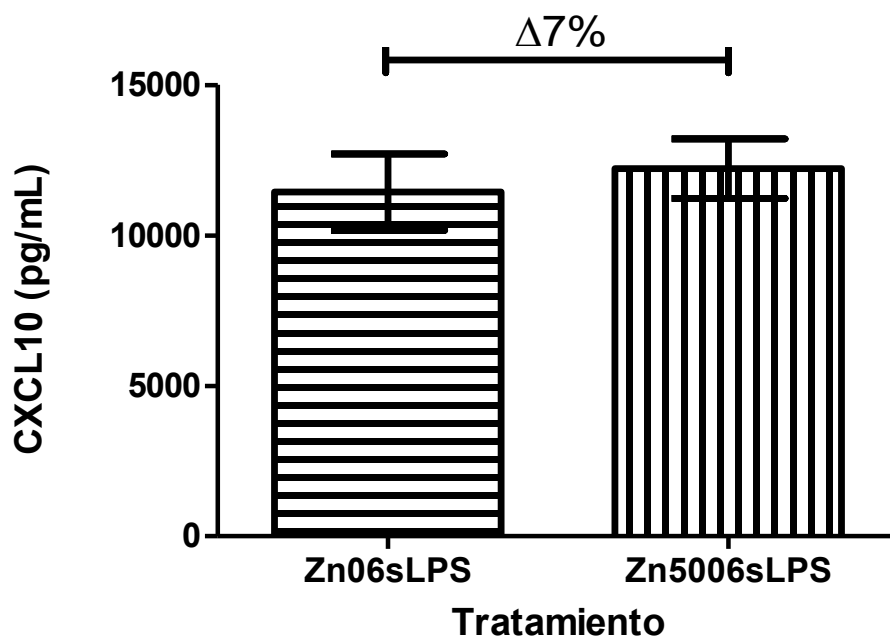


Figura 7. Resultados de la concentración de la quimiocina CXCL10 obtenidos de animales sin y con suplementación de zinc durante 6 semanas estimulados con lipopolisacárido bacteriano (*Escherichia coli* O55:B5; SIGMA CHEM L-2880, St. Louis, MO, USA) en una concentración de 1mg/Kg durante 3 horas. Los resultados fueron procesados con *GradPhad Prism 7.03*. Mediante la prueba t Student. Se observa un aumento de la concentración de CXCL10 con respecto al testigo del 7% con $P > 0.05$.

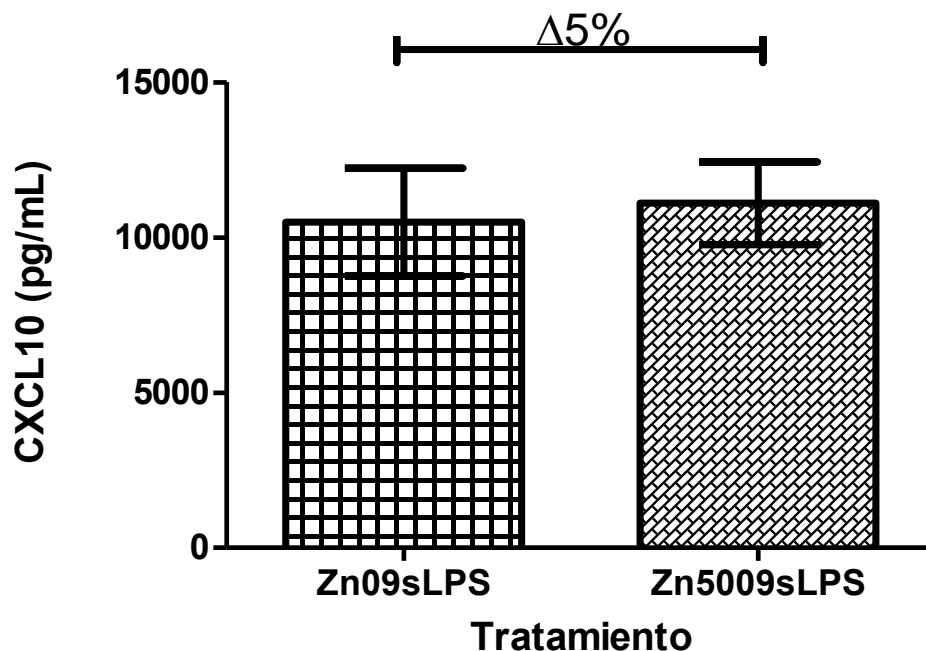


Figura 8. Resultados de la concentración de CXCL10 obtenidos de animales con y sin suplementación de zinc durante 9 semanas estimulados con lipopolisacárido bacteriano (*Escherichia coli* O55:B5; SIGMA CHEM L-2880, St. Louis, MO, USA) en una concentración de 1mg/Kg durante 3 horas. Los resultados fueron procesados con *GradPhad Prism 7.03*. Mediante la prueba t Student. El resultado muestra un aumento de la concentración de CXCL10 con respecto al testigo del 5% con $P > 0.05$.

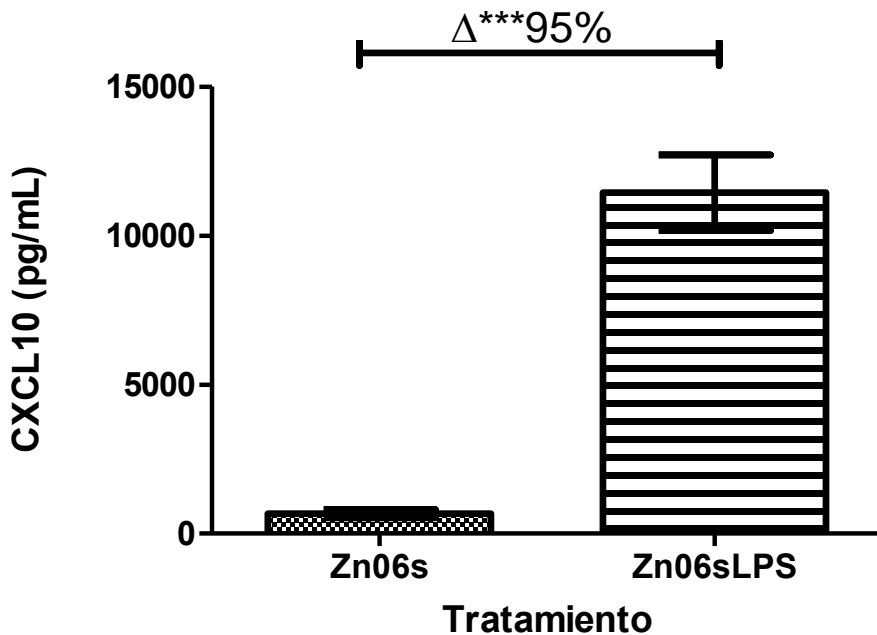


Figura 9. Resultados de la concentración de CXCL10 obtenidos de animales que no recibieron suplementación con zinc durante un periodo de 6 semanas sin y con estimulación con lipopolisacárido bacteriano (*Escherichia coli* O55:B5; SIGMA CHEM L-2880, St. Louis, MO, USA) en una concentración de 1mg/Kg durante 3 horas. Los resultados fueron procesados con *GradPhad Prism 7.03*. Mediante la prueba t Student. Se observa un aumento de la concentración de CXCL10 con respecto al testigo del 95% con $P < 0.05$.

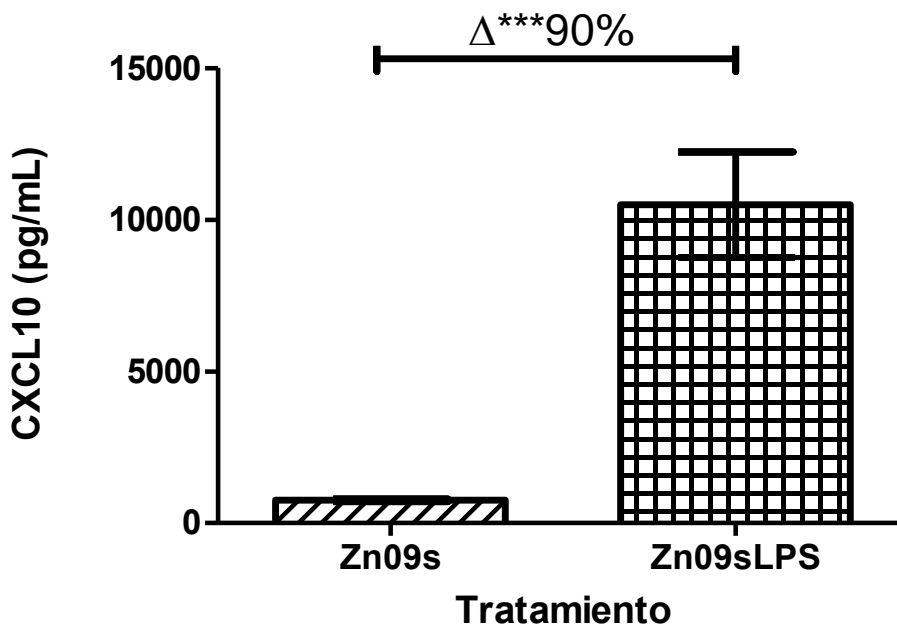


Figura 10. Resultados de la concentración de la CXCL10 obtenidos de animales con que no recibieron suplementación con zinc durante un periodo de 9 semanas sin y con estimulación con Lipopolisacárido bacteriano (*Escherichia coli* O55:B5; SIGMA CHEM L-2880, St. Louis, MO, USA) a una concentración de 1mg/Kg durante 3 horas. Los resultados fueron procesados con *GradPhad Prism 7.03*. Mediante la prueba t Student y se aprecia un aumento de la concentración de CXCL10 con respecto al testigo del 90% con $P < 0.05$.

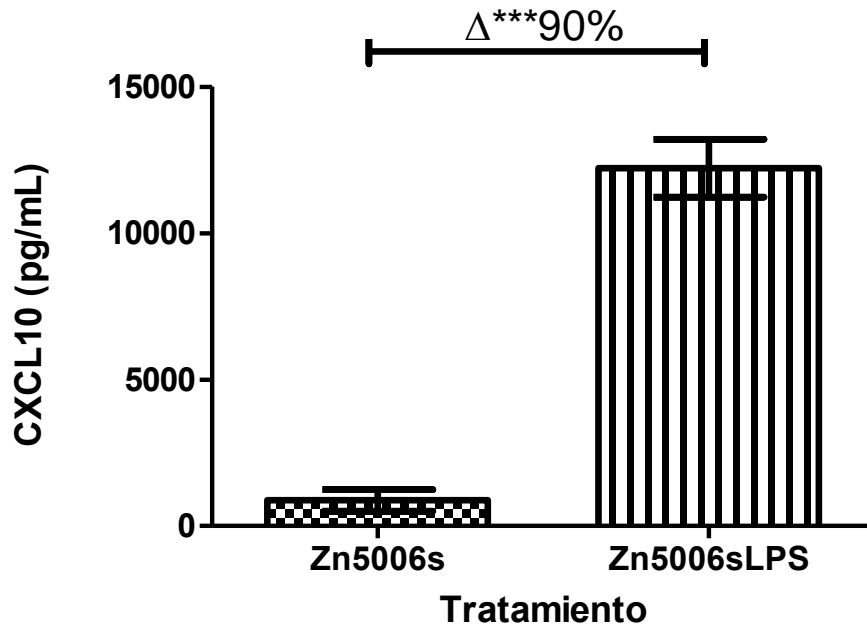


Figura 11. Resultados de la concentración de CXCL10 obtenidos de animales suplementados con Zn500 durante 6 semanas sin y estimulados con Lipopolisacárido bacteriano (*Escherichia coli* O55:B5; SIGMA CHEM L-2880, St. Louis, MO, USA) en una concentración de 1mg/Kg durante 3 horas. Los resultados fueron procesados con *GradPhad Prism 7.03*. Por la prueba t Student el resultado evidencia un aumento en la concentración de CXCL10 con respecto al testigo del 90% con $P < 0.05$.

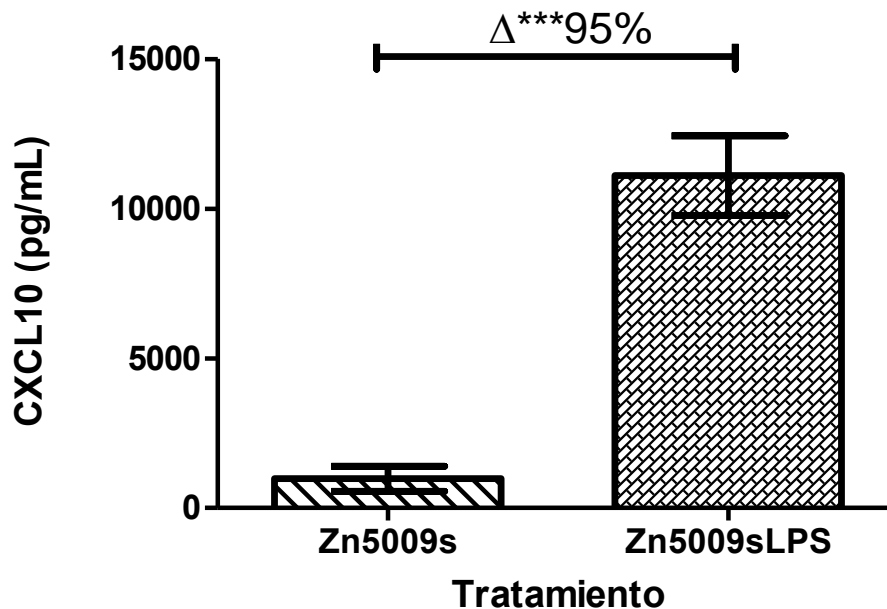


Figura 12. Resultados de la concentración de CXCL10 obtenidos de animales suplementados con Zn500 durante 9 semanas sin y con estimulación con Lipopolisacárido bacteriano (*Escherichia coli* O55:B5; SIGMA CHEM L-2880, St. Louis, MO, USA) en una concentración de 1mg/Kg durante 3 horas. Los resultados fueron procesados con *GradPhad Prism 7.03*. Por la prueba t Student el resultado evidencia un aumento en la concentración de CXCL10 con respecto al testigo del 95% con $P < 0.05$.

Las figuras que se presentan a continuación hacen evidente las diferencias del comportamiento de la quimiocina CXCL10 en condiciones fisiológicas, cuando se ha recibido una suplementación con zinc durante 6 y 9 semanas, repectivamente, y cuando se presenta infección *in vivo*.

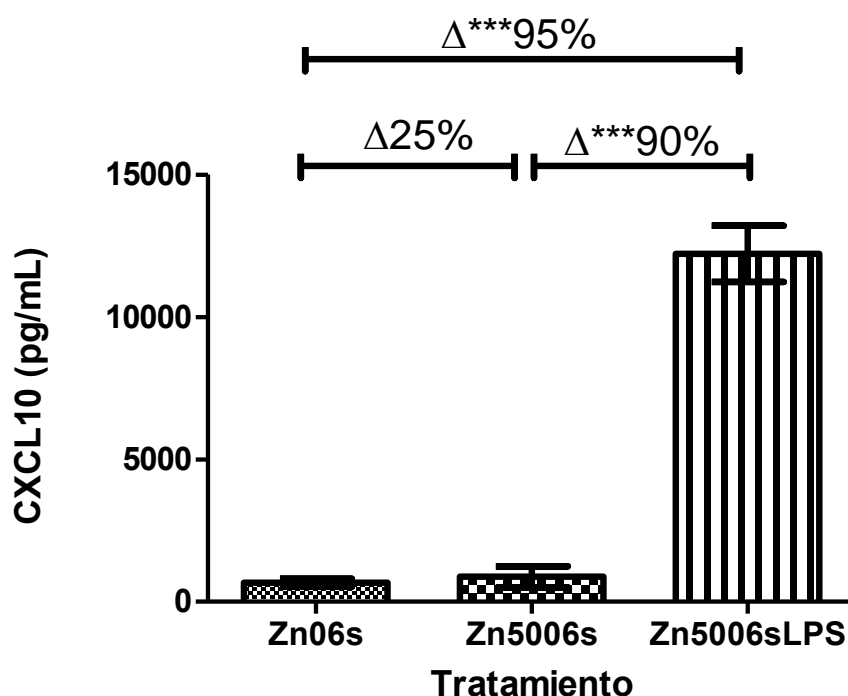


Figura 13. Resultados de la concentración de CXCL10 obtenidos en ausencia y presencia de la suplementación con zinc a las 6 semanas sin y con estimulación con Lipopolisacárido bacteriano (*Escherichia coli* O55:B5; SIGMA CHEM L-2880, St. Louis, MO, USA) en una concentración de 1mg/Kg durante 3 horas. Los resultados fueron procesados con *GradPhad Prism 7.03*. El resultado evidencia un aumento en la concentración de CXCL10 con respecto al testigo del 90% con $P < 0.05$.

Los resultados de la figura 13 se muestran en la siguiente tabla:

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN MEDIA DE LA QUIMIOCINA CXCL10 (pg/mL)
Zn 0µg/mL de 6 semanas sin estimulación con LPS	670
Zn 500µg/mL de 6 semanas sin estimulación con LPS	870
Zn 500µg/mL de 6 semanas con estimulación con LPS	12,200

Tabla I. Valores obtenidos de la concentración de la quimiocina CXCL10 de 3 grupos con tratamientos diferentes.

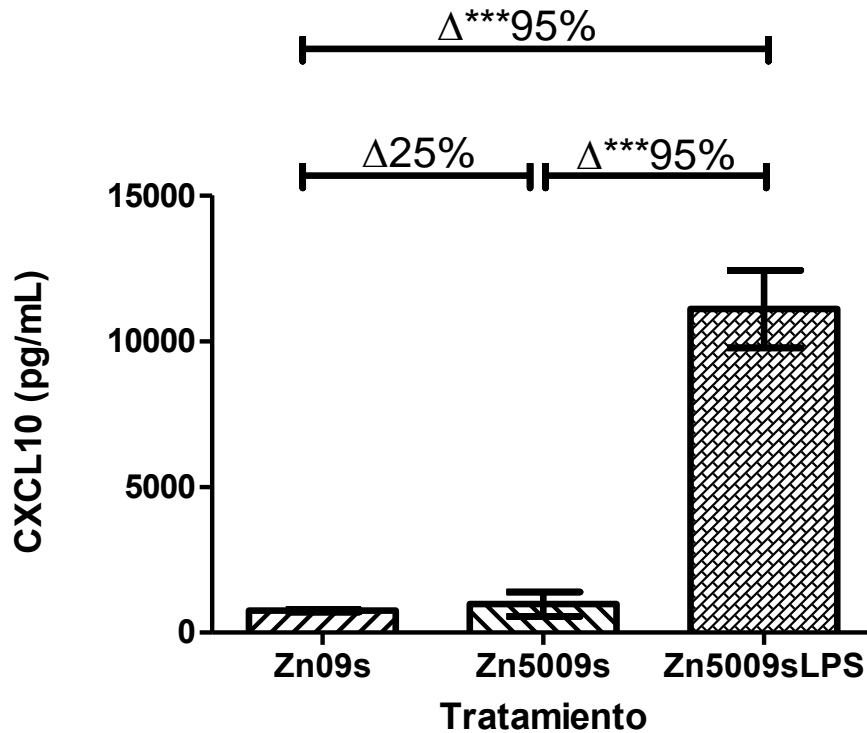


Figura 14. Resultados de la concentración de CXCL10 obtenidos en ausencia y presencia de la suplementación con zinc a las 9 semanas sin y con estimulación con Lipopolisacárido bacteriano (*Escherichia coli* O55:B5; SIGMA CHEM L-2880, St. Louis, MO, USA) en una concentración de 1mg/Kg durante 3 horas. Los resultados fueron procesados con *GradPhad Prism 7.03*. y el resultado evidencia un aumento en la concentración de CXCL10 con respecto al testigo del 90% con $P < 0.05$.

Los resultados de la figura 14 se muestran en la siguiente tabla:

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN MEDIA DE LA QUIMIOCINA CXCL10 (pg/mL)
Zn 0µg/mL de 9 semanas sin estimulación con LPS	750
Zn 500µg/mL de 9 semanas sin estimulación con LPS	970
Zn 500µg/mL de 9 semanas con estimulación con LPS	11,100

Tabla II. Valores obtenidos de la concentración de la quimiocina CXCL10 de 3 grupos con tratamientos diferentes.

5. DISCUSIÓN

La inflamación es el proceso que se lleva a cabo cuando algún patógeno ingresa al organismo, logra evadir su reconocimiento por el sistema inmunológico y provoca un daño a células y tejidos. Tiene 4 características principales: calor, rubor, tumor y dolor, y es mediante la inflamación que se logra llevar a cabo el reclutamiento de células del sistema inmune hacia el sitio en donde se está provocando la agresión por dicho patógeno. La respuesta inflamatoria aguda se inicia tras la detección de infecciones microbianas, con el propósito de proteger al huésped de un daño tisular (Foster M y Samman S 2012).

El lipopolisacárido (LPS) administrado en ratones, además de ser cuantificado numéricamente con la expresión de la quimiocina inflamatoria CXCL10, fue también observado en los animales, los cuales mostraron las siguientes características:

- Malestar evidente manifestado por el encorvamiento de los animales.
- Temblor tenue.
- Pelaje erizado.
- Mayor demanda de sueño.

El LPS fue un excelente estimulante de la CXCL10, pues al simular una infección *in vivo* en ratones de la cepa BALB/c AnN de 6 y 9 semanas con LPS (*Escherichia coli* O55:B5; SIGMA CHEM L-2880, St. Louis, MO, USA) por vía intraperitoneal en una dosis de 1mg/Kg en ratones BALB/c AnN, la concentración de CXCL10 aumentó más de 12 veces su producción fisiológica como se muestra en las figuras 9-12 de resultados.

Al realizar la cinética de estimulación con Lipopolisacárido, en los resultados obtenidos en este trabajo se puede observar que tras la primera hora de haber administrado el LPS, no existe un aumento en la concentración de la quimiocina CXCL10 en suero con respecto al testigo, sin embargo, a partir de la segunda hora la CXCL10 comienza a estimularse exitosamente, hasta que a la tercera hora se observa su pico de mayor producción. Después de alcanzar su punto máximo de estimulación a las 3 horas, las concentraciones de la quimiocina comienzan a disminuir a partir de las 4 horas y continúa disminuyendo a las 5 y 6 horas, aunque a estos tiempos aún no se encuentra en su estado basal como se muestra en la figura 1.

El grupo de Lang S. en 2016 estudió la participación de CXCL10 en la contribución a la fisiopatología del síndrome de dificultad aguda respiratoria (conocida por sus siglas en inglés como ARDS) al inducir la enfermedad cuando se administra LPS, (*Escherichia coli* O111:B4; Sigma, St. Louis, MO, USA) por vía intratraqueal en una dosis de 2mg/kg en ratas macho Wistar con un peso de 180-220g. Posteriormente obtuvo muestras de suero de las ratas, y cuantificó la producción de la quimiocina a las 2, 6 y 12 horas mediante un ELISA (MyBioSource). Los resultados de Lang S. indicaron que el tiempo óptimo de estimulación en el modelo experimental utilizado fue a las 12 horas, pues la quimiocina tuvo un incremento evidente del 90% con respecto al testigo.

En el año 2008 el grupo de Danesh A *et al.* estimuló *in vitro* células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de hurones Fitch macho de seis meses de edad que pesaban de 800-1000g, con LPS (0.1mg/mL) durante 1, 2, 4, 8 y 16 horas. Utilizando los cebadores específicos para el gen CXCL10 de

hurón, cuantificó mediante PCR la expresión de mRNA y encontró que el tiempo óptimo de estimulación fue a las 2 horas obteniendo un incremento de 60 veces la producción del grupo testigo.

Los resultados obtenidos en el Laboratorio de Investigación en Inmunología son comparables con los obtenidos por Lang S. *et al* y Danesh A. *et al.*, pues a pesar de haber trabajado con un modelo experimental diferente y administrado diferentes dosis de LPS se obtuvieron resultados semejantes ya que los estudios demuestran que el LPS es un excelente estimulante si se requiere cuantificar la CXCL10 como se observa en las figuras 11 y 12 de resultados, debido a que la quimiocina se regula transcripcionalmente en respuesta a éste estímulo, y desde tiempos cortos (de 2 a 3 horas) se comienza a elevar su expresión. CXCL10 al ser una quimiocina pro-inflamatoria, lleva a cabo su expresión por la vía dependiente de MyD88 para finalmente translocar a NF- κ B y efectuar la transcripción del gen de la CXCL10 al ser estimulada con LPS.

El grupo de Ebaid H. *et al* en 2014 también logran observar la relación que tiene el zinc en la expresión de la quimiocina CXCL10. Realizaron un diseño experimental para observar la capacidad proliferativa del zinc en ratas que presentaban daño por un tratamiento previo con cadmio. Debido a que la quimiocina CXCL10 es una proteína de bajo peso molecular que participa en el tráfico de linfocitos en el proceso inflamatorio cuando se presenta algún tipo de patogénesis, el grupo de Ebaid decide cuantificar la expresión de CXCL10 a nivel mRNA mediante RT-PCR. Lo que se observa de los resultados que obtiene, con 95% de intervalo de confianza, es que el zinc logra aumentar significativamente la intensidad de las bandas obtenidas en RT-PCR con respecto al grupo testigo. En el Laboratorio de Investigación en Inmunología

también obtuvimos un aumento de CXCL10, a diferencia del grupo de Ebaid H. *et al*, fue cuantificada su expresión a nivel proteína. A pesar de ser cuantificada el incremento de CXCL10 en diferentes niveles de expresión, ambos resultados son similares pues el zinc aumento la producción de la quimiocina en estudio.

En el laboratorio de investigación en inmunología, Ramírez J. en 2008 también desarrolló un trabajo que relaciona la respuesta orientada a Th1, haciendo un estudio de los efectos de la suplementación con zinc en la expresión génica del IFN- γ en linfocitos murinos esplénicos. Lo que encontró fue que el zinc favorece la expresión del IFN- γ en etapas perinatales de ratones de la cepa BALB/c AnN, observando un mayor efecto cuando el tiempo de exposición al zinc era más prolongado, es decir, el zinc incrementó en una proporción mayor a las 9 semanas de tratamiento, que a las 6 semanas. El trabajo de Ramírez J. está estrechamente relacionado con el estudio de la quimiocina CXCL10 pues se sabe que el IFN- γ estimula la producción de nuestra quimiocina de interés, y ambas son moléculas que están relacionadas con la orientación a la respuesta Th1.

Sánchez M. y Eguiarte F. también en el laboratorio de investigación en inmunología en 2013 realizaron estudio de la respuesta orientada Th17 *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. Mediante el estudio de la IL-17 ambos encontraron que el zinc disminuye la producción de esta interleucina.

El actual estudio y los realizados previamente en el laboratorio de inmunología se ha demuestran que la suplementación con zinc ayuda a favorecer la orientación a la respuesta Th1 y suprime la respuesta Th17.

Se puede deducir que la suplementación con zinc en roedores está favoreciendo la producción de CXCL10 y ésta a su vez, favorece la señalización entre las diferentes células del sistema inmune para poder actuar en el organismo cada que se desarrolle una respuesta inflamatoria.

La homeostasis de los micronutrientos es un factor clave para mantener un sistema inmunológico saludable. El zinc es esencial en la regulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas y participa también en el control de la oxidación, en la regulación de las citocinas inflamatorias y en la modulación de los procesos apoptóticos e inflamatorios (Gammoh NZ y Rink L 2017).

El estado nutricional de la población es actualmente uno de los temas de mayor relevancia a nivel mundial, las personas sanas actualmente se cuestionan acerca de si la ingesta de cualquier suplemento que incluya vitaminas o minerales es adecuada o puede generar un riesgo potencial en la salud e incluso se sabe que los estadounidenses gastan miles de millones de dólares en varios de estos suplementos (Brewer G.J. y Prasad AS 2014).

El National Eye Institute determinó que la suplementación con zinc resulta muy útil en personas de 60-65 años de edad o mayores, debido a que ingieren menos del 50% de la cantidad diaria recomendada, ya sea por alteraciones en la absorción intestinal, por una masticación inadecuada o por interacciones con fármacos. La ingesta de suplementos que contengan zinc puede ayudar a contrarrestar las alteraciones inmunitarias en los ancianos y favorecer un envejecimiento saludable (Mocchegiani E *et al.* 2013) (Prasad AS *et al.* 2011).

Se sabe que en el reino unido, alrededor de 37,000 pacientes mueren de una sepsis grave, que se caracteriza por presentar una respuesta inflamatoria

sistémica, desregulada y exagerada que está acompañada del estrés oxidativo. La ingesta de suplementos de zinc ayudan a contrarrestar el estrés oxidativo y las respuestas inflamatorias en los pacientes con sepsis (Mertens K *et al.* 2015).

Está claro que incluso una leve deficiencia de zinc en los seres humanos afecta las funciones inmunológicas, clínicas y bioquímicas, y se debe hacer conciencia en la población de no exceder el consumo y el tiempo de exposición a estos productos para no alterar el estado osmótico de zinc en la célula (Prasad AS 2008)

6. CONCLUSIONES

- Se logró evaluar la concentración de la quimiocina CXCL10 en suero de ratones gracias a la estandarización del ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo en ratones BALB/c suplementados con zinc
- Se encontró que el zinc aumenta en un 25% la cantidad de CXCL10 producida en el modelo murino en los tratamientos con duración de 6 y 9 semanas
- El tiempo óptimo de estimulación con LPS es a las 3 horas en el cual se logra aumentar más de 12 veces la producción fisiológica de CXCL10
- El incremento de CXCL10 se observa también en muestras estimuladas con Lipopolisacárido bacteriano en los grupos tratados con Zn500 respecto al testigo Zn0 en una proporción del 5%
- Se logró determinar que existe un aumento significativo del 95% en las muestras de ratones sanos frente a los animales en los que se simuló una infección con Lipopolisacárido bacteriano
- Los resultados indican que la alimentación influye directamente en el buen funcionamiento del organismo y de la respuesta inmune, pues todos los oligoelementos, entre ellos el zinc, son esenciales y se requieren en las cantidades adecuadas

BIBLIOGRAFÍA

- Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Ferrannini E, Fallahi P. CXCR3, CXCL10 and type 1 diabetes. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. **2014** 25:57-65
- Antonelli A, Ferrari SM, Giuggioli D, Ferrannini E, Ferri C, Fallahi P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. **2014** 13:272-280
- Boyé K, Billottet C, Pujol N, Alves ID, Bikfalvi A. Ligand activation induces different conformational changes in CXCR3 receptor isoforms as evidenced by plasmon waveguide resonance (PWR). *Scientific Reports*. **2017** 7: 10703
- Brewer GJ, Prasad AS. Supplements: To Take or Not to Take? That Is the Question. *Journal of the American College of Nutrition*. **2014** 33:3, 185-185
- Colvin RA, Campanella GSV, Manice LA, Luster AD. CXCR3 Requires Tyrosine Sulfation for Ligand Binding and a Second Extracellular Loop Arginine Residue for Ligand-Induced Chemotaxis. *Molecular and Cellular Biology*. **2006** 5838-5849
- Costarelli L et al. Effects of zinc-fortified drinking skim milk (as functional food) on cytokine release and thymic hormone activity in very old persons: a pilot study. *American Aging Association* **2014**
- Czaja AJ. Review article: chemokines as orchestrators of autoimmune hepatitis and potential therapeutic targets. *Aliment Pharmacol Ther*. **2014**; 40: 261–279
- Dabiri S, Kariminik A, Kennedy D. The role of CXCR3 and its ligands in renal transplant outcome. *Eur. Cytokine Netw*. **2016**; 27(2): 16-22
- Danesh A, Seneviratne C, Cameron CM, Banner D, Devries ME, Kelvin AA, Xu L, Ran L, Bosinger SE, Rowe T, Czub M, Jonsson CB, Cameron MJ, Kelvin DJ. Cloning, expression, and characterization of ferret CXCL10. *Molecular Immunology*. **2008** 45:1288-1297
- Dhillon NK, Peng F, Ransohoff RM, Buch S. PDGF Synergistically Enhances IFN- γ Induced Expression of CXCL10 in Blood-Derived Macrophages: Implications for HIV Dementia. *The Journal of Immunology*. **2007** ; 179:2722-2730
- Ebaid H., Hassan I., Bashandy S., Abu Taha N., Mahmood A., Alomar S., Alhazza I., Mashaly A., Rady A. Zinc improves the immune function and the proliferation of lymphocytes in Cadmium-treated rats. *Central European Journal of Immunology* **2014**; 39 (4): 441-448
- Echeverri NP, Mockus I. Factor nuclear κ B (NF- κ B): Signalosoma y su importancia en enfermedades inflamatorias y cáncer. *Rev. Fac. Med* **2008** Vol. 56 No. 2

- Eguiarte F. Efectos del exceso de zinc in vitro sobre la producción de la Interleucina 17. Facultad de Química, UNAM **2013**
- Ferrari SM, Ruffilli I, Colaci M, Antonelli A, Ferri C, Fallahi P. CXCL10 in psoriasis. *Advances in Medical Sciences*. **2015** 349-354
- Foster M, Samman S. Zinc and Regulation of Inflammatory Cytokines: Implications for Cardiometabolic Disease. *Nutrients* **2012**, 4, 676-694
- Fraker PJ y King LE. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* **2004** 24:277–98
- Gammoh NZ, Rink L. Zinc in Infection and Inflammation. *Nutrients*. **2017**, 9, 624
- García-Barreno P. Inflamación. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, **2008**; 10
- Giacconi R et al. Effect of ZIP2 Gln/Arg/Leu (rs2234632) polymorphism on zinc homeostasis and inflammatory response following zinc supplementation. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. **2015** 4:6, 414–423
- Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol.* **2011** ; 89(2):
- Holdren GO, Rosenthal DJ, Yang J, Bates AM, Fischer CL, Zhang Y, Brogden NK, Brogden KA. Antimicrobial Activity of Chemokine CXCL10 for Dermal and Oral Microorganisms. *Antibiotics (Basel)*. **2014** 23; 3(4): 527–539
- Jansen J, Rosenkranz E, Overbeck S, Warmuth S, Mocchegiani E, Giacconi R, Weiskirchen R, Karges W, Rink L. Disturbed zinc homeostasis in diabetic patients by in vitro and in vivo analysis of insulinomimetic activity of zinc. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23 **2012** 1458–1466
- Kimura T, Kambe T. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 336
- Lang S, Li L, Wang X, Sun J, Xue X, Xiao Y, et al. CXCL10/IP-10 Neutralization Can Ameliorate Lipopolysaccharide-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome in Rats. *PLoS ONE*. **2017** 12(1): e0169100
- Lee EY, Lee ZH, Song YW. The interaction between CXCL10 and cytokines in chronic inflammatory arthritis. *Autoimmunity Reviews*. **2013** 12: 554-557
- Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, Stiles JK. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. **2011** 121-130

- Liu M, Guo S, Stiles JK. The emerging role of CXCL10 in cancer (Review). *ONCOLOGY LETTERS*. **2011** 2: 583-589
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. **2008** 42: 145-151
- Ma B, Khazali A, Wells A. CXCR3 in Carcinoma Progression. *Histol Histopathol*. **2015** ; 30(7): 781–792
- Manwaring HR, Bligh HFJ, Yadav R. The Challenges and Opportunities Associated with Biofortification of Pearl Millet (*Pennisetum glaucum*) with Elevated Levels of Grain Iron and Zinc. *Front. Plant Sci*. **2016** 7:1944.
- Mehla R, Guha D, Ayyavoo V. Chemokine Deregulation in HIV Infection: Role of Interferon Gamma Induced Th1-Chemokine Signaling. *J Clin Cell Immunol*. **2012** S7:004
- Mertens K, Lowes DA, Webster NR, Talib J, Hall L, Davies MJ, Beattie JH, Galley HF. Low zinc and selenium concentrations in sepsis are associated with oxidative damage and inflammation. *British Journal of Anaesthesia*. **2015** 114 (6): 990–99
- Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi L, Piacenza F, Basso A, Malavolta M. Micronutrient (Zn, Cu, Fe)-gene interactions in ageing inflammatory age-related diseases: Implications for treatments. *Ageing. Research Reviews* **2012** 297– 319
- Mocchegiani E, Romeo J, Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Diaz LE, Marcos A. Zinc: dietary intake and impact of supplementation on immune function in elderly. *AGE* **2013** 35:839–860
- O' Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem.J*. **2008** 409,635–649
- Plum LM, Rink L, Haase H. The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. **2010** 7, 1342-1365
- Prasad AS. Zinc in Human Health: Effect of Zinc on Immune Cells. *MOL MED*. **2008** 14(5-6)353-357
- Prasad AS, Beck FWJ, Snell DC, Kucuk O. Zinc in Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*. **2009** , 61:6, 879-887
- Prasad AS, Bao B, Beck FWJ, Sarkar FH. Zinc-suppressed inflammatory cytokines by induction of-A20 mediated inhibition of nuclear factor- κ B. *Nutrition*. **2011** 27:816-823

- Ramírez JA. Influencia del zinc en la respuesta Th1. Estudio molecular del IFN- γ . Facultad de Química, UNAM, **2008**
- Romagnani P, Crescioli C. CXCL10: A candidate biomarker in transplantation. Clinica Chimica Acta. **2012** 413:1364-1373
- Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, Romagnani S. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. TRENDS in Immunology. **2004** Vol.25 No.4
- Sánchez MTC. Efecto de la suplementación con zinc en la producción de IL-17. Facultad de Química UNAM, **2013**
- Singh AK, Arya RK, Trivedi AK, Sanyal S, Baral R, Dormond O, Briscoe DM, Datta D. Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. Cytokine Growth Factor Rev. **2013** F ; 24(1): 41–49
- Van den Borne P, Quax PHA, Hoefler IE, Pasterkamp G. The Multifaceted Functions of CXCL10 in Cardiovascular Disease. BioMed Research International. **2014** 893106
- Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. Cytokine & Growth Factor Reviews. **2015** **26**:311-327
- Vaquero-Raya EC, Molero-Richard X. Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas:¿una posible diana terapéutica?. Gastroenterol Hepatol. **2005**;28(8):473-84
- Vazirinejad R, Ahmadi Z, Arababadi MK, Hassanshahi G, Kennedy D. The Biological Functions, Structure and Sources of CXCL10 and Its Outstanding Part in the Pathophysiology of Multiple Sclerosis. NeuroImmunoModulation. **2014**;21:322–330
- Xia JB, Mao CZ, Chen ZY, Liu GH, Wu HY, Zhou DC, Park KS, Zhao H, Kim SK, Cai DQ, Qi XF. The CXCL10/CXCR3 axis promotes cardiac microvascular endothelial cell migration via the p38/FAK pathway in a proliferation-independent manner. Experimental and Molecular Pathology. **2016** 100:257-265
- Xu Z, Zhang X, Lau J, Yu J. C-X-C motif chemokine 10 in non-alcoholic steatohepatitis: role as a pro-inflammatory factor and clinical implication. Expert Reviews in Molecular Medicine. **2016** 18:16;1-11

ANEXO I. ABREVIATURAS

ANOVA del inglés analysis of variance

ARDS del inglés acute respiratory distress síndrome

CD del inglés dendritic cell

CXCL10 del inglés C-X-C motif chemokine 10

DNA del inglés desoxiribonucleic acid

ELISA del inglés enzyme -linked immunoabsorbent assay

HAD del inglés HIV-associated dementia

IFN- γ del inglés interferon gamma

IP-10 del inglés interferon gamma-induced protein 10

ITAC del inglés interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant

LPS del inglés lipopolysaccharide

MAPK del inglés mitogen-activated protein kinase

MIP del inglés macrophage inflammatory protein

MYD88 del inglés myeloid differentiation primary response 88

NF-KB del inglés nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK del inglés natural killer

PBS del inglés phosphate buffer saline

PCR del inglés polymerase chain reaction

PDGF del inglés platelet derived growth factor

PF4 del inglés platelet factor 4

pI del inglés isoelectric point

RDA del inglés recommended dietary allowance

RNA del inglés ribonucleic acid

ROS del inglés reactive oxygen species

TCR del inglés T cell receptor

TLR del inglés Toll-like receptor

TNF del inglés tumor necrosis factor

TRIF del inglés TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

VIH del inglés human immunodeficiency virus

ZIP del inglés Zrt- and Irt-like protein

ZnT del inglés zinc transporter