



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON ZINC
SOBRE LAS CELULAS PRODUCTORAS
DE IFN-gamma

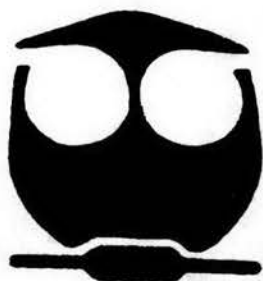
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MIGUEL ALEJANDRO MATURANO CONTRERAS



MEXICO, D.F.



2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

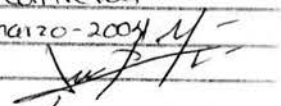
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Miguel Alejandro

Maturano Contreras

FECHA: 10-marzo-2004

FIRMA: 

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. Maria Dolores Lastra Azpilicueta

Vocal: Prof. Raquel Ortega Muñoz

Secretario: Prof. Maria Elena Ibarra Rubio

1er suplente: Prof. Monica Berenice Heras Chavarria

2do suplente: Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química. U.N.A.M.

Asesor del tema:

Prof. María Dolores Lastra Azpilicueta



Supervisor Técnico:

Prof. Ana Esther Aguilar Cárdenas



Sustentante:

Miguel Alejandro Maturano Contreras



CONTENIDO

Abreviaturas.....	i
Relación de tablas y figuras.....	ii
Resumen.....	iv
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 El zinc.....	2
2.2 El interferón gamma.....	12
3. Hipótesis del estudio.....	23
4. Objetivos.....	24
5. Material y métodos.....	25
6. Resultados.....	32
7. Discusión.....	45
8. Conclusiones.....	50
Referencias.....	51

ABREVIATURAS

ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
ARNm.....	Ácido ribonucleico mensajero
DAG.....	Diacilglicerol
GAF.....	Factor de activación del interferón gamma
GAS.....	Sitio activado por el interferón gamma
HLA-A, B, C, DR.....	Antígeno leucocitario humano A, B, C, DR
ICAM-1.....	Molécula de adhesión intracelular tipo 1
IFN- γ	interferón gamma
IFNGR1.....	interferón gamma receptor 1
IFNGR2.....	interferón gamma receptor 2
IFN-I, II.....	interferón tipo I, II
IL-1, 2, 4, 6, 10, 12, 18.....	Interleucina 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18
IP ₃	Inositol trifosfato
JAK1, 2.....	Proteína tirosina cinasa Janus 1, 2
MHC-I, II.....	Molécula del complejo mayor de histocompatibilidad I, II
NFAT.....	Factor nuclear activado por las células T
NF- κ B.....	Factor nuclear κ B
NK.....	Células asesinas naturales
PIP ₂	Fosfatidil inositol bifosfato
PKC.....	Proteína cinasa C
PLC- γ	Fosfolipasa C-gamma
PMA.....	Forbol miristato acetato
STAT1, 2, 4.....	Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción
TCR.....	Receptor de células T
Th1.....	Linfocito T cooperador, subpoblación tipo 1
Th2.....	Linfocito T cooperador, subpoblación tipo 2
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
ZnT.....	Proteína transportadora de zinc

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

- Tabla 1.** Algunas proteínas inducidas por los interferones, pág. 13
- Tabla 2.** Grupos experimentales, pág. 26
- Figura 1.** Sistema JAK-STAT, pág. 16
- Figura 2.** Respuesta Th1 y producción de interferón gamma, pág. 20
- Figura 3.** Estimulación de la producción de interferón gamma, pág. 22
- Figura 4.** Placa ELISpot, pág. 29
- Figura 5.** ELISpot, pág. 31
- Figura 6a y 6b.** Pozo de ELISpot con células de ratones (6s, -Zn, PMA) y (6s, +Zn, PMA), pág. 36
- Gráfica 1.** Efecto del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma (6 semanas de tratamiento), pág. 32
- Gráfica 2.** Efecto del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma (9 semanas de tratamiento), pág. 33
- Gráfica 3.** Efecto del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma (6 semanas de tratamiento), estimuladas con PMA, pág. 34
- Gráfica 4.** Efecto del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma (9 semanas de tratamiento), estimuladas con PMA, pág. 35
- Gráfica 5.** Efecto del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma (6 semanas de tratamiento), estimuladas con ionomicina de calcio, pág. 37
- Gráfica 6.** Efecto del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma (9 semanas de tratamiento), estimuladas con ionomicina de calcio, pág. 38
- Gráfica 7.** Efecto de la suplementación con zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma de ratones tratados durante 6 semanas (gestación y lactancia), pág. 39
- Gráfica 8.** Efecto de la suplementación con zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma de ratones tratados durante 6 semanas (+Zn, 6s: gestación y lactancia), pág. 40

Gráfica 9. Número de células secretoras de interferón gamma de ratones de 6 semanas (-Zn, 6s: gestación y lactancia). pág. 41

Gráfica 10. Efecto de la suplementación con zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma de ratones tratados durante 9 semanas (9s: gestación, lactancia y destete). pág. 42

Gráfica 11. Efecto de la suplementación con zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma de ratones tratados durante 9 semanas (+Zn, 9s: gestación, lactancia y destete). pág. 43

Gráfica 12. Número de células secretoras de interferón gamma de ratones de 9 semanas (-Zn, 9s: gestación, lactancia y destete). pág. 44

RESUMEN

El zinc es un elemento traza importante para el funcionamiento del sistema inmune. La deficiencia de este elemento se asocia con retardo en el crecimiento, depresión de la respuesta de anticuerpos y de la producción de citocinas como el interferón gamma, así como alteración de la función fagocítica. El zinc, también es esencial para los procesos de replicación, transcripción, traducción y en la actividad de muchas enzimas.

El papel del interferón gamma en las respuestas de los organismos ante diferentes agentes patógenos realza la importancia de conocer la influencia que tiene la suplementación con zinc sobre la producción de esta citocina en las etapas perinatales, en las cuales se sabe que los individuos son más susceptibles a contraer una gran variedad de enfermedades infecciosas, sobre todo en un país como México, en el que la biodisponibilidad del elemento en la dieta está muy limitada.

Este trabajo forma parte de una investigación extensa de los efectos de la suplementación con zinc en las diferentes funciones del sistema inmune; el objetivo fue evaluar los efectos de la suplementación oral con zinc sobre el número de células productoras de interferón gamma en un modelo experimental murino, durante las etapas perinatales, para lo cual, se formaron cuatro grupos experimentales: el grupo I suplementado con zinc durante la gestación y la lactancia (6 semanas de tratamiento: 6s) (+Zn, 6s), y el grupo II suplementado con zinc durante la gestación, la lactancia y el destete (9 semanas de tratamiento: 9s) (+Zn, 9s), con sus respectivos grupos testigos (-Zn, 6s; -Zn, 9s). Se determinó el número de células productoras de interferón gamma mediante un ensayo inmunoenzimático ELISpot, con la finalidad de mimetizar la activación de las células T se utilizaron *in vitro* los estimulantes forbol miristato acetato (PMA) e ionomicina de calcio (I).

En ratones suplementados con zinc durante 6 semanas (+Zn, 6s) se observó un incremento en el número de células secretoras de interferón gamma, en comparación con sus testigos (-Zn, 6s); los ratones suplementados durante 9 semanas (+Zn, 9s) no muestran dicha tendencia.

También se observó un incremento significativo en el número de células secretoras de interferón gamma en ratones suplementados durante 6 semanas cuyas células fueron estimuladas *in vitro* con PMA (+Zn, 6s, PMA) en comparación con sus testigos (-Zn, 6s, PMA). Se observó la misma tendencia en ratones suplementados durante 9 semanas (+Zn, 9s, PMA).

En ratones suplementados durante 6 semanas cuyas células fueron estimuladas *in vitro* con ionomicina de calcio (+Zn, 6s, I) se observó un incremento en el número de células secretoras de interferón gamma en comparación con sus testigos (-Zn, 6s, I). Los ratones suplementados durante 9 semanas (+Zn, 9s, I) no muestran dicha tendencia.

Las células que producen estos resultados sugieren que la suplementación oral con zinc, puede modular a las células que producen interferón gamma en las etapas perinatales de manera dependiente al tiempo de suplementación.

1. Introducción

El zinc es un elemento muy importante en el desarrollo de los individuos; forma parte de un gran número de proteínas por lo que sus niveles en el organismo afectan diversos procesos celulares ⁽¹⁾.

La deficiencia moderada de zinc afecta de manera importante el estado inmunológico; estudios anteriores han mostrado una disminución en la producción de anticuerpos así como de diversas citocinas, lo que puede alterar la capacidad de respuesta ante agentes extraños ^(1, 10).

En las etapas perinatales dicha deficiencia adquiere una mayor importancia, pues el individuo en desarrollo requiere de grandes cantidades de zinc que le son proporcionados por la madre ⁽⁷⁾.

El interferón gamma es una citocina clave en el desarrollo de una respuesta inmune de tipo celular Th1, una alteración en la producción de dicha proteína durante las primeras etapas de la vida puede acarrear un serio problema en los individuos al no disponer de un sistema inmune maduro ⁽¹⁰⁾.

En nuestro país se sabe que una gran parte de la población infantil presenta retardo en el crecimiento, así como una alta incidencia de enfermedades infecciosas, lo que ha llevado a inferir que una causa sea una baja ingesta de zinc aunado a la deficiencia de otros micronutrientes esenciales para el desarrollo ⁽³⁹⁾.

2. Antecedentes

2.1 El zinc

El zinc es un metal divalente utilizado ampliamente por los sistemas biológicos, no obstante su baja biodisponibilidad en la corteza terrestre. Dos propiedades del zinc lo hacen un elemento muy destacado en los organismos. Primero, los mecanismos homeostáticos que regulan su absorción, distribución y excreción son muy eficientes; no se conocen desórdenes asociados con la acumulación excesiva de este metal a diferencia del hierro, cobre y otros metales, lo que hace del zinc un elemento virtualmente no tóxico. Segundo, sus propiedades físicas y químicas incluyendo la asociación estable que forma con las macromoléculas lo hacen formar parte de un gran número de proteínas, por lo tanto, participa en numerosos procesos como la replicación y la transcripción. Además, participa en el mantenimiento de la integridad de las histonas (proteínas íntimamente ligadas con el ADN), interviene en el metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos, razón por la cuál desempeña un papel fundamental en el crecimiento celular ^(1, 2, 3, 4).

Bajo condiciones fisiológicas no sufre oxidaciones o reducciones; tiene una gran adaptabilidad para asumir diferentes geometrías de coordinación, forma complejos principalmente con cuatro ligandos en arreglos tetraédricos. Se le encuentra como cofactor enzimático, o bien, formando complejos con otras proteínas como las metalotioneínas y los factores de transcripción; destaca por ser un ion estructural de las membranas biológicas ^(1, 2, 5).

Los requerimientos de zinc varían en función de la edad, género, de la etapa de crecimiento, así como de las pérdidas del elemento. Un adulto normal requiere de 10 a 15mg de zinc en la dieta diaria, mientras que una mujer en gestación requiere de 20 a 25mg de zinc por día para compensar las necesidades del feto en crecimiento ⁽¹⁾.

Los alimentos de origen animal, particularmente las carnes, los mariscos y el pescado, son fuentes ricas en zinc y su biodisponibilidad es alta, ya que durante su digestión se liberan péptidos que contienen lisina y que forman complejos solubles con el zinc ⁽¹⁾. La biodisponibilidad del elemento en la dieta también está influenciada por otros factores como son: la edad, género, estado fisiológico y la coexistencia de condiciones patológicas en el individuo ⁽⁶⁾.

El zinc, se absorbe en el yeyuno e íleon; la presencia de glucosa y proteínas de origen animal en el lumen intestinal asiste dicha absorción, en cambio, el calcio, ácido fítico y otros compuestos la retrasan considerablemente. Las metalotioneínas y otras proteínas intestinales como los recién caracterizados transportadores de zinc (ZnT) juegan un papel muy importante en la absorción del elemento ^(1, 4, 7, 8, 9).

El contenido normal de zinc en el plasma en humanos es de aproximadamente 1µg/mL, lo que representa menos del 1% del contenido de zinc en el organismo; en el plasma cerca del 30% del total de zinc se encuentra estrechamente unido a proteínas como la alfa-2-macroglobulina, o bien, a residuos de histidina y cisteína; el 70% restante se encuentra débilmente unido a la albúmina la cual constituye el mayor transportador de zinc intercambiable ^(1, 9).

Alrededor del 99% del zinc corporal es intracelular (2-3 g en un hombre de 70 kg); la mayoría de los tejidos contienen entre 10 y 200 µg de zinc/g de peso seco, sin embargo, los ojos, la próstata, las secreciones prostáticas y el esperma contienen cantidades mayores de zinc. A diferencia del hierro y el calcio, no se conocen sitios específicos de almacenamiento para el zinc ⁽¹⁾.

El organismo pierde zinc a través de los intestinos, vesícula biliar, páncreas, riñones y piel ⁽¹⁾. Está involucrado en procesos como la espermatogénesis, así como en la estabilización de la estructura cuaternaria de la cromatina en el esperma antes de la fertilización con lo que preserva la integridad genómica; al parecer está involucrado en la fertilización del óvulo; es crítico en el funcionamiento de los receptores hormonales; en la retina forma parte de varias enzimas como la retinol deshidrogenasa involucrada en el metabolismo de los pigmentos de la misma ⁽¹⁾.

La deficiencia de zinc es el síndrome más significativo en el metabolismo de los metales, puede ser debida a una disminución de la ingestión, a una baja biodisponibilidad del elemento en la dieta, a un incremento en las necesidades y requerimientos del organismo y en la excreción, a factores genéticos, o bien, puede ser condicionada al consumo de otros nutrimentos ^(1, 2, 7).

La deficiencia de zinc en humanos, se describió por primera vez en Egipto en los años sesenta en comunidades extremadamente pobres, cuya dieta era rica en ácido fólico, legumbres y pan, en cambio, era carente de proteínas de origen animal; los individuos afectados eran principalmente adolescentes del sexo masculino que mostraban retraso en el crecimiento y en la maduración sexual, letargia, anemia y hepatoesplenomegalia; la anemia se corrigió con suplementos de hierro mientras que las demás patologías sólo fueron reversibles con la administración de suplementos de zinc ^(1, 2).

También en la acrodermatitis enteropática (una enfermedad genética que afecta la asimilación del zinc), se han estudiado los efectos de la deficiencia de dicho elemento, entre los síntomas figuran: alopecia total y simétrica, dermatitis eritematosa localizada en áreas alrededor de la boca, ojos y extremidades, diarrea, retardo en el crecimiento, así como disturbios emocionales característicos.

También se han observado desórdenes oftálmicos como conjuntivitis, fotofobia y opacidad corneal ^(1, 4, 10).

Se ha observado deficiencia de zinc en enfermos con diarrea crónica asociada a mala absorción, en casos de enteritis regional, así como en pacientes con la enfermedad de Wilson que reciben un tratamiento a base de agentes quelantes como la penicilamina ⁽¹⁾.

Entre los efectos celulares destacan: síntesis anormal de ácidos nucleicos y proteínas, polimerización anormal de la tubulina, defectos en los cromosomas, muerte celular excesiva, así como lipoperoxidación de las membranas celulares ⁽⁷⁾.

En la deficiencia de zinc los tejidos más susceptibles son aquellos que renuevan constantemente sus células combinando los procesos de proliferación y diferenciación como ocurre en la piel, mucosa gastrointestinal y gónadas; el zinc tiene un papel crítico en la fisiología reproductiva en las hembras ⁽¹⁾.

En la actualidad, los casos de deficiencia severa de zinc son raros, sin embargo, la deficiencia moderada se reporta constantemente, aunque es difícil establecer su existencia mediante indicadores bioquímicos, pues las consecuencias funcionales aparecen antes de que los niveles en plasma o en otro tejido se vean disminuidos; los grupos susceptibles son: los niños menores, las mujeres durante el embarazo y la lactancia, así como los ancianos. La deficiencia moderada de zinc se caracteriza por retardo en el crecimiento lineal, disminución en la sensibilidad sensorial (especialmente en la capacidad para detectar sabores), disminución en el apetito, disminución en la respuesta inmune, así como efectos negativos en la función intestinal ^(2, 5, 8).

La deficiencia de zinc en la población mexicana

En México, la contribución de los alimentos de origen animal a la dieta es limitada, en particular en la población rural y en la urbana marginal, cuya dieta se basa principalmente en maíz y frijol con cantidades variables de verduras ⁽³⁹⁾.

Estas dietas presentan concentraciones elevadas de ácido fítico y de fibra que se sabe inhiben la absorción del zinc. El ácido fítico, es la forma principal en la que se almacena el fósforo en los cereales, las leguminosas y las oleaginosas, es el inhibidor más potente de la absorción de zinc, pues forma complejos insolubles a pH fisiológico. Se ha sugerido que las fibras insolubles como la celulosa contribuyen a disminuir la absorción del zinc. Otro nutrimento que se encuentra en grandes cantidades en la dieta del mexicano es el calcio proveniente de la nixtamalización de la tortilla y puede formar complejos Ca:Zn:fitatos, menos solubles que los complejos formados por los minerales solos ^(2, 7, 8, 10, 11, 12).

Una de las evidencias más claras del deterioro del estado nutricional de los niños en México es la alta prevalencia de retraso en el crecimiento, especialmente de un crecimiento lineal, que se muestra como un retraso en la talla para la edad ^(2, 12).

Según la Encuesta Nacional de Nutrición realizada en México en el año 1999, la prevalencia de deficiencia de zinc en niños menores de 2 años de edad alcanza un 33.9% y disminuye progresivamente hasta alcanzar una meseta de 21.4 a 24.4% entre los 5 y 11 años; la prevalencia de deficiencia de zinc es significativamente mayor en los niños de las localidades rurales que en las urbanas en todos los grupos de edad. Los niños menores de 2 años de edad tienen las prevalencias más altas de deficiencia de zinc en todas las regiones estudiadas; la región Norte del país es la que tiene los porcentajes más bajos (5.5% a 14.2%), la región Sur los más altos (20.9% a 51.7%), mientras que en la región Centro son intermedios (19% a 30.6%).

Las mujeres embarazadas que viven en comunidades rurales presentan un porcentaje de prevalencia de deficiencia de zinc de 30.8%, casi cuatro veces mayor que el que presentan las mujeres embarazadas de las comunidades urbanas. Al igual que en los niños, la deficiencia de zinc en mujeres embarazadas aumenta del Norte al Sur del país.

El zinc en las etapas perinatales

Estudios en animales de experimentación y en humanos han mostrado la importancia del zinc durante la gestación; durante esta etapa en humanos se requiere entre el 5 y 7% del total de zinc corporal de una mujer no gestante, lo que corresponde aproximadamente a 100mg de zinc, de este, el 57% se deposita en el feto mientras que 24% lo hace en el músculo uterino. La deficiencia de este elemento puede provocar infertilidad, una labor de parto prolongada (debida a una contracción uterina ineficiente), ruptura prematura de membranas, retardo en el crecimiento intrauterino, pobre desarrollo cognocitivo, efectos teratogénicos, así como muerte del embrión o el feto ^(7, 10, 13, 14).

Las necesidades adicionales de zinc pueden ser satisfechas mediante ajustes en la ingestión del elemento, sin embargo, no se cuenta con evidencia que lo demuestre, por lo tanto la regulación de los mecanismos homeostáticos (que incluyen la absorción intestinal del elemento y su eliminación) puede ser la vía principal que permita satisfacer los requerimientos de zinc. Estudios en animales y humanos sugieren que hay un incremento en la absorción intestinal del elemento durante la gestación que continúa en la lactancia; el incremento de la absorción intestinal de zinc en la lactancia con respecto a la gestación se debe probablemente al incremento en las necesidades del elemento. Por otra parte, durante la lactancia se reducen las pérdidas de zinc en heces y en orina ^(7, 15).

Durante los primeros dos o tres meses de vida los lactantes humanos satisfacen sus necesidades de zinc a partir de la leche materna, en el cuarto y quinto mes la absorción neta del elemento es moderadamente positiva, cubriendo de manera marginal los requerimientos debidos al crecimiento y pérdidas; después del sexto mes, la concentración de zinc disminuye de manera gradual por lo que se requiere de una dieta adicional que permita satisfacer las necesidades del infante ^(11, 16).

Durante los primeros días después del nacimiento se sabe hay una disminución progresiva en los niveles de zinc en suero que se acentúa en los niños con una edad gestacional apropiada pero con bajo peso al nacer, lo que representa los altos requerimientos de zinc por el crecimiento y las bajas concentraciones del elemento disponible en el organismo ⁽¹⁷⁾.

En países en desarrollo como México, el riesgo de desarrollar una deficiencia moderada de zinc es más alto, debido al acceso limitado a productos de origen animal como parte de una dieta complementaria que permita mantener niveles adecuados de zinc en el infante ⁽¹¹⁾.

La suplementación con zinc

Se han llevado a cabo diversos estudios de suplementación con zinc en infantes lactantes de diferentes edades, así como en mujeres gestantes, encontrando resultados contradictorios dependiendo de la población estudiada, de la edad y condiciones de los sujetos de estudio ^(13, 14).

Se ha observado un incremento en el peso al nacer dependiente del tiempo de suplementación, cuando esta inició en el primer trimestre el efecto fue mayor que cuando fue iniciada en el tercer trimestre ^(7, 13, 14).

Destaca también el incremento observado en la circunferencia cefálica de niños de mujeres que recibieron 25 mg de zinc al día, un menor retardo del crecimiento intrauterino, así como una disminución en la incidencia de complicaciones durante el parto ^(2, 7, 13, 14).

Otro estudio en donde suplementaron con 20 mg de zinc/d durante un año a niños pertenecientes a una comunidad rural del Estado de México, que presentaban episodios frecuentes de diarrea, mostró una disminución de los episodios diarreicos en un 35% en comparación con el grupo placebo, sin embargo no afectó la duración de los mismos ⁽²⁾.

En el estado de Morelos se realizó otro estudio en infantes de diferentes edades en donde se comparó el efecto de un suplemento de varios micronutrientes, incluido el zinc, y un suplemento que contenía únicamente zinc, el efecto en el crecimiento fue mayor en el primer caso, con respecto a la edad, observaron un mayor crecimiento en los infantes menores de 12 meses en comparación con los mayores de 12 meses ⁽¹²⁾.

También se ha observado un efecto benéfico en el tratamiento de la hepatitis C utilizando zinc (34mg zinc/d) e interferón alfa; esta enfermedad altera el metabolismo de metales como el zinc provocando una deficiencia del mismo, lo que ocasiona una alteración del balance entre las respuestas Th1 y Th2, se cree que al suministrar el zinc dicha alteración se corrige ⁽³⁾.

En otros estudios en humanos se ha observado que la suplementación con zinc corrige la disminución en la actividad de la timulina en pacientes con deficiencia de zinc, también disminuye la incidencia de infecciones bacterianas. La suplementación prolongada incrementa la concentración de zinc en granulocitos y linfocitos, así como la producción de IL-2 ⁽¹⁰⁾.

En el Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química de la UNAM, se han hecho estudios de suplementación con acetato de zinc en el agua de beber en un modelo experimental murino en etapas perinatales, en donde se han monitoreado diferentes dosis, encontrando que con 500 mg/L la proliferación de linfocitos T se incrementa significativamente⁽¹⁸⁾ y se observa un incremento en la capacidad fagocítica de macrófagos⁽¹⁹⁾. Otros resultados con la misma dosis muestran un incremento en la expresión de IL-1 y TNF- α , y la secreción de IL-12; al mismo tiempo, se han evaluado las concentraciones de zinc en diferentes tejidos como el uterino y el placentario, así como en embriones, encontrando un aumento en los niveles de zinc en dichas etapas debido a la suplementación.

La IL-12 y el interferón gamma, potencian la eliminación de parásitos por los macrófagos, se cree que el efecto benéfico de la suplementación con zinc sobre las infecciones en humanos puede ser debida a un incremento en la producción de interferón gamma⁽¹⁰⁾.

El zinc y el sistema inmune

Los estudios realizados en las últimas tres décadas indican una rápida disminución de la inmunidad celular y humoral tanto en humanos como en animales deficientes en zinc, algunos han mostrado una disminución en el funcionamiento de las células asesinas naturales (NK), importantes productoras de interferón gamma, así como anergia en las respuestas de hipersensibilidad tardía, linfopenia y atrofia del timo^(4, 5, 10, 20, 26,).

El número de linfocitos T se reduce en humanos, ratones y primates deficientes en zinc, mientras que el funcionamiento de los linfocitos restantes parece ser normal; se ve afectada la capacidad de proliferación y de respuesta a antígenos

dependientes de células T. En la deficiencia de zinc hay una elevación crónica de los glucocorticoides, los cuales han sido considerados como inductores clásicos de apoptosis en timocitos precursores de células T, por lo que existe una teoría que relaciona la deficiencia de zinc y la elevación de los glucocorticoides con una eliminación apoptótica de precursoras de células T en la médula ósea y en el timo, desembocando en la linfopenia; no se ha demostrado que las células precursoras B sean susceptibles a la apoptosis mediada por glucocorticoides, sin embargo, la deficiencia de zinc disminuye en un 50-70% algunos subtipos de células B en la médula ósea; al parecer las células B maduras presentan una mayor resistencia ⁽⁵⁾.

Adicionalmente, hay un incremento en las células de la serie mieloide como neutrófilos, monocitos-macrófagos, basófilos, eosinófilos y otros. Se cree que los organismos con deficiencia de zinc dan prioridad a la mielopoyesis sobre la linfopoyesis asegurando así su primera línea de defensa ^(1, 5). Sin embargo, el que haya un mayor número de macrófagos no significa necesariamente que su funcionamiento sea el óptimo, pues se ha observado que hay una disminución en el porcentaje de macrófagos peritoneales asociados con *T. cruzi* en ratones infectados deficientes en zinc, lo que demuestra que la habilidad del macrófago para matar el parásito se reduce, dicha habilidad se restablece después de un tratamiento con zinc pero no con magnesio, cobre o níquel ^(1, 4).

La deficiencia de zinc en humanos y animales ocasiona una alteración en el balance entre las poblaciones de linfocitos T de tipo Th1 y los de tipo Th2, pues reduce la secreción de citocinas como el interferón gamma, la IL-2 y el TNF-alfa, mientras que citocinas como la IL-4, IL-6 e IL-10 no se ven afectadas; la reducción en las concentraciones de interferón gamma e IL-2 se corrigieron después de la suplementación con zinc; al parecer la deficiencia de zinc afecta principalmente la producción de citocinas de tipo Th1, ocasionando una alteración del balance entre las células Th1 y Th2 ^(3, 10).

2.2 El interferón gamma

Los interferones

El nombre colectivo de interferones se designó a un grupo de proteínas capaces de interferir con la propagación de un gran número de virus. Los interferones forman parte de un conjunto de biomoléculas reconocidas como citocinas, participan en los mecanismos naturales de defensa de los vertebrados y se presentan fundamentalmente en forma de glicoproteínas. Los interferones son producidos ante diferentes estímulos biológicos, inducidos principalmente por virus aunque también se han descrito otros agentes inductores como: bacterias, protozoarios, otras citocinas, mitógenos, ARNs de doble cadena tanto naturales como sintéticos y otras sustancias ^(21, 22).

Se conocen actualmente varios tipos de interferones entre los cuales se encuentra el interferón alfa (también llamado leucocitario), el interferón beta (fibroblástico), el interferón omega (únicamente presente en leucocitos) y el recién descubierto interferón kappa. Todos estos presentan una estructura tridimensional y propiedades biológicas similares por lo que se les agrupa como interferones tipo I. El interferón gamma, conocido inicialmente como interferón inmune, tiene propiedades biológicas y estructurales distintas por lo que se le ha designado como interferón tipo II ^(21, 23).

Las respuestas biológicas de los interferones se inician con la unión de los mismos a receptores específicos en la superficie de las células, lo que promueve la activación de señales de transducción, seguidas por la expresión de los genes correspondientes ⁽²¹⁾.

Ahora se sabe que la actividad antiviral es solo uno de muchos procesos celulares inducidos por los interferones (Tabla 1), pues además inhiben la proliferación celular, regulan la diferenciación celular y tienen un destacado papel como inmunomoduladores ⁽²¹⁾.

Algunas proteínas inducidas por los interferones			
Proteína	Funciones	Inducido por	
		IFN Tipo I	IFN Tipo II
2,5-oligoadenilato-sintetasa	Activador de ARNasa L, la cual degrada moléculas de ARN de cadena simple de origen viral y celular	+	+
Proteína cinasa R (PKR)	Fosforila e inactiva el factor de iniciación peptídico eIF2 involucrado en el traslado de ARNm viral en los poliribosomas.	+	±
MHC clase I (HLA-A,B,C) incluyendo la β_2 -microglobulina	Presentación de antígenos	+	+
MHC clase II (HLA-DR)	Presentación de antígenos	±	+
Indolamina 2,3-dioxigenasa	Metabolismo del triptófano (catabolismo), limita su disponibilidad para microorganismos intracelulares	±	+
Receptores de TNF	Media las acciones del TNF	±	+
Receptores de IL-2	Media las acciones de la IL-2	-	+
Receptor de GM-CSF	Media las acciones de GM-CSF	-	+
Receptor Fc γ	Unión de Ig por macrófagos/neutrófilos	±	+

Tabla 1. Algunas proteínas inducidas por los interferones ^(21, 24) MHC: molécula del complejo mayor de histocompatibilidad; HLA: antígeno leucocitario humano; TNF: factor de necrosis tumoral; IL-2: interleucina 2; GM-CSF: factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos y monocitos; Fc γ : fracción c de las inmunoglobulinas.

El interferón gamma

El interferón gamma es un homodímero con dominios helicoidales. El gen que lo codifica se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 12 humano. A diferencia de los interferones del tipo I, el interferón gamma es producido por un número limitado de células activadas como las NK, Th1, dendríticas y macrófagos (22, 24, 25, 26).

El interferón gamma se une con alta afinidad con un receptor ubicado en la superficie de la célula, activando así mecanismos de señalización citoplasmática cuyo efecto es la estimulación o modulación de la expresión de algunos genes (22).

El receptor está formado por dos cadenas polipeptídicas IFNGR1 y dos cadenas IFNGR2, cada una de éstas se encuentra asociada constitutivamente a un miembro de la familia de proteínas tirosincinasas Janus (JAK). En el caso del IFNGR1 la unión es con JAK1, mientras que IFNGR2 se une a JAK2 (22, 23, 24).

Las cadenas IFNGR1 se expresan en la superficie de la célula de manera constitutiva; las cadenas IFNGR2 también se expresan de forma constitutiva, pero a niveles muy bajos y su expresión se regula por diferentes estímulos externos. La función biológica del interferón gamma recae en la cadena IFNGR2, además de que contribuye al proceso de unión ligando-receptor al favorecer la estabilización del complejo, aunque en comparación con IFNGR1, su afinidad es menor (22, 23).

Sistemas JAK-STAT: las JAK integran una familia de proteínas tirosincinasas que se asocian con los dominios intracelulares de los receptores. En respuesta a la interacción con el ligando las cadenas del receptor se asocian entre sí activando así a las proteínas JAK, las cuales fosforilan el dominio intracelular de la cadena IFNGR1 formando un sitio de unión para las proteínas STAT1, que se encuentran como monómeros en el citosol y forman parte de una familia de siete proteínas muy importantes en la mediación de los efectos biológicos de una gran variedad de citocinas y factores de crecimiento ^(22, 23).

Una vez establecida la unión de las STAT1, estas también son fosforiladas por las JAK. Dichas moléculas fosforiladas y libres forman homodímeros generando el factor de activación del interferón gamma (GAF), el cual se transloca al núcleo donde se une a una región promotora denominada sitio activado por el gamma (GAS), responsable de la activación transcripcional de los genes inducida por el interferón gamma (figura 1) ^(22, 23, 24).

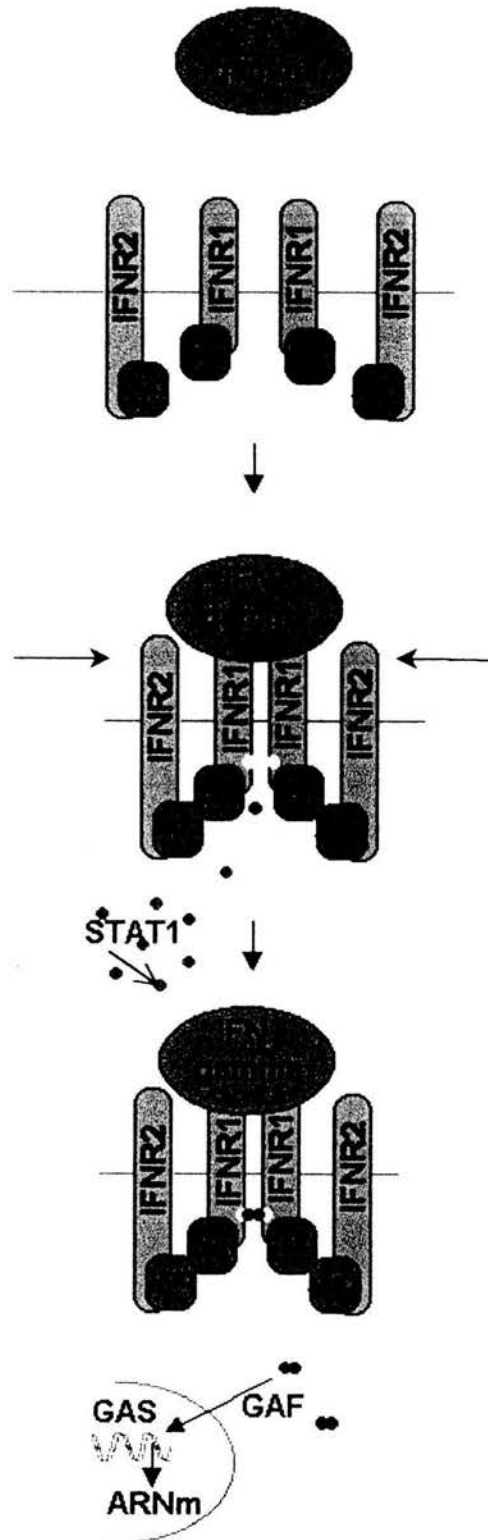


Figura 1. Sistema JAK-STAT ⁽²³⁾

El sistema inmune y el interferón gamma

Las células T que no han tenido contacto con un antígeno (T naive) pueden diferenciarse en dos clases funcionales de células durante la respuesta inmune, las células Th1 y las células Th2. Las células Th1 son responsables de la respuesta inmune intracelular, mientras que las células Th2 se encargan de la inmunidad extracelular. En términos de control de parásitos, las células Th1 proveen protección contra protozoarios intracelulares como por ejemplo las especies de *Leishmania* y *Toxoplasma gondii*, mientras que las células Th2 están asociadas con la protección contra parásitos intestinales como los helmintos ^(27, 28, 29).

La IL-2 y el interferón gamma son productos de las células Th1, mientras que la IL-4, IL-6 y la IL-10 de las células Th2. El interferón gamma inhibe la diferenciación hacia Th2, mientras que la IL-4 hace lo propio con la población Th1 ⁽¹⁰⁾.

En la producción de interferón gamma por las células Th1, recientemente se identificó un factor específico de células Th1 llamado T-bet, un miembro de la familia de factores de transcripción T-box, el cual induce la producción de interferón gamma en estas células ^(27, 28).

El mecanismo por el cual el factor T-bet induce la expresión del interferón gamma es un área de extensa investigación. La expresión de T-bet en las células T naive es inducida por el interferón gamma producido por otro tipo de células como las NK, a través del factor STAT1; en las células Th1 diferenciadas, la reiteración de la expresión del interferón gamma puede ocurrir por dos vías diferentes: 1) por la estimulación del receptor de las células T (TCR) o 2) por la inducción por citocinas como la IL-12 e IL-18. La IL-18 aumenta la producción de interferón gamma, sin embargo, a diferencia de la IL-12, es incapaz de inducir la diferenciación de las células T naive a células Th1; la combinación de IL-12 e IL-18 induce la producción de interferón gamma en ausencia de la estimulación del TCR. Los

detalles transcripcionales de la inducción de la expresión del interferón gamma por las citocinas IL-12 e IL-18 son poco conocidos, sin embargo, se sabe que hay una fuerte dependencia del factor STAT4 activado por la IL-12 y el factor NF- κ B activado por la IL-18, mientras que en la producción de interferón gamma inducida por la estimulación del TCR, el factor NF-AT es muy importante ^(27, 28).

El interferón gamma producido por las células NK activadas, puede aumentar la expresión del factor T-bet durante la activación primaria de las células T naive vía la señalización por STAT1. El factor T-bet promueve el desenvolvimiento de la cromatina en donde se encuentra el gen que codifica al interferón gamma, además, promueve la expresión de la cadena β 2 del receptor de la IL-12, así la IL-12 producida por macrófagos o células dendríticas activadas por el patógeno amplifica la producción del interferón gamma por las células T vía el factor de transcripción STAT4 promoviendo, además, la expresión del receptor de la IL-18 (Figura 2) ^(27, 28).

Efectos

El principal blanco del interferón gamma es el macrófago, donde se sabe induce la expresión de genes que codifican para las subunidades de la NADPH oxidasa y enzimas lisosomales, cuyos productos están relacionados con la destrucción de los microorganismos digeridos. Otro blanco importante del interferón gamma son las células NK ^(23, 24).

El interferón gamma incrementa la síntesis de algunas citocinas, como la subunidad p40 de la IL-12, el TNF-alfa y la IL-1, lo cual contribuye con la inmunidad antimicrobiana *in vivo* ^(23, 24).

Por otra parte, el interferón gamma puede inducir la expresión de moléculas de MHC de tipo II como HLA-DR, así como la molécula de adhesión intracelular tipo I (ICAM-1) ^(21, 2,3).

La importancia del interferón gamma en la inmunidad innata antiviral al parecer depende principalmente del tipo de virus infectante, pues mientras que ratones deficientes en interferón gamma o IFNGR1 no muestran un cambio en la susceptibilidad a virus como el de la estomatitis vesicular (VSV), dicha susceptibilidad se ve incrementada ante virus como el de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) ^(5, 2).

Se sabe que el interferón gamma induce la expresión de diversas proteínas que inhiben la propagación viral como la 2-5 adenilato sintetasa, la cual cataliza la formación de un oligonucleótido inusual, 2-5A, requerido para activar una endonucleasa latente, ARNasa L, cuya función es degradar el ARNm requerido para la replicación citoplasmática de una gran variedad de virus ⁽²¹⁾.

Otra proteína inducida en menor proporción por el interferón gamma es una proteína cinasa conocida como PKR, la cual fosforila e inactiva el factor de iniciación peptídico eIF2 involucrado en el traslado de ARNm viral en los poliribosomas ⁽²¹⁾.

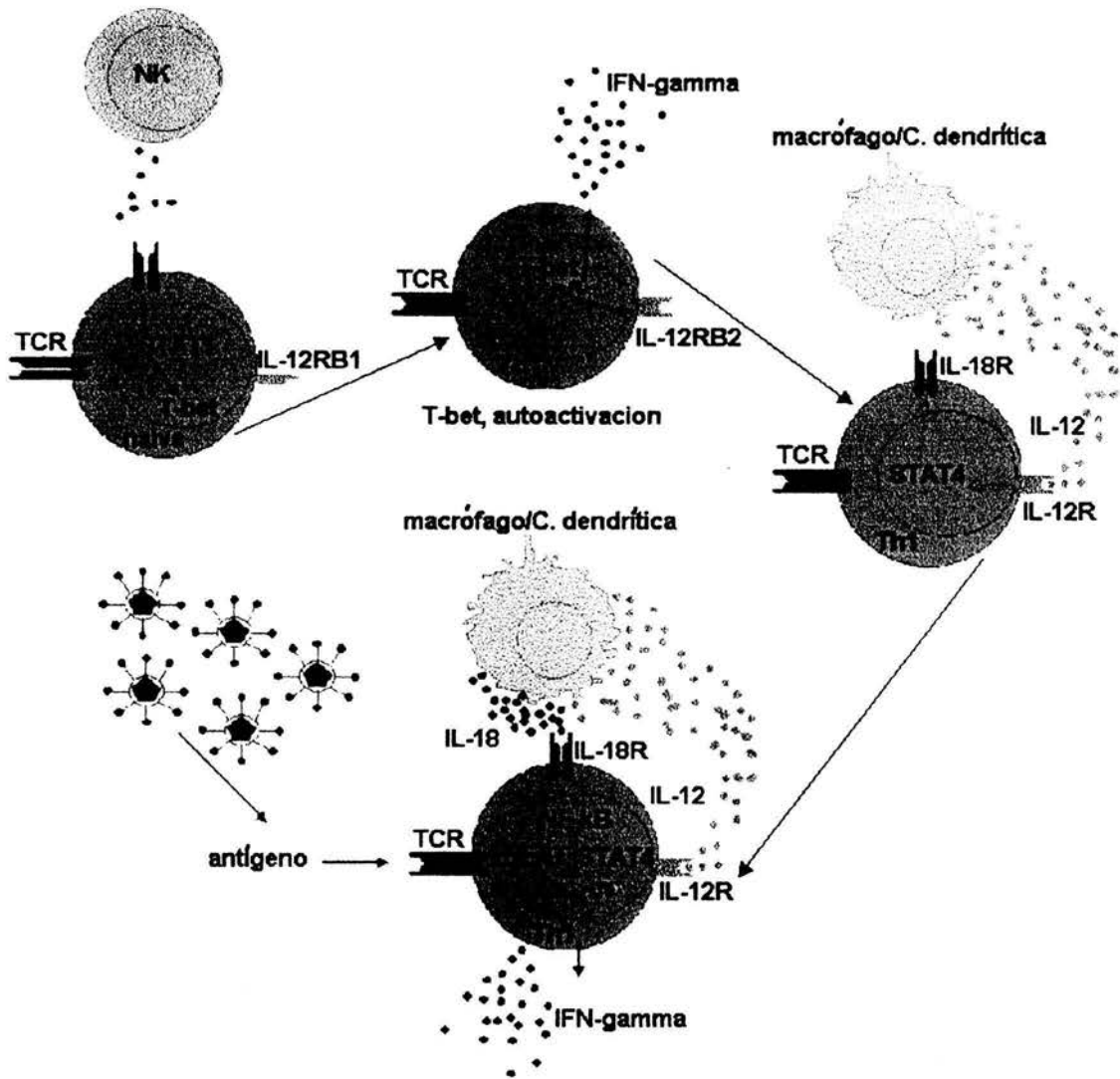


Figura 2. Respuesta Th1 y producción de interferón gamma⁽²⁸⁾. El interferón gamma secretado por las células NK, induce la expresión en las células T naive del factor de transcripción T-bet, a través del factor STAT1. El factor T-bet puede autoactivar su expresión e inducir la de la cadena 2 del receptor de la IL-12, activando a las células T y promoviendo su diferenciación a células Th1. Las células Th1 son capaces de producir interferón gamma como respuesta a las citocinas IL-12 e IL-18, las cuales promueven la expresión de los factores de transcripción STAT4 y NF-κB respectivamente, así como por la presentación de antígenos vía TCR que induce la expresión del factor de transcripción NFAT.

NK: células asesinas naturales; TCR: receptor de las células T; STAT1: proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción; IL12RB1: cadena 1 del receptor de la interleucina 12; IL-12: interleucina 12; IL-18R: receptor de la interleucina 18; IL-18: interleucina 18; NF-κB: factor nuclear κB; NFAT: factor nuclear activado por las células T.

Estimulación de la producción de interferón gamma

Se han empleado ésteres de forbol como el PMA en combinación con ionomicina de calcio para mimetizar las señales producidas por la activación del TCR, como consecuencia hay una proliferación celular y un aumento en la producción de citocinas como la IL-2 y el interferón gamma ^(30, 31). Sin embargo, el uso individual de la ionomicina o el PMA no tiene grandes efectos mitógenicos ni induce la proliferación celular. El PMA promueve la síntesis de proteínas aunque a niveles inferiores en comparación con la combinación de PMA e Ionomicina ⁽³¹⁾. Por otra parte, el tratamiento de las células T con ésteres de forbol al parecer induce la expresión de la cadena 2 del receptor de interferón gamma ⁽²³⁾.

La PKC es el receptor celular de los esteres de forbol, juega un papel muy importante en la activación de genes y la regulación de sus respectivos factores de transcripción. Algunos de esos factores de transcripción son el AP-1, el cual activa a la proteína cinasa N-terminal c-Jun (JNK) involucrada en la señalización vía TCR ⁽³⁰⁾. Otro factor de transcripción activado por la PKC es el NF-κB, involucrado en la activación de un gran número de genes, incluyendo al del interferón gamma. La expresión de dicho factor se induce rápidamente por varios estímulos como la presentación de antígenos a los linfocitos T, la exposición a anticuerpos dirigidos contra proteínas de superficie, así como el tratamiento de los linfocitos con esteres de forbol, ionoforos de calcio, lectinas y citocinas como el TNF-alfa y la IL-1. Dichos factores de transcripción están involucrados en las respuestas inflamatorias y en las respuestas inmunes específicas ^(10, 30) (Figura 3).

La PKC tiene como cofactor enzimático al calcio, sin embargo, el mantenimiento de la estructura inactiva de la proteína es llevado a cabo por el zinc, el cual se mantiene unido a residuos de cisteína que al ser reducidos lo liberan en el citoplasma de la célula, lo que trae como consecuencia la activación enzimática de la PKC; así mismo, el zinc forma parte de la estructura de diversos factores de transcripción en la forma de dedos de zinc como es el caso del NF-κB ^(30, 32).

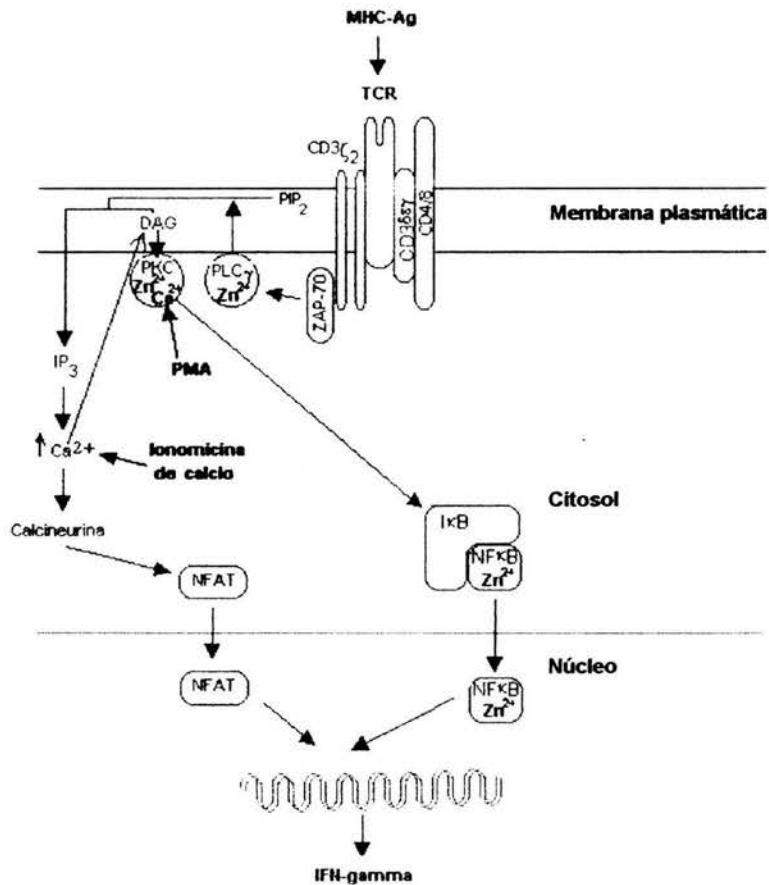


Figura 3. Estimulación de la producción de interferón gamma ^(30, 31, 32). Varias clases de proteínas son reclutadas a los receptores de los linfocitos T activados (TCR) y participan en la propagación de señales intracelulares. La enzima fosfolipasa C- γ genera la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) en inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). Éstos dos segundos mensajeros estimulan la elevación de la concentración de Ca²⁺ intracelular y la activación de la proteína cinasa C (PKC) ⁽³²⁾. La PKC puede activar al factor de transcripción NF- κ B, así mismo la calcineurina el factor de transcripción NFAT, dichos factores son capaces de inducir la expresión del interferón gamma. El PMA y la ionomicina de calcio activan a la PKC, mimetizando la activación de la célula T por la presentación de antígenos vía TCR. El zinc forma parte de la estructura de la PKC y del factor de transcripción NF- κ B, por lo que se sugiere que sus niveles en el organismo podrían tener una influencia importante en la propagación de señales al interior de las células.

Estudios recientes en el laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química de la UNAM, han explorado los efectos de la suplementación con diferentes dosis del elemento traza; se ha observado un incremento en la proliferación de células T, así como de la capacidad de respuesta de células de la primera línea de defensa del organismo como los macrófagos, al aumentar su capacidad fagocítica y la producción de citocinas como la IL-1 y el TNF- α . Además, se ha observado un incremento en la producción de IL-12, la cual puede inducir la producción del interferón gamma en células Th1, NK, así como en células dendríticas en presencia de IL-18; también se ha notificado un aumento en las concentraciones del elemento en diversos tejidos como son: hepático, tímico, placentario, uterino, así como en suero, embriones, macrófagos y linfocitos. Estos antecedentes nos llevan a investigar los efectos de la suplementación con zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma en ratones en etapas perinatales.

3. Hipótesis del estudio

La suplementación con zinc a ratones en etapas perinatales incrementará el número de células secretoras de interferón gamma.

4. Objetivos

Objetivo general

Evaluar los efectos de la suplementación con zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma en ratones BALB/c en etapas perinatales.

Objetivos particulares

- Establecer las condiciones óptimas de cultivo de células de bazo para determinar el número de células secretoras de interferón gamma.
- Implementar la metodología de ELISpot para el estudio de los efectos del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma en ratones en etapas perinatales.
- Evaluar los efectos de la suplementación con zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma en esplenocitos de ratón.

5. Material y Métodos

Administración del zinc

Se utilizaron como progenitores ratones de la cepa BALB/c hembras y machos de 22g (de aproximadamente 8 semanas de edad), los cuales se alojaron por parejas en cajas de plástico. Se alimentaron *ad libitum* con alimento comercial (Lab Diet 5015 PMI Foods Inc, St Louis MO, USA), con una concentración de 74 µg de Zn/g de alimento.

Se resumen los grupos experimentales de la siguiente manera: las crías que recibieron acetato de zinc en el agua de beber (Mallinckrodt, Kentucky, USA) en una concentración de 500 mg/L desde la gestación (a los progenitores se les administró el tratamiento desde el momento del apareamiento y hasta los 21 días correspondientes al periodo de gestación) y durante la lactancia corresponden al grupo I con 6 semanas de tratamiento (6s, +Zn), mientras que las crías que recibieron el tratamiento desde la gestación, durante la lactancia y hasta el destete corresponden al grupo II con 9 semanas de tratamiento (9s, +Zn). Los animales de los grupos testigo, no recibieron Zn en el agua de beber (6s, -Zn; 9s, -Zn) (Tabla 2).

En estudios anteriores realizados en el Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química de la UNAM, se registro el consumo de agua de este modelo experimental, encontrando que cada ratón consume en promedio 5 mL de agua por día, por lo que los animales suplementados con zinc recibieron 2.5 mg de zinc/d.

Grupo	Periodo de tratamiento con zinc (500 mg/L)		Estimulación de las células		
	6 semanas: periodos de gestación y lactancia	9 semanas: periodos de gestación, lactancia y destete	Sin estimulante	Forbol miristato acetato (PMA)	Ionomicina de calcio (I)
I (+Zn)	6s		✓	PMA	I
Testigo I (-Zn)	6s		✓	PMA	I
II (+Zn)		9s	✓	PMA	I
Testigo II (-Zn)		9s	✓	PMA	I

Tabla 2. Grupos experimentales (n=12)

Obtención de células esplénicas

En condiciones de esterilidad se obtuvo el bazo del animal muerto y se perfundió con 3 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (Hyclone, No. Cat. B-0304-Ax, Utah), las células obtenidas se lavaron dos veces con medio de cultivo por centrifugación a 200 g durante 10 minutos a 4°C. Finalmente fueron resuspendidas en 2 mL de RPMI.

El número de células se determinó mediante conteo en una cámara de Neubauer. En todos los casos se observó una viabilidad celular mayor al 95% utilizando la exclusión del colorante vital azul tripano (Flow Laboratories, USA). La concentración final de las células se ajustó a 1×10^6 células/mL en RPMI.

Determinación del número de células secretoras de interferón gamma

Para la determinación del número de células secretoras de interferón gamma utilizamos la prueba ELISpot, la cual fue diseñada originalmente para la detección de células B secretoras de anticuerpos antígeno específicos, sin embargo se ha adaptado para la detección de células secretoras de citocinas específicas u otros antígenos. Esta prueba incorpora el ensayo inmunoenzimático en fase sólida ELISA ⁽³³⁾.

Actualmente es el método más sensible y selectivo en el estudio de las citocinas, no requiere estimulación previa reflejándose la situación *in vivo*, en contraste con otros métodos en donde se requiere una estimulación previa *in vitro* para que los niveles de citocinas sean cuantificables ⁽³⁴⁾.

El ELISpot es una prueba altamente reproducible y sensible, que se puede utilizar para cuantificar y monitorear respuestas de células T con frecuencias del orden de 1 en 100, 000, así como células que secreten menos de 100 moléculas de citocina por segundo. Esta técnica nos permite visualizar directamente cada célula secretora de interferón gamma como una mancha ^(35, 36, 37).

El interferón gamma secretado por las células en cultivo, es capturado en las inmediaciones de la célula por un anticuerpo específico anti interferón gamma adsorbido en el fondo del pozo, las células se retiran mediante lavados sucesivos y se adiciona un segundo anticuerpo específico anti interferón gamma que va a adherirse al interferón inmovilizado por el primer anticuerpo, el segundo anticuerpo se encuentra marcado con una enzima, al adicionar el sustrato de la misma, se forma un producto colorido insoluble que permite ver el sitio en donde se encontraba la célula secretora de interferón gamma como una mancha de color.

La determinación del número de células secretoras de interferón gamma se realizó con un estuche comercial, ELISpot mouse IFN-gamma (R&D Systems. Cat EL485, Minneapolis), el cual se fundamenta en el método del doble anticuerpo, el procedimiento que se siguió fue acorde al protocolo establecido en el estuche y se describe a continuación:

1. Se obtuvieron las células del bazo y se ajustaron como se indica en el apartado anterior.
2. Se reconstituyó el anticuerpo monoclonal anti interferón gamma murino incorporado previamente a los 96 pozos de una placa de difluoruro de polivinilideno (PVDF) con 200 μ L de RPMI 1640 (Hyclone Cat. B-0304-Ax, Utah) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente (Figura 5a).
3. Se aspiró el medio de cultivo de los pozos e inmediatamente se adicionaron 100 μ L de la suspensión de células (células de un ratón por pozo: 10^5 céls), así como el control positivo incluido en el estuche comercial (interferón gamma recombinante); los controles negativos consistieron en adicionar en lugar de la suspensión de células: medio de cultivo, amortiguador de lavado, o bien, en no adicionar en los pasos sucesivos el anticuerpo biotinilado o el sustrato (Figura 4, 5b). Con la finalidad de mimetizar la activación de las células T y de favorecer la producción de interferón gamma se adicionaron también en los pozos correspondientes los estimulantes: forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Sigma P-8139) en una concentración de 50ng/mL o ionomicina de calcio 0.5 μ g/mL (Sigma I-0634) (Figura 4). Se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 18 horas, el tiempo óptimo de acuerdo a la bibliografía consultada y ensayos previos realizados en el laboratorio ^(33, 35, 37). Se realizaron 4 experimentos representativos duplicando cada muestra.
4. Al término del periodo de incubación se aspiró el líquido de cada uno de los pozos y se procedió a lavar la placa 4 veces con la finalidad de retirar todas las células (Figura 5c).

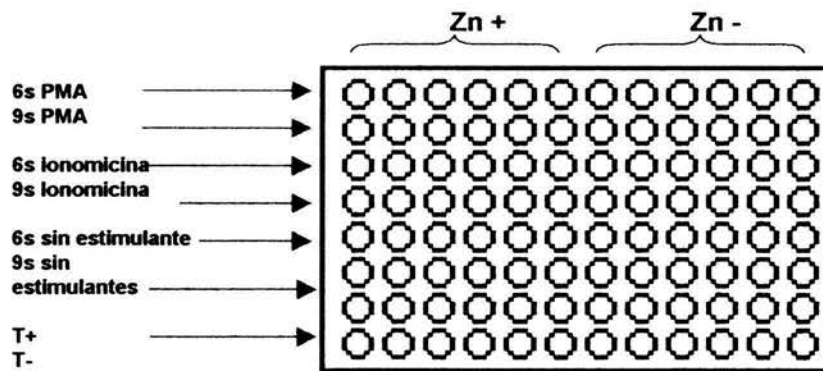


Figura 4. Placa ELISpot

5. Se adicionaron en cada pozo 100µL de la solución de detección que contenía un anticuerpo policlonal biotinilado anti interferón gamma murino. Se incubó durante toda la noche a 4°C (Figura 5d).
6. Al término del periodo de incubación se repitió el paso 4 para retirar el anticuerpo biotinilado que no se unió al interferón gamma (Figura 5e).
7. Se adicionó en cada pozo 100µL de solución diluida de la enzima estreptavidina alcalina fosfatasa y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con la finalidad de que se uniera a la biotina del segundo anticuerpo (Figura 5f).
8. Al término del periodo de incubación se repitió el paso 4 para retirar la enzima no unida (Figura 5g).
9. Se adicionó en cada pozo 100µL del cromógeno 5-Bromo-4-Cloro-3 indolilfosfato p-toluidina y cloruro de nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT), y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, protegiendo la placa de la luz, se formó un producto colorido insoluble (Figura 5h).
10. Se desechó el cromógeno por aspiración y se enjuagó la placa con agua desionizada. Se retiró el fondo de la placa y se dejó secar a temperatura ambiente durante 2 horas.

11. Los spots se contaron manualmente usando un microscopio estereoscópico (Zeiss Stem 2000) (Figura 5i).
12. Los resultados se expresan como: número de células secretoras de interferón gamma/ 10^5 células.

Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante la prueba ANOVA y la prueba T de student, utilizando el software Prism 3.0

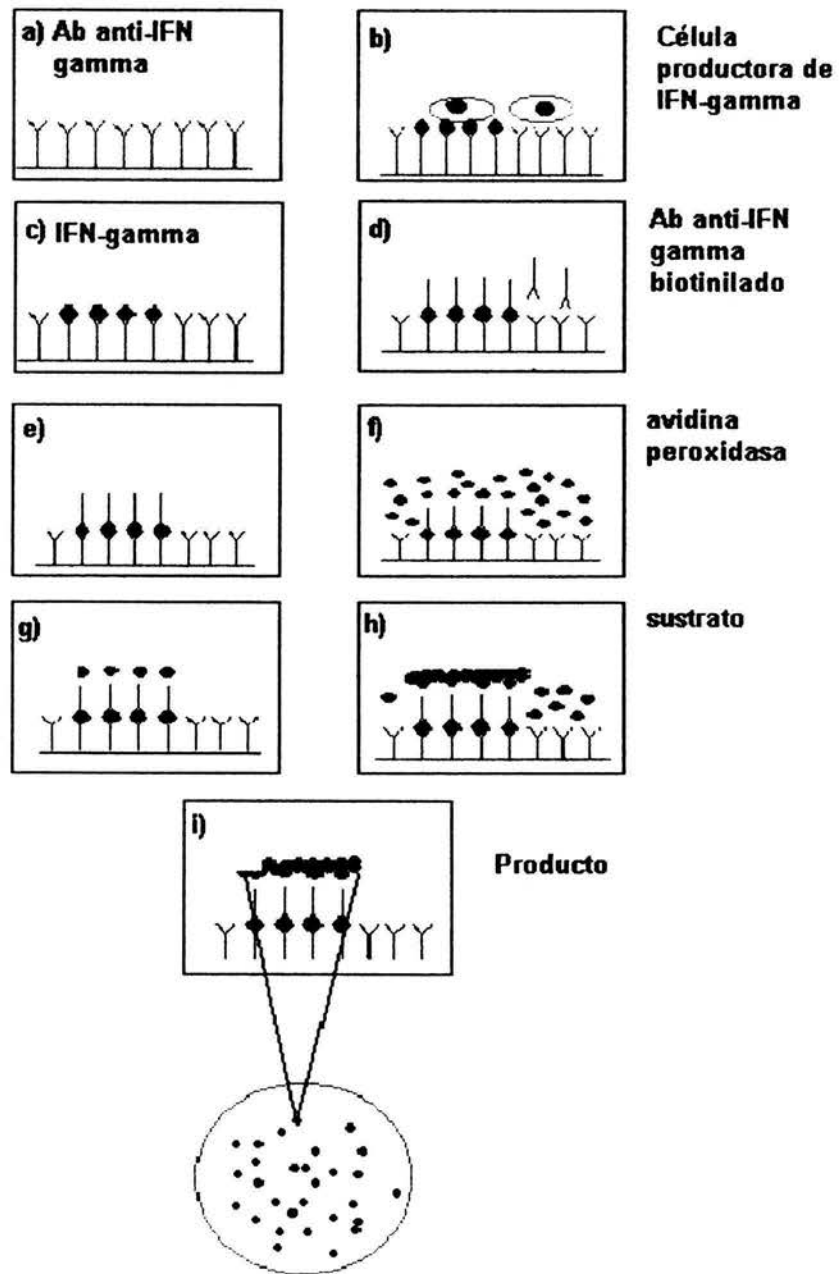
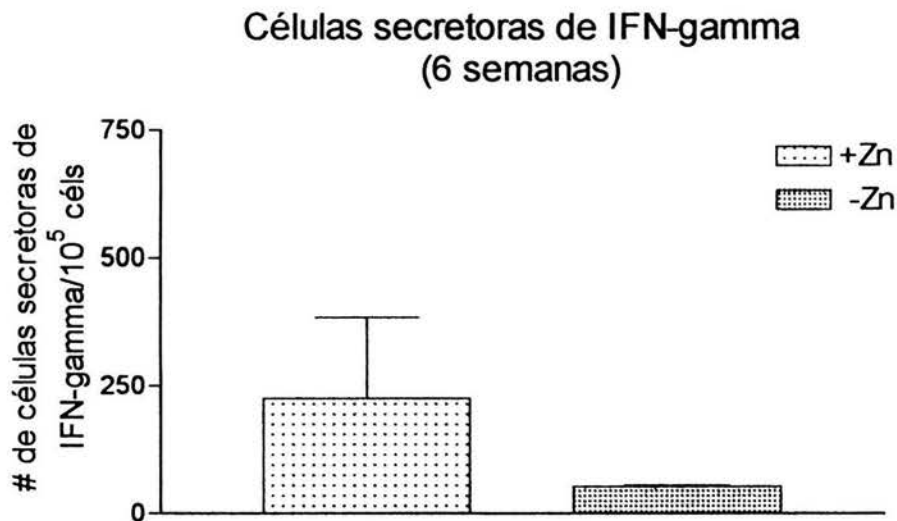


Figura 5. ELISpot

6. Resultados

Efecto del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma de ratones suplementados durante 6 y 9 semanas.

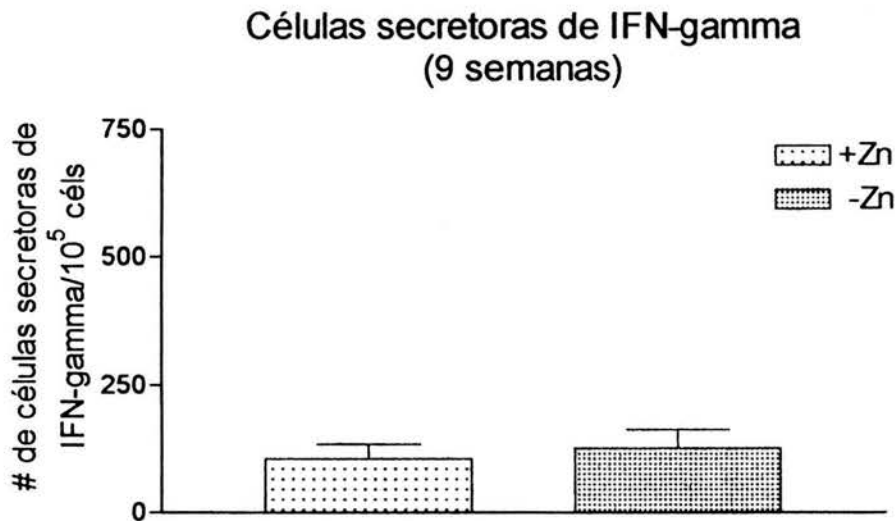
Con el propósito de conocer el efecto de la suplementación con zinc en el número de células secretoras de interferón gamma de ratones tratados durante **6 semanas** (6s: periodos de gestación y lactancia), se realizó el ELISpot obteniendo los siguientes resultados, los cuales corresponden a 4 experimentos representativos y cada muestra por duplicado (n=12).



Gráfica 1. Efecto del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma (6s).

Los ratones que recibieron el suplemento durante **6 semanas** (6s, +Zn) presentan un mayor número de células secretoras de interferón gamma en comparación con los testigos (6s, -Zn), sin embargo la diferencia no es significativa.

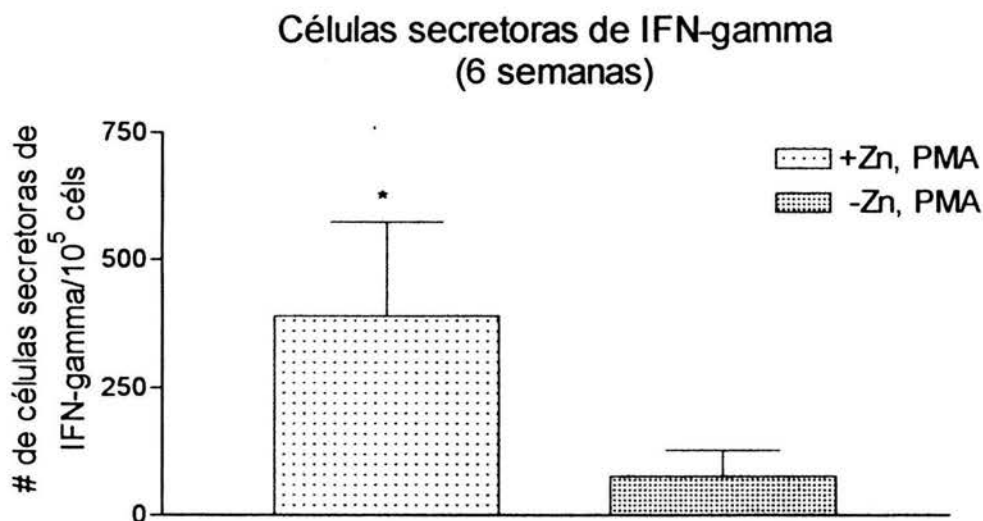
Al mismo tiempo se realizó el ELISpot con células de ratones suplementados con zinc durante **9 semanas** (9s: periodos de gestación, lactancia y destete), los resultados corresponden a 4 experimentos representativos y cada muestra por duplicado (n=12).



Gráfica 2. Efecto del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma (9s).

En los ratones que recibieron el suplemento durante **9 semanas** (9s, +Zn) no se observa un incremento en el número de células secretoras de interferón gamma en comparación con los testigos (9s, -Zn).

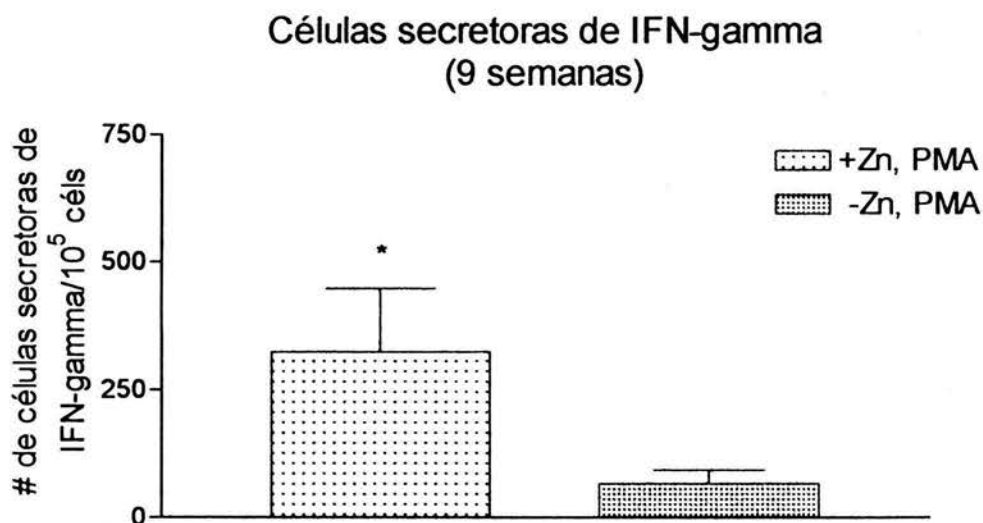
También se determinó el número de células productoras de interferón gamma de ratones suplementados durante **6 semanas** (6s: periodos de gestación y lactancia), las células fueron estimuladas con **PMA**, los resultados corresponden a 4 experimentos representativos y cada muestra por duplicado (n=12).



Gráfica 3. Efecto del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma (6s), estimuladas con forbol miristato acetato (PMA).

En los ratones que recibieron el suplemento durante **6 semanas** (6s, +Zn, PMA) se observó un incremento significativo (T student, $p < 0.05$) en el número de células secretoras de interferón gamma al ser estimuladas con **PMA** en comparación con los testigos (6s, -Zn, PMA).

Al mismo tiempo se realizó el ELISpot con células de ratones suplementados con zinc durante **9 semanas** (9s: periodos de gestación, lactancia y destete) estimuladas con **PMA**, los resultados corresponden a 4 experimentos representativos y cada muestra por duplicado (n=12).



Gráfica 4. Efecto del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma (9s), estimuladas con forbol miristato acetato (PMA).

En los ratones que recibieron el suplemento durante **9 semanas** (9s, +Zn, PMA), se observó un incremento significativo (T student, $p < 0.05$) en el número de células secretoras de interferón gamma al ser estimuladas con **PMA** en comparación con los testigos (9s, -Zn, PMA).

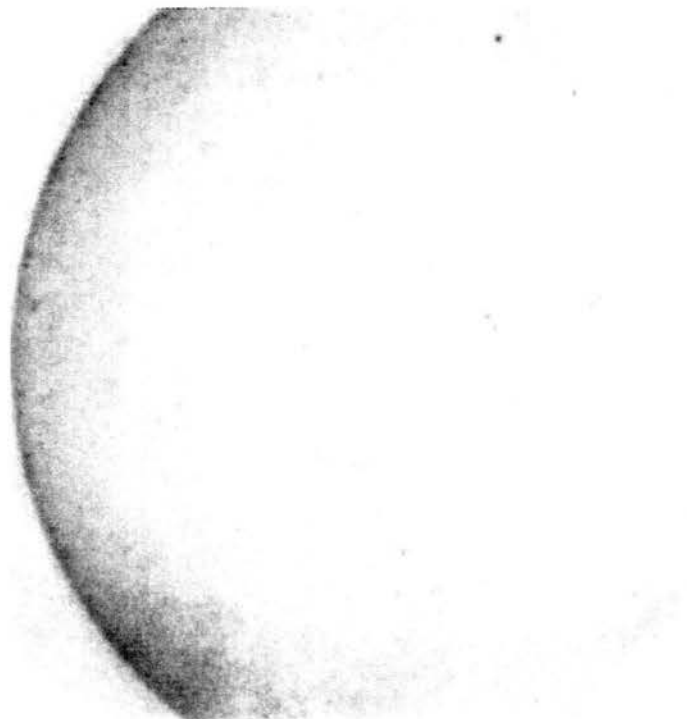
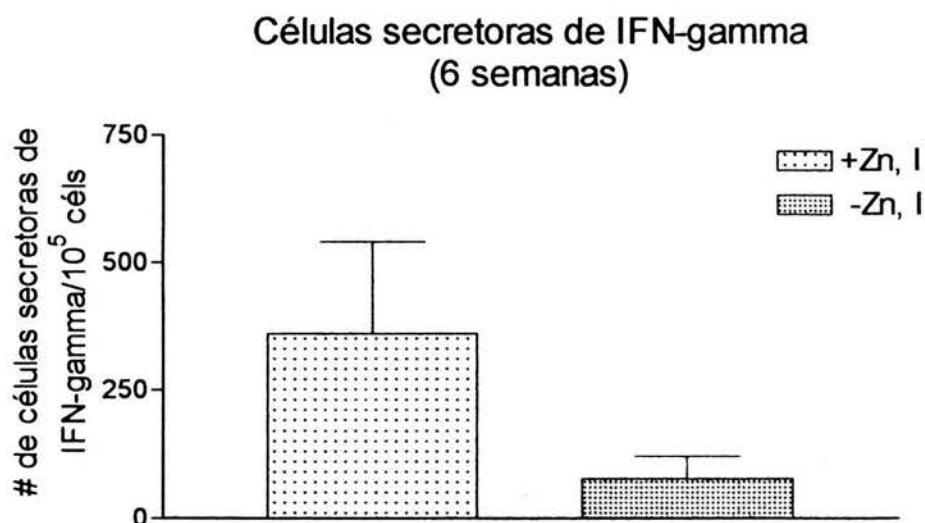


Figura 6a. Pozo de ELISpot con células de ratones (6s, -Zn, PMA)



Figura 6b. Pozo de ELISpot con células de ratones (6s, +Zn, PMA)

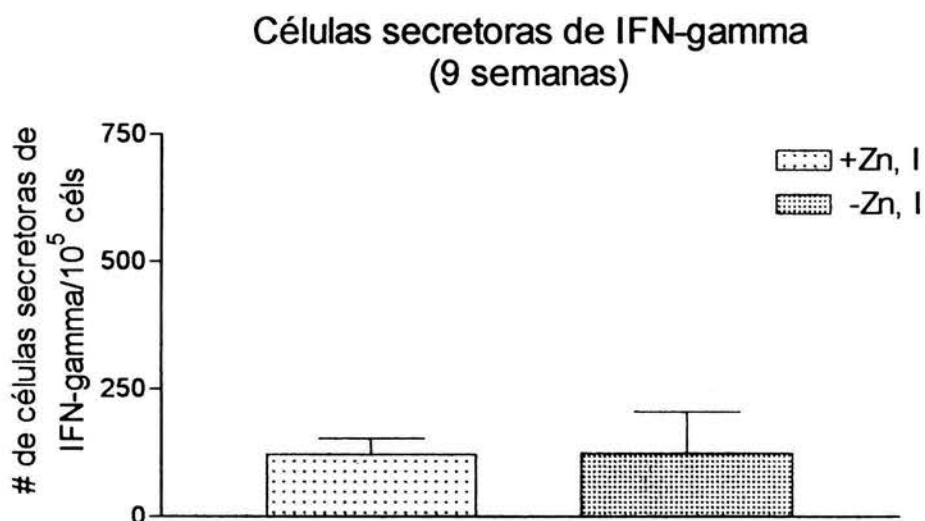
Además se estimularon las células de ratones que recibieron el suplemento durante **6 semanas** (6s: periodos de gestación y lactancia) con **ionomicina de calcio**, los resultados corresponden a 4 experimentos representativos y cada muestra por duplicado (n=12).



Gráfica 5. Efecto del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma (6s), estimuladas con ionomicina de calcio (I).

Los ratones que recibieron el suplemento durante **6 semanas** (6s, +Zn, I) presentan un mayor número de células secretoras de interferón gamma al ser estimuladas con **ionomicina de calcio** en comparación con los testigos (6s, -Zn, I), sin embargo la diferencia no es significativa (T student, $p = 0.0504$).

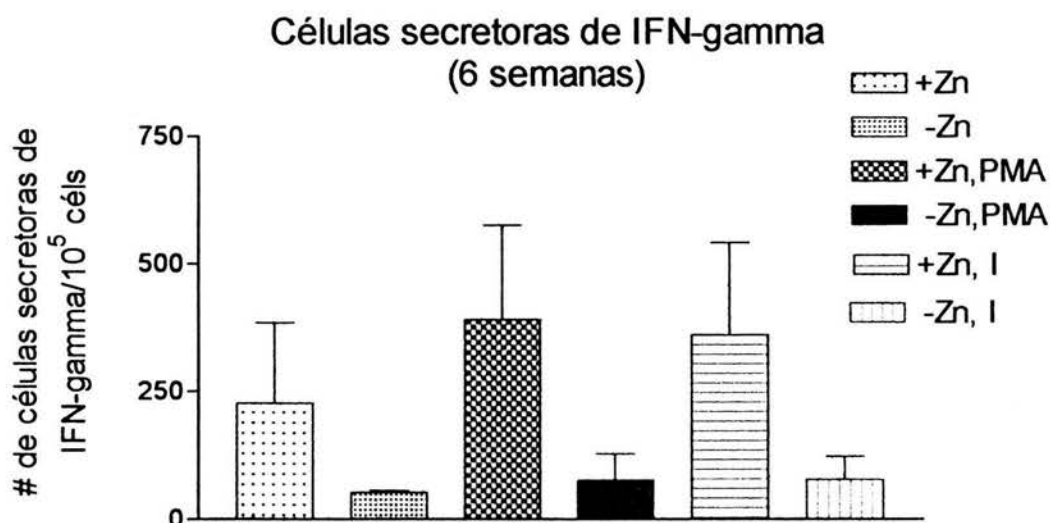
Células de ratones suplementados durante **9 semanas** (9s: periodos de gestación, lactancia y destete), estimuladas con **ionomicina de calcio**, los resultados corresponden a 4 experimentos representativos y cada muestra por duplicado (n=12).



Gráfica 6. Efecto del zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma (9s), estimuladas con ionomicina de calcio (I).

En los ratones que recibieron el suplemento durante **9 semanas** (9s, +Zn, I) no se observan diferencias significativas en el número de células secretoras de interferón gamma al ser estimuladas con **ionomicina de calcio** en comparación con los testigos (9s, -Zn, I).

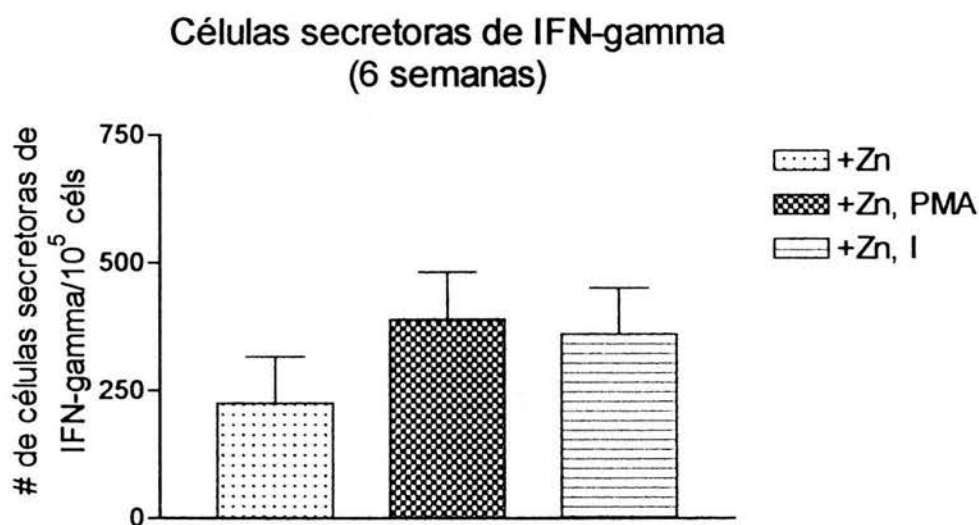
Se resumen los resultados de la suplementación oral con zinc durante **6 semanas** (6s: periodos de gestación y lactancia) sobre el número de células secretoras de interferón gamma.



Gráfica 7. Efecto de la suplementación con zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma de ratones tratados durante 6 semanas (6s: gestación y lactancia). PMA: forbol miristato acetato; I: ionomicina de calcio.

Se analizaron los datos con la prueba ANOVA encontrando que hay diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.0242$).

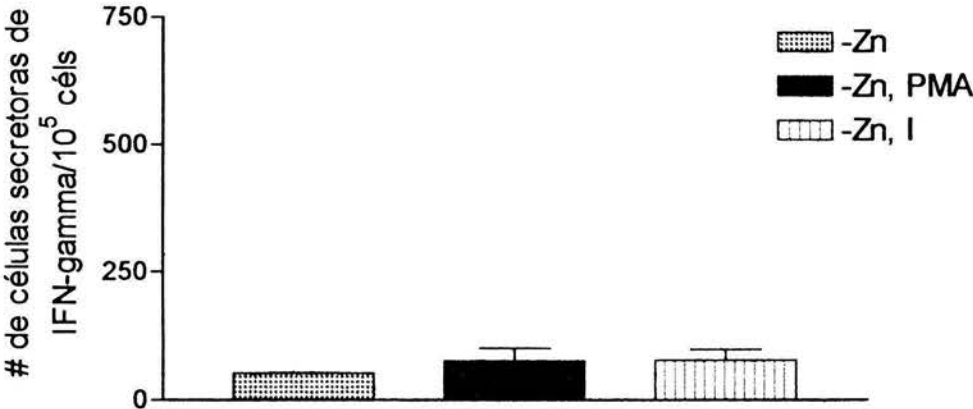
Se analizaron los datos obtenidos con **6 semanas** de tratamiento con zinc (+Zn) con la prueba ANOVA, encontrando que no hay diferencias significativas entre los grupos



Gráfica 8. Efecto de la suplementación con zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma de ratones tratados durante 6 semanas (6s: gestación y lactancia). PMA: forbol miristato acetato; I: ionomicina de calcio.

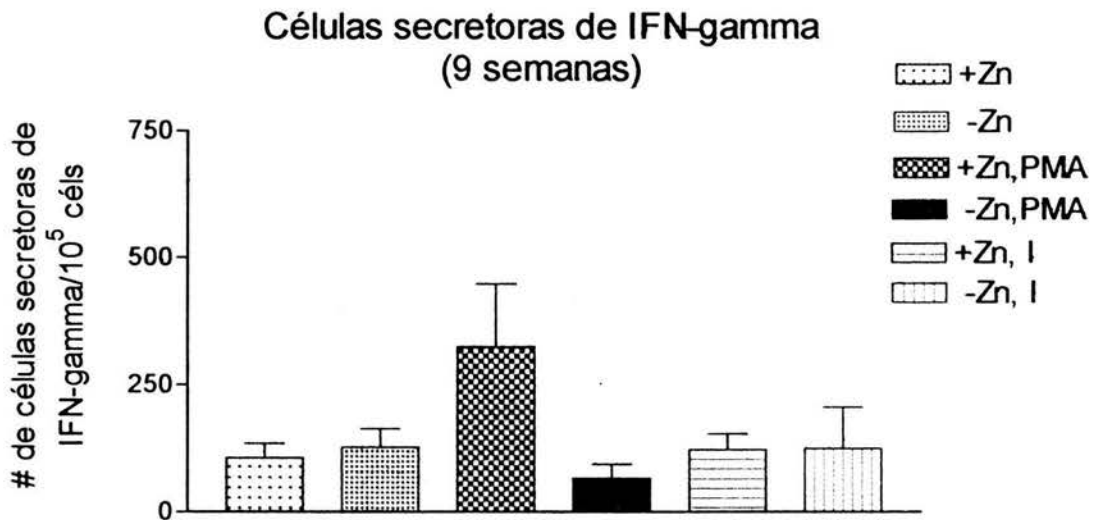
También los datos correspondientes a **6 semanas** (-Zn) fueron analizados con la prueba ANOVA encontrando que no hay diferencias significativas entre los grupos

Células secretoras de IFN-gamma (6 semanas)



Gráfica 9. Número de células secretoras de interferón gamma de ratones de 6 semanas (6s: gestación y lactancia). PMA: forbol miristato acetato; I: ionomicina de calcio.

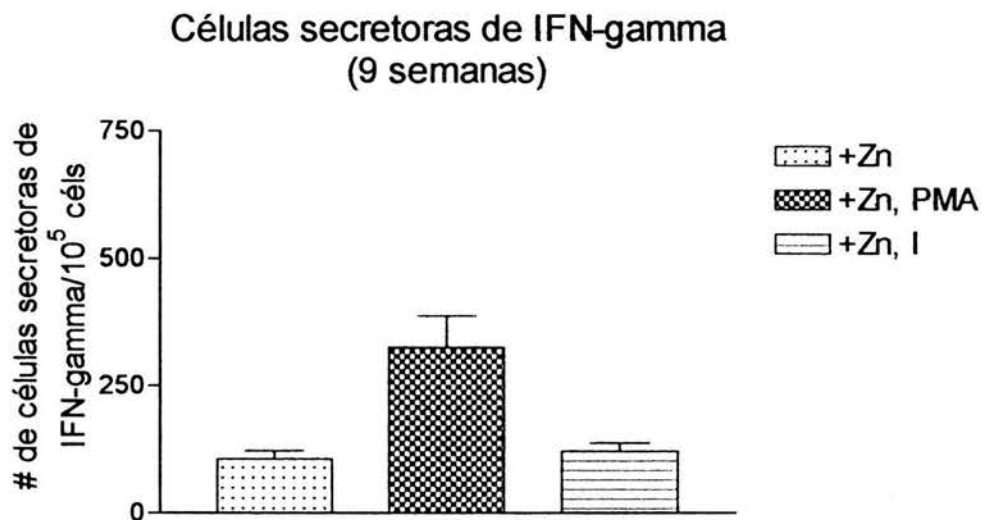
También se comparan los resultados de la suplementación oral con zinc durante **9 semanas** (9s: periodos de gestación, lactancia y destete) sobre el número de células secretoras de interferón gamma.



Gráfica 10. Efecto de la suplementación con zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma de ratones tratados durante 9 semanas (9s: gestación, lactancia y destete). PMA: forbol miristato acetato; I: ionomicina de calcio.

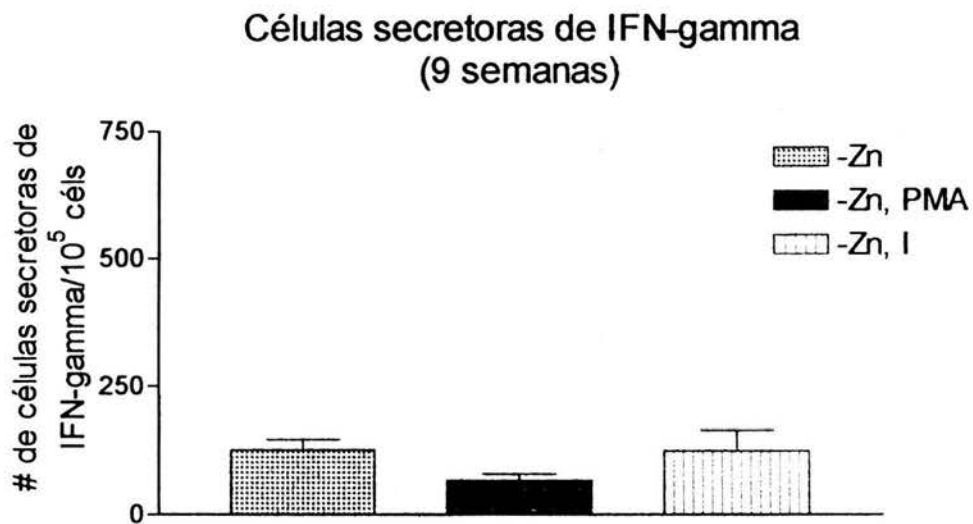
Se analizaron los datos con la prueba ANOVA encontrando que hay diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.0078$).

Se analizaron los datos obtenidos con **9 semanas** de tratamiento con zinc (+Zn) con la prueba ANOVA, encontrando que hay diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$)



Gráfica 11. Efecto de la suplementación con zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma de ratones tratados durante 9 semanas (9s: gestación, lactancia y destete). PMA: forbol miristato acetato; I: ionomicina de calcio.

También los datos correspondientes a **9 semanas (-Zn)** fueron analizados con la prueba ANOVA encontrando que no hay diferencias significativas entre los grupos



Gráfica 12. Número de células secretoras de interferón gamma de ratones de 9 semanas (9s: gestación, lactancia y destete). PMA: forbol miristato acetato; I: ionomicina de calcio.

7. Discusión

En México como lo muestra la Encuesta Nacional de Nutrición realizada en 1999, una gran parte de la población infantil presenta una deficiencia moderada de zinc, principalmente en las comunidades rurales del sur del país, cuya dieta contiene una gran cantidad de fitatos, oxalatos y taninos, los cuales impiden una adecuada absorción del elemento ^(2, 7, 8, 10, 11, 12). Dicha deficiencia trae como consecuencia un retraso en el crecimiento lineal, así como una alta incidencia de enfermedades infecciosas ^(2, 12). Debido a esto y al importante papel que tiene el zinc en la respuesta inmune, resulta esencial conocer los efectos que tiene la suplementación oral con zinc sobre el sistema inmunológico de individuos en etapas perinatales.

Se sabe que la deficiencia de zinc tanto en humanos como en animales ocasiona una alteración en el balance entre las poblaciones celulares Th1 y Th2 al reducir la secreción de citocinas como el interferón gamma y la IL-2, mientras que citocinas como la IL-4, IL-6 e IL-10 no se ven afectadas ^(3, 10).

Existen estudios realizados en infantes de comunidades rurales de México que sugieren que la suplementación con zinc reduce la frecuencia de episodios diarreicos ⁽²⁾. Se cree que el efecto benéfico de la suplementación con zinc sobre las infecciones en humanos puede ser debida a un incremento en la producción de interferón gamma ⁽¹⁰⁾.

En estudios anteriores realizados en el Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química de la UNAM, se ha encontrado que la suplementación oral con zinc en una dosis de 500 mg/L incrementa la producción de IL-12 en los macrófagos de ratones tratados durante 6 y 9 semanas. Dicha proteína es producida *in vivo* por las células presentadoras de antígenos ante diferentes estímulos y uno de sus efectos es coestimular la producción de interferón gamma en las células T, lo cual polariza la respuesta inmune hacia el tipo celular o Th1.

La determinación del número de células secretoras de interferón gamma mediante el ensayo inmunoenzimático ELISpot, nos permitió visualizar directamente las células, que activamente, se encontraban secretando la citocina, y observar el efecto de la suplementación con zinc sobre las mismas. Este ensayo, a diferencia de otros utilizados en el estudio de las citocinas, no requiere de una estimulación previa de las células reflejándose la situación *in vivo* ^(4,7,11).

El ELISpot es una prueba altamente reproducible y sensible, en nuestro ensayo nos permitió detectar como se puede ver en los resultados un número muy pequeño de células secretoras de interferón gamma, se puede utilizar para cuantificar y monitorear respuestas de células T con frecuencias del orden de 1 en 100 000 ^(35, 36, 37).

En este estudio se observó un incremento significativo (T student, $p < 0.05$) en el número de células secretoras de interferón gamma, estimuladas con PMA *in vitro*, de ratones suplementados con zinc durante las etapas de gestación y lactancia (+Zn, 6s, PMA), en comparación con el grupo testigo (-Zn, 6s, PMA), cuyas células fueron también tratadas con el mismo estimulante (Gráficas 3 y 7). Cuando se utilizó ionomicina de calcio como estimulante se observó la misma tendencia (+Zn, 6s, I), sin embargo, la diferencia con respecto a su testigo no fue significativa (-Zn, 6s, I) (T student, $p = 0.0504$) (Gráficas 5 y 7), en el caso de las células que no fueron tratadas con estimulantes también se observó un incremento importante (+Zn, 6s), aunque la diferencia en el número de células secretoras de interferón gamma con respecto a su testigo no es significativa (-Zn, 6s) (Gráficas 1 y 7).

En el caso de los ratones suplementados durante las etapas de gestación, lactancia y destete (9 semanas) se observó un incremento significativo en el número de células secretoras de interferón gamma únicamente cuando se utilizó PMA como estimulante (+Zn, 9s, PMA), en comparación con sus testigos (-Zn, 9s, PMA) (prueba T, $p < 0.05$) (Gráficas 4 y 10); en las células estimuladas con ionomicina (+Zn, 9s, I) (Gráficas 6 y 10) y en las que no fueron estimuladas (+Zn, 9s) (Gráficas 2 y

10), no se observó incremento en el número de células secretoras de interferón gamma, con respecto a sus testigos (-Zn, 9s, I; -Zn, 9s).

Al comparar el número de células secretoras de interferón gamma de ratones suplementados con zinc durante los periodos de gestación y lactancia (+Zn, 6s), cuyas células no fueron estimuladas o bien se estimularon con PMA o ionomicina de calcio (Gráfica 8), se encontró que no hay diferencias significativas entre los grupos, lo que indica que el suplemento de zinc por si solo está favoreciendo un incremento en el número de células secretoras de interferón gamma, de la misma magnitud que cuando además se estimulan las células *in vitro* con PMA o con ionomicina, lo que se confirma al observar que no hay diferencias significativas entre los grupos testigos (-Zn, 6s) (Gráfica 9). Estos resultados muestran que el efecto estimulante en el número de células secretoras de interferón gamma, en ratones, se debe al suplemento de zinc administrado durante los periodos de gestación y lactancia (6 semanas).

Cuando se comparan las gráficas 7 y 10, se observa que el número de células secretoras de interferón gamma es menor cuando el tratamiento se prolonga durante 9 semanas (periodos de gestación, lactancia y destete), con excepción de las células estimuladas con PMA (+Zn, 9s, PMA) cuyo número es significativamente mayor en comparación con las células que no fueron estimuladas (+Zn, 9s) y las que se estimularon con ionomicina de calcio (+Zn, 9s, I) (Gráficas 10 y 11). Cuando se comparan los grupos testigo entre sí (-Zn, 9s) (Gráfica 12) no se encuentran diferencias significativas. Estos resultados sugieren que el zinc presente en las células de los ratones suplementados durante 9 semanas está interactuando con el PMA, favoreciendo la secreción del interferón gamma, se ha descrito en la literatura que el blanco de acción del PMA en la célula T es la Proteína cinasa C (PKC) ⁽³⁰⁾, dicha proteína es importante en la activación del factor de transcripción NF- κ B involucrado en la síntesis del interferón gamma ^(10, 30), el zinc mantiene la estructura terciaria de la PKC e interviene en la activación de la misma, el zinc además tiene un papel importante

en la estabilización de la estructura del factor de transcripción NF- κ B ^(30, 32).

Estos resultados muestran claramente que el zinc administrado en el suplemento oral en una dosis de 500 mg/L a ratones en etapas perinatales, es capaz de modular la respuesta inmune, de manera dependiente del tiempo de suplementación, lo cual apoya los resultados obtenidos en otras investigaciones ^(18, 19) en donde al administrar la misma dosis en el agua de beber a ratones BALB/c se observó un incremento en el índice fagocítico, así como en la secreción de citocinas como la IL-1, IL-12 y el factor de necrosis tumoral alfa. Cuando el periodo de suplementación abarcó las etapas de gestación y lactancia (6s) dicho incremento fue mayor que cuando se administró el suplemento durante los periodos de gestación, lactancia y destete (9s). Al mismo tiempo, en esos estudios se encontró que la concentración del elemento en tejidos como el timo y el hígado se incrementó de manera gradual después de 9 semanas de tratamiento. Otras investigaciones han mostrado que la suplementación prolongada de zinc incrementa la concentración del mismo en linfocitos y granulocitos ⁽¹⁰⁾, lo cual muestra que la exposición prolongada al suplemento trae como consecuencia una acumulación de zinc en otros órganos que puede tener consecuencias nocivas para el sistema inmune.

Otros estudios realizados en humanos han mostrado, por ejemplo, un incremento en el peso al nacer dependiente del tiempo de suplementación: cuando esta inició en el primer trimestre el efecto fue mayor que cuando inició en el tercer trimestre ^(7, 13, 14). Al parecer, la suplementación con zinc tiene un mayor efecto en las etapas en las cuales la velocidad de crecimiento es mayor, lo que no permite que haya una acumulación excesiva del elemento en el organismo, permitiendo un mejor aprovechamiento del zinc suministrado ⁽¹⁶⁾.

El zinc tiene un importante papel como estabilizador de membranas, la deficiencia del mismo altera la composición de la membrana plasmática debido a cambios en el contenido lipídico ⁽³⁸⁾, además, se altera la activación de canales iónicos y el

ensamblaje de receptores de superficie, por lo que se ve afectada la iniciación o inhibición de las señales de transducción dentro de la célula ⁽²⁰⁾, por lo que la suplementación con zinc puede coadyuvar en proporcionar a las células la estabilidad necesaria en las membranas para un óptimo funcionamiento. Al mismo tiempo puede tener un efecto modulador en la inducción de señales al interior de la célula, por lo que el incremento en el periodo de suplementación puede causar una saturación que afecte dichos mecanismos.

Los resultados del presente trabajo que muestran un incremento en el número de células productoras de interferón gamma apoyan los obtenidos en el Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química de la UNAM con la IL-12. Así, la suplementación oral con zinc en una dosis de 500 mg/L durante las etapas de gestación y lactancia está favoreciendo la producción de IL-12 y en consecuencia la del interferón gamma, lo que traerá como consecuencia una mejor respuesta en el individuo ante diversos agentes patógenos presentes en el medio ambiente en las etapas en las cuales se sabe es más susceptible.

El incremento del número de células productoras de interferón gamma de ratones suplementados *in vivo* con zinc, complementa otros trabajos de investigación, en donde se ha observado que el zinc adicionado *in vitro* en concentraciones estimulantes a cultivos de células mononucleares de sangre periférica induce la secreción de citocinas como la IL-1, el TNF-alfa y el interferón gamma ⁽²⁰⁾. El zinc puede estar influenciando la activación de los factores de transcripción involucrados en la síntesis del interferón gamma, como puede ser el factor NF- κ B, cuya activación al parecer es dependiente del zinc ⁽²⁹⁾. Por otra parte, se sabe que el zinc incrementa la actividad de la proteína cinasa C (PKC), a pesar de no formar parte de su centro activo como lo hace el calcio, sin embargo, contribuye de manera importante en la estabilización de su estructura (Figura 3) ^(4, 20, 38).

Por lo tanto, se hace indispensable continuar el estudio de los efectos de la suplementación con zinc sobre los diferentes componentes del sistema inmune en diferentes etapas de la vida, así como su relación con otros micronutrientes.

8. Conclusiones

Las condiciones óptimas de cultivo de células de bazo para la determinación del número de células secretoras de interferón gamma mediante el ensayo ELISpot son: 10^5 células por pozo y 18 horas como periodo de incubación.

El ensayo ELISpot es una técnica que nos permite estudiar los efectos de la suplementación con zinc sobre el número de células secretoras de interferón gamma en ratones en etapas perinatales, se puede implementar en el estudio de otras citocinas ya que es una prueba muy sensible.

El zinc administrado en el agua de beber en una dosis de 500 mg/L a ratones BALB/c es capaz de modular positivamente la producción de citocinas de tipo Th1 como el interferón gamma en las etapas de gestación y lactancia.

Referencias

- 1- Vallee BL and Falchuk KH. The Biochemical Basis of zinc Physiology. *Physiol Rev*, **73(1)**: 79-118, 1993
- 2- Rosado J, Deficiencia de zinc y sus implicaciones funcionales. *Salud Pública Mex*, **40**: 181-188, 1998
- 3- Takagi H, Nagamine T, Abe T, et al. Zinc supplementation enhances the response to interferon therapy in patients with chronic hepatitisC, *J Viral Hepatitis*, **8**: 367-371, 2001
- 4- Rink L and Kirchner H, Zinc-Altered immune function and cytokine production, *J Nutr*, **130**: 1407S-1411S, 2000
- 5- Fraker P, King LE, Laakko T, et al. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J Nutr*, **130**: 1399s-1406s, 2000
- 6- Krebs N, Bioavailability of Dietary Supplements and Impact of Physiologic State Infants, Children and Adolescents, *J Nutr*, **131**: 1351S-1354S, 2001
- 7- King JC, Determinants of maternal zinc status during pregnancy, *Am J Clin Nutr*, **71(suppl)**: 1334S-1343S, 2000
- 8- Krebs N, Overview of Zinc Absorption and Excretion in the Human Gastrointestinal Tract, *J Nutr*, **130**: 1374S-1377S. 2000
- 9- Wellinghausen N and Rink L, The significance of zinc leukocyte biology, *J Leukoc Biol*, **64**: 571-577; 1998
- 10- Prasad AS, Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 Cytokine Shifts, *The J Infect Dis*, **182(Suppl 1)**: S62-S68, 2000
- 11- Jalla S, Westcott J, Steim M, et al. Zinc Absorption and Exchangeable Zinc Pool Sizes in Breast-Fed Infants Fed Meat or Cereal as First Complementary Food. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **34**: 35-41, 2002
- 12- Rivera J, Gonzalez T, Flores M, et al. Multiple micronutrient supplementation increases the growth of Mexican infants, *Am J Clin Nutr*, **74**: 657-663, 2001
- 13- Parul C, Micronutrients and reproductive health issues: An international perspective, *J Nutr*, **133**: 1969S-1973S, 2003

- 14-Osendarp S, Raaij J, Arifeen SE, et al.** A randomized, placebo-controlled trial of the effect of zinc supplementation during pregnancy on pregnancy outcome in Bangladeshi urban poor, *Am J Clin Nutr*, **71**: 114-119, **2000**
- 15-Sian L, Krebs NF, Wetscott JE, et al.** Zinc homeostasis during lactation in population with a low zinc intake, *Am J Clin Nutr*, **75**: 99-103, **2002**
- 16-Krebs N,** Dietary Zinc and Iron Sources, Physical Growth and Cognitive Development of Breastfed Infants. *J Nutr*, **130**: 358S-360S, **2000**
- 17-Doménech E, Díaz NM, Barroso F, et al.** Zinc and perinatal growth. *Early Hum Dev*, **65 Suppl**: S111-S117, **2001**
- 18-Lastra MD, Pastelin R, Aguilar AE, et al.** Increment of Immune Responses in Mice Perinatal Stages After Zinc Supplementation, *Arch Med Res*, **28(1)**: 67-72, **1997**
- 19-Lastra MD, Pastelin R, Aguilar AE, et al.** Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response, *J Trace Elem Med Biol*, **15**: 5-10, **2001**
- 20-Wellinghausen N, Fisher A, Kirchner H, et al.** Interaction of Zinc Ions with Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Cellular Immunology*, **171**: 255-261, **1996**
- 21-Meager A,** Biological assays for interferons. *J Immunol Methods*, **261**: 21-36, **2002**
- 22-Quijano M and Prats P,** Mecanismos de señalización para el IFN-gamma, *BEB*, **20(3)**: 152-157, **2001**
- 23-Bach EA, Aguet M, and Schreiber D,** The IFN-gamma Receptor: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Annu Rev Immunol*, **15**: 563-91, **1997**
- 24-Decker T, Stockinger S, Karaghiosoff M, et al.** IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest*, **109**: 1271-1277, **2002**
- 25-Goodsell D,** The molecular perspective: Interferons, *Stem cells*, **19**: 467-468, **2001**
- 26-Stober D, Schirmbeck R, and Reimann J,** IL-12/IL-18-Dependent IFN-gamma Release by Murine Dendritic Cells, *J Immunol*, **167**: 957-965, **2001**
- 27-Murphy K, Ouyang W, Farrar JD, et al.** Signaling and Transcription in T helper Development. *Annu Rev Immunol*, **18**: 451-494, **2000**

- 28-Murphy K and Reiner SL, The lineage decisions of helper T cells, *Nature Reviews*, 2: December, 933-944, 2002
- 29-Fragoso G, Lastra MD, Aguilar AE, et al. Effect of oral zinc supplementation upon *Taenia crassiceps* murine cisticercosis, *J Parasitol*, 87(5): 1034-9, 2001
- 30-Isakov N and Altman A, Protein Kinase C θ in T cell activation, *Annu Rev Immunol*, 20: 761-794, 2002
- 31-Miyamoto S, Kimball SR and Safer B, Signal transduction pathways that contribute to increased protein synthesis during T-cell activation. *Biochim Biophys Acta*, 1494: 28-42. 2000
- 32-Korichneva I, Hoyos B, Chua R, et al. Zinc Release from Protein Kinase C as the Common Event during Activation by Lipid Second Messenger or Reactive Oxygen, *J Biol Chem*, 277(46): 44327-44331, 2002
- 33-Bailey T, Stark S, Grant A, et al. A multidonor ELISpot study of IL-1B, IL-2, IL-4, IL-6, IL-13, IFN-gamma, and TNF-alpha release by cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods*, 270: 171-182, 2002
- 34-Ozenci V, Kouwenhoven M, Press R, et al. IL-12 ELISPOT Assays to detect and Enumerate IL-12 Secreting Cells, *Cytokine*, 12(8): 1218-1224, 2000
- 35-Carvalho L, Hafalla JCR, and Zavala F, ELISpot assay to measure antigen-specific Murine CD8+ T cells responses. *J Immunol Methods*, 252: 207-218, 2001
- 36-Ekerfelt C, Emerudh J and Jenmalm MC, Detection of spontaneous and antigen-induced human interleukin-4 responses in vitro: comparison of ELISpot, a novel ELISA and real time RT-PCR. *J Immunol Methods*, 260: 55-67, 2002
- 37-Asemissen AM, Nagorsen D, Keilholz U, et al. Flow Cytometric Determination of intracellular or secreted IFN-gamma for the quantification of antigen reactive T cells. *J Immunol Methods*, 51: 101-108, 2001
- 38-O'Dell B, Role of Zinc in Plasma Membrane Function, *J Nutr*, 130: 1432S-1436S, 2000
- 39-Encuesta Nacional de Nutrición 1999

- 40-Salas M and Kirchner H**, Induction of interferon-gamma in human leukocyte cultures stimulated by Zn²⁺, *Clin Immunol Immunopathol*, **45(2)**: 139-142, **1987**
- 41-Yamada S and Yoshimura A**, Computer Modeling of JAK/STAT Signal Transduction Pathway, *Genome Informatics*, **12**: 282-283, **2001**
- 42-Yang J, Murphy TL, Ouyang W, et al.** Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4⁺ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation, *Eur J Immunol*, **29**: 548-555, **1999**