

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



ACTIVACION DEL MACROFAGO POR *Escherichia coli*  
Y *Staphylococcus aureus* BAJO LA INFLUENCIA  
DEL ZINC

POR

VIOLETA CECILIA TINOCO CABRIALES

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN INMUNOLOGIA

FEBRERO DE 1999

TD  
QR185  
.8  
.M3  
T5  
C.1



1080085188

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVOLEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ACTIVACIÓN DEL MACRÓFAGO POR *Escherichia coli* Y  
*Staphylococcus aureus* BAJO LA INFLUENCIA DEL ZINC**

**POR**

**VIOLETA CECILIA TINOCO CABRIALES**

**Como requisito para obtener el Grado DE DOCTOR  
EN CIENCIAS con Especialidad en INMUNOLOGIA**


**Febrero ,1999**

TD  
QR 85  
M N S  
X



**ACTIVACION DEL MACROFAGO POR *Escherichia Coli* Y  
*Staphylococcus aureus* BAJO LA INFLUENCIA DEL ZINC**

**Aprobación de la Tesis:**




---

**DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA**  
Presidente



---

**DR. CARLOS E. MEDINA DE LA GARZA**  
Secretario



---

**DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA**  
1er. Vocal



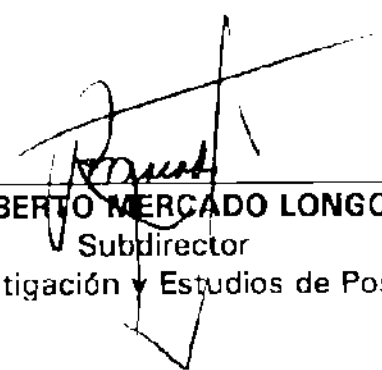
---

**DRA. ELIZABETH E. MANNICK**  
2do. Vocal



---

**DR. MARK JAMES**  
3er. Vocal



---

**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado

*ACTIVACIÓN DEL MACRÓFAGO POR Escherichia coli Y Staphylococcus aureus BAJO LA INFLUENCIA DEL ZINC.*

*Presentado por : M.C. VIOLETA CECILIA TINOCO CABRIALES*

*Este trabajo se realizó en el en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Departamento de Pediatría de Louisiana State University ( LSU ), en Nueva Orleans LA, bajo la asesoría de la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza y la Co-asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona y de la Dra. Elizabeth E. Mannick.*

## **DEDICATORIA :**

**A mi hija NADHEZDA**

**A todos aquellos Familiares, Maestros , Amigos y Compañeros que compartieron conmigo ésta increíble y agotadora búsqueda del Ph.D.**

**Mi amor y gratitud para aquellos que dejaron solo su Recuerdo y Energía en esta tierra, pero al fin suficiente para darme el coraje de permanecer hasta concluir.**



## **INDICE GENERAL**

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINA</b>
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17
LISTA DE REACTIVOS	37
RESULTADOS	45
DISCUSIÓN	68
DISCUSIÓN GENERAL	76
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA	83

## INTRODUCCIÓN

Cuando es inyectado LPS ( Lipopolisacárido ), en ratones normales o ratas de laboratorio, se produce una rápida y significativa caída del zinc en suero ( hipozinquemia ), que ha demostrado ser una respuesta dosis-dependiente ( 1 ). Este mismo fenómeno ha sido descrito en humanos , tanto en infecciones Bacterianas ( 2 ), como en virales ( 3 ) y en otras situaciones que afectan tanto al hombre como a animales de experimentación ( 4, 5 , 6 ) . Dicha disminución del zinc en suero o plasma , se demostró que era debida a una proteína intermediaria llamada pirógeno - endógeno producida por leucocitos ( 2 ).

Kampschmidt y Upchurch ( 7 ), fueron capaces de reproducir este mismo fenómeno en ratas utilizando tanto pirógeno - endógeno ( obtenido de leucocitos de peritoneo de conejo ), como inyecciones de endotoxina , confirmando así las investigaciones hechas por Pekarck y Beisel ( 2 ).

Este mediador endógeno-leucocitario , fué caracterizado como una proteína lábil al calor y de bajo peso molecular , que aparecía en el plasma de la rata dentro de las dos horas posteriores de iniciada la endotoxemia . Dicha proteína fue reconocida como una monocina de respuesta de fase aguda ó interleucina, la cual inicia la redistribución del zinc en los tejidos del huésped ( 8 , 9 , 10 ).

Las Metalotioneínas , son proteínas de alto contenido en cisteína y de bajo peso molecular , las cuales poseen una alta afinidad para metales pesados , incluyendo cadmio , mercurio y zinc y son involucradas en los mecanismos fisio-patológicos del metabolismo del zinc asociado a infecciones bacterianas. La disminución del zinc plasmático ha sido explicado por un acelerado flujo del zinc

desde el plasma hacia el hígado , donde son producidas las Metalotioneínas ( 11 , 12 ) . Desde el punto de vista bacteriano , ratas infectadas con Salmonella typhimurium , presentaron una caída del zinc plasmático lo que ayudo a incrementar su resistencia a la morbilidad y mortalidad en estos animales ( 13 ) .

Estos cambios de disminución del zinc en el metabolismo mineral , aumentan la resistencia del huésped hacia la bacteria patógena invasora , la cual requiere significativas cantidades de hierro y zinc para su metabolismo y división ( 14 ) ; cuando las bacterias son privadas de suficiente cantidad de estos nutrientes , su división es inhibida y consecuentemente su virulencia . La quelación del zinc sérico por  $\alpha$ 2-macroglobulina ( 15 ) y el secuestro de hierro y zinc por el hígado es una parte integral de la respuesta inmune . Este papel “protector” llevado a cabo por la privación nutricional hacia los microorganismos invasores , ha sido llamada “Inmunidad Nutricional “ y es de particular importancia , como un mecanismo anterior a los mecanismos específicos humorales y celulares de la respuesta inmune ( 16 ) . Todo parece indicar , que dicho mecanismo protector es solo uno más de los efectos de la hipozinquemia y que el verdadero significado tomando en cuenta la liberación de IL-1, tiene un enfoque a nivel de reguladores transcripcionales que no ha sido descrito . Se sabe que los leucocitos humanos contienen el 3 % del zinc total de la sangre ( 17 ) y que el leucocito individual es relativamente rico en este metal , contiene 25 veces más que el eritrocito ( 18 ) ; existiendo además un intercambio libre entre el contenido de zinc del plasma y el del leucocito ( 19 ) , por lo que podríamos postular que este descenso del zinc en el plasma y la célula podría funcionar como un switch

, para activar algunos factores de transcripción existentes a nivel celular como son : NF- $\kappa$ B y AP-1.

#### I.- FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN :

*FACTOR NF- $\kappa$ B.*- Fue primero identificado como un regulador de la expresión del gene de la cadena ligera kappa en linfocitos " B " murinos ( 20 , 21 ) , pero ha sido subsecuentemente encontrado en diferentes células y algunas de las diferentes proteínas de NF- $\kappa$ B ya han sido caracterizadas ( 22 , 23 ) .

La forma activa del factor NF- $\kappa$ B esta formada por un heterodímero , el cual regularmente consiste de dos proteínas : la subunidad p65 , también llamada rel A y la subunidad p50 ( 24 ) . Otras subunidades tales como : rel , rel B , v-rel y p52 también pueden ser parte del NF- $\kappa$ B activado y tal parece que estas diferentes formas de NF- $\kappa$ B pueden activar diferentes grupos de genes . En células sin estimular , el factor NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma unido a proteínas inhibitorias como son : I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$  , las cuales previenen que dicho factor entre al núcleo ( 25 ) . Cuando éstas células son estimuladas por agentes como ésteres del phorbol , que activan a la protein-Kinasa "C" ( PKC ) , se efectúa la disociación in-vivo del complejo NF- $\kappa$ B de la proteína inhibitoria I $\kappa$ B y su consiguiente emigración hacia el núcleo de la célula ( 26 , 27 ) .

La fosforilación que conduce a la disociación de NF- $\kappa$ B y su inhibidor , requiere del proceso de conjugación con ubiquitina y de degradación por el proteosoma ( 28 ) . La liberación de NF- $\kappa$ B de I $\kappa$ B , conduce al pasaje de NF-

$\kappa$ B dentro del núcleo , donde se une a secuencias específicas en las regiones promotoras de algunos genes . Puesto que el gene  $I\kappa B\alpha$  ( previamente llamado MAD-3 ) ( 29 ) , tiene una secuencia de reconocimiento  $\kappa$ B en su región promotora , NF- $\kappa$ B induce la síntesis de  $I\kappa B\alpha$  , la cual entra al núcleo para unirse a NF- $\kappa$ B activado y lo transporta al citoplasma , terminando así con la expresión del gene ( 30 ).  $I\kappa B-\alpha$  se une preferentemente a la subunidad p65 , previniendo de esta manera el traslado del complejo NF- $\kappa$ B al núcleo ( 31 ) .

NF-  $\kappa$ B regula la expresión de algunos genes involucrados tanto en la respuesta inflamatoria como en la respuesta inmune , sin embargo no es el único factor de transcripción involucrado en regular esos genes , y frecuentemente funciona junto con otros factores de transcripción, tales como Activador de Proteína - 1 ( AP-1 ) y el factor nuclear de Interleucina - 6 ( 32 ) .

#### *ESTIMULOS QUE ACTIVAN NF- $\kappa$ B ( 22, 32 ) .*

##### 1.—CITOCINAS :

Factor de Necrosis Tumoral-  $\alpha$

Interleucina-  $1\beta$

Interleucina - 17

##### 2.-ACTIVADORES DE PROTEIN- KINASA "C":

Esteres del forbol

Factor activador de plaquetas.

### 3.-OXIDANTES :

Peróxido de Hidrógeno.

Ozono.

### 4.-VIRUS :

Rhinovirus.

Virus de la Influenza

Virus Epstein- Barr

Citomegalovirus

Adenovirus

Virus de inmunodeficiencia tipo-1

Virus de la Hepatitis "B".

Herpes virus – 6

### 5.-MITÓGENOS DE CÉLULAS 'T' :

Fitohemaglutinina

Concanavalina

Anti- CD3

Anti- CD2

Anti- CD28

### 6.- PRODUCTOS BACTERIANOS :

Lipopolisacárido

Exotoxina B

Toxina-1 del síndrome de shock tóxico

Muramilpéptidos

## 7.- AGENTES FÍSICOS :

Luz Ultra Violeta

Radiación -  $\gamma$

*Existe una serie de proteínas que son reguladas por el factor NF-  $\kappa$ B entre las que se encuentran ( 22 , 23 ) :*

### 1.-CITOCINAS PROINFLAMATORIAS :

Factor de Necrosis Tumoral - $\alpha$

Interleucina -  $1\beta$

Interleucina - 2

Interleucina - 6

Factor estimulante de la colonia de Macrófagos.

Factor estimulante de la colonia de Granulocitos.

### 2.-CITOCINAS QUIMIOTÁCTICAS :

Interleucina - 8

Proteína inflamatoria del Macrófago  $1-\alpha$

Proteína quimiotáctica para Macrófago- 1

Exotaxina

### 3.-ENZIMAS INFLAMATORIAS :

Sintetasa inducible del óxido-nítrico

Ciclooxigenasa – 2 Inducible

Lipooxigenasa - 5

Fosfolipasa A<sub>2</sub>

### 4.-MOLECULAS DE ADHESIÓN CELULAR :

Molecula de adhesión endotelial del leucocito (ELAM-1)

Molecula de adhesión celular vascular ( VCAM- 1)

Molecula de adhesión intercelular – 1 ( ICAM- 1)

### 5.-INMUNORECEPTORES :

Receptor celular “T”-β

Receptor celular “I”-α

Complejo mayor de Histocompatibilidad clase I ( H-2K<sup>b</sup> ).

Complejo mayor de Histocompatibilidad clase II ( E α<sup>d</sup> )

### 6.- VIRUS :

Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

Citomegalovirus

Adenovirus



## 7.-FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y SUBUNIDADES :

NF- $\kappa$ B precursor p105

I $\kappa$ B- $\alpha$

c-myc

Los factores de Transcripción juegan un papel central en convertir señales extracelulares dentro de los cambios en la expresión de genes específicos y además de regular complejos procesos biológicos ( 33 ). La actividad llevada a cabo por algunos factores de transcripción es modulada por la fosforilación, tal es el caso de AP-1 ( Activador de Proteína - 1 ) y NF- $\kappa$ B ( Factor nuclear KB ) . La señal de fosforilación produce activación postranslacional de estos factores ,los cuales inducen la expresión de otros genes, que a su vez codifican para otros factores de transcripción . Tales cascadas de activación pueden generar por largo tiempo señales nucleares ( 34 ) .

*ACTIVADOR DE PROTEÍNA ( AP-1 )* .- Fue primero identificado como un factor transcripcional que se une a un elemento- cis del promotor de varios genes como el de la metalotioneína humana IIa ( hMTIIa ), la proteína p40 del Virus de Simio 40 y algunos genes de respuesta a ésteres de forbol . AP-1, es requerido para una actividad óptima basal del promotor hMTIIa tanto in-vivo como in-vitro ( 35 , 36 ) . Dicho factor fue caracterizado por su habilidad para alterar la expresión de genes en respuesta a factores de crecimiento , citocinas , promotores

de tumores , carcinógenos y expresión incrementada de varios oncogenes tales como src y ras ( 33 ).

AP-1 es un complejo multiproteico compuesto de los productos de la familia de los proto-oncogenes JUN y FOS . Estas proteínas tienen que dimerizar para ser capaces de unirse al sitio de reconocimiento de AP- 1 , también conocido como el TPA – elemento responsable ( TRE ); lo cual significa que TRE media una respuesta transcripcional inducida por un ester de forbol que es un promotor de tumores tal como : 12 – o- tetradecanoylphorbol 13 acetato = TPA ( 35 ). Las proteínas JUN pueden formar homodimeros ó heterodimeros con las proteínas FOS , mientras las proteínas FOS no pueden formar homodimeros y además no son capaces de unirse al DNA por si mismas ( 33 ). La transcripción de JUN es directamente estimulada por su propio gene y además es capaz de regular la expresión del gene FOS ( 38 ). Tres miembros de la familia JUN / AP-1 fueron identificados en Biblioteca de cDNA de ratón : c-JUN , JUN-B y JUN-D , cada proteína es capaz de unirse al sitio de consenso de AP-1 ( TGACTCA ) y son similares en sus propiedades de unirse al DNA , en la formación de dimeros , y en su interacción con FOS ( 39 ). Homodimeros c-JUN , exhiben fuerte capacidad de activación , mientras homodimeros JUN-B y JUN-D son pobres transactivadores y reprimen la actividad de c-JUN ( 33 ). La formación de heterodimeros de cualquier proteína JUN con c-FOS resulta en la generación de potentes activadores y parte de esta aumentada actividad es debida a la estabilidad de este heterodimero ( 40 ).

La transcripción del protooncogene c-FOS es inducida en forma rápida ( 5 minutos ) por suero y por algunos factores como el Factor epidérmico de

crecimiento ( EGF ), el promotor de tumores forbol 12-miristato-13-acetato y la insulina. El facilitador de c-FOS , contiene un elemento de secuencia llamado elemento de respuesta del suero ( SRE )( 41 ). La dimerización de los genes FOS-JUN es mediada por un cierre de Leucinas ,que forma una  $\alpha$  - Hélice , en el cual cada siete aminoácidos , es una leucina . El contacto con el DNA ocurre por la vía de la región básica , la cual es localizada inmediatamente corriente arriba del cierre de leucinas y el cual es caracterizado por la abundancia de residuos cargados positivamente ( 42 , 43 ) ; finalmente , otros miembros identificados de esta familia son : FOS B, Fra 1 y Fra 2 ( 33 ) .

## II.- CITOCINAS :

En infecciones bacterianas ó parasitarias y en shock séptico , encontramos una serie de reacciones locales ó sistémicas en el organismo que se conocen como de "Respuesta de Fase Aguda"( 44 ) . La reacción local incluye : dilatación De los vasos sanguíneos , alteración en el flujo y coagulación de la sangre , migración de neutrófilos y macrófagos , liberación de proteasas lisosomales y formación de mediadores de la inflamación. Estos mediadores causan una reacción sistémica caracterizada por fiebre , dolor , leucocitosis , disminución en plasma de los niveles de zinc y hierro e incrementada síntesis de las *Proteínas de Fase Aguda* ( 45 ) .Existe evidencia de que las citocinas son involucradas en la sepsis,lo cual proviene de observaciones de que al administrar recombinante IL-1 y TNF , cada uno por separado ó en combinación , se producen alteraciones hemodinámicas y hematológicas que son características del shock séptico en

humanos ( 46 , 47 ). También ha sido demostrado que el TNF- $\alpha$  se incrementa después de la administración de pequeñas cantidades de endotoxina en voluntarios humanos y finalmente la inmunización pasiva con anticuerpos contra TNF- $\alpha$  protege a los animales contra los efectos letales de la endotoxina y de la bacteria ( 48 , 49 ).

Las actividades biológicas de IL-6 parcialmente se traslapan con aquellas de IL-1 , ya que algunos de los efectos pleiotrópicos de IL-1 se sabe actualmente que son causados por IL-6 ó por acciones sinérgicas de IL-1 e IL-6 . IL-6 estimula la síntesis de proteínas hepáticas durante la respuesta de fase aguda , y actúa como un pirógeno-endógeno ( 50 ). Fong et al ( 51 ) , reportaron que la administración de endotoxina ( 20 U/Kg ) en humanos , produce una elevación en IFN e IL-6 circulante ,alcanzando su máximo pico entre las dos y cuatro horas después de la administración de la endotoxina. También se ha reportado que las monocinas IL-1 e TNF- $\alpha$  son potentes inductores de IL-6 ( 52 ). IL-6 más que IL-1 es un mediador de la producción de Metalotioneína ( MT ) y cambia el metabolismo del zinc . Ambas , IL-1 e IL-6 estimulan la liberación de corticotropina en cultivo de células hipofisarias , sugiriendo así que estas citocinas ,incrementan los niveles de glucocorticoides ( 53 ) . Previos estudios han demostrado que los glucocorticoides estimulan la síntesis de MT en hepatocitos , tanto in-vivo como in-vitro ( 54 ,55 ). Esta habilidad es debida a la presencia de un elemento con afinidad para glucocorticoides en la región promotora de los genes de MT ( 56 ) . Presumiblemente , los glucocorticoides modulan también a los receptores para la IL-6 en los hepatocitos ó en los componentes de la señal

intracelular de transducción dirigida por IL-6 ; se sabe que los glucocorticoides pueden actuar en el hepatocito incrementando la producción de MT , e inhibiendo la liberación de IL-1 por el macrófago ( 53 ). Además en presencia de glucocorticoides , la IL-6 incrementa la producción de MT y la incorporación de zinc por los hepatocitos . Esta función de incrementar la producción de MT hepática y la acumulación de zinc , podría ser para proporcionar protección celular ( 57 ) .

FNT-  $\alpha$  es una monocina que afecta directamente el estado funcional de algunos tejidos, produce la necrosis hemorrágica de los tumores en animales , supresión de la síntesis de lípidos en tejido adiposo , aumenta la actividad fagocitaria de los granulocitos y actúa también como pirógeno endógeno ( 58 ,59 ). Algunos de sus efectos son similares a aquellos de IL-1 y son característicos de la respuesta de fase aguda , mediando cambios en la expresión de múltiples productos genéticos del hígado como son algunas proteínas del complemento como el factor B y el C<sub>3</sub> ( 60 ) . Algunas características han sugerido que FNT-  $\alpha$  , también es importante, mediador de la respuesta de fase aguda , por lo siguiente :

1.-FNT-  $\alpha$  radiomarcado se concentra en el hígado después de administración intravenosa.

2.-FNT -  $\alpha$  puede ser liberado en más alta concentración que IL-1 bajo ciertas circunstancias por ejemplo en conejos inyectados con endotoxina.

3.-FNT -  $\alpha$  media cambios en la expresión genética en células de hepatoma que poseen un pequeño número de receptores para TNF ( 61 ).

#### *FUNCIONES DEL ZINC :*

El zinc , es rutinariamente adicionado a buffers para el aislamiento de fracciones de la membrana celular. Sirve para promover cohesividad y mantener la actividad de las enzimas unidas a la membrana ( 62 ) y para el ensamble in-vitro de los microtúbulos ( 63 ). Además han sido propuestas las siguientes funciones del zinc sobre la superficie celular :

- 1.- Interacciona con enzimas como son ATPasas , y Fosfolipasas  $A_2$  controlando la integridad de la membrana ( 64 ).
- 2.- Interacciona con grupos thiol de macromoléculas para la formación de mercapéptidos de zinc , incrementando así la integridad de la membrana ( 65 ).
- 3.- Interfiere con la peroxidación de lípidos , ya que se asume que el zinc por interferir con la oxidación de NADPH , inhibe la secuencia de reacciones en la peroxidación de los lípidos ( 66 , 67 ) que causa estabilización de los lisosomas . Inhibe la fosfodiesterasa y ocasiona un incremento en el nivel de AMP-c restringiendo así la liberación de las enzimas lisosomas en las células fagocíticas ( 66, 68,69 ).

## ÓXIDO NÍTRICO :

El óxido nítrico ( NO ), fué llamado la molécula del año en 1992 , existen en la literatura científica una gran cantidad de artículos que se refieren a aspectos biológicos y patológicos , que involucran al óxido nítrico ( 70 ). Dos aspectos en la generación del NO son de particular interés :

- 1.-El papel potencial del NO como una molécula citotóxica que contribuye como armazón antimicrobiana de los fagocitos .
- 2.-El papel del NO como un vasodilatador en la inflamación y mediador del choque séptico ( 71 ) .

El NO es producido en el humano y en animales de laboratorio por NO sintetasas ( NOS ) .Se han identificado isoenzimas de NOS ( 72 ) como : isoforma inducible ( iNOS ) e isoforma constitutiva ( cNOS ) . Se ha propuesto que el NO producido en los fagocitos mononucleares por medio de iNOS , tiene actividad antibacteriana , antifúngica y antiprotozoaria ( 73 ) . En macrófagos animales , notablemente macrófagos murinos , la síntesis de NO y su regulación , ha sido bien caracterizada ( 74 ) . Esto incluye el consumo de substratos L-Arginina y O<sub>2</sub> , producción de el co-producto L-Citrulina , y la necesidad de cofactores reducidos como : Fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido ( NADPH ) , flavin adenin dinucleótido ( FAD ) y tetrahydrobiopterin ( BH<sub>4</sub> ) ( 75 ) . La mayoría de los estudios que han valorado la función de la formación de NO incluyendo su función como un producto antimicrobiano , dependen de la cuantificación de nitritos , el cual es un producto de oxidación formado espontáneamente del NO en sistemas biológicos ( 71 ) .

Dada la frecuencia de infecciones bacterianas en humanos, ya sean como un proceso agudo ó como un proceso crónico ó como un cuadro endotóxico ó septicémico, parece importante apuntar hacia algunos fenómenos biológicos característicos que acompañen a dichos procesos, como podría ser la baja de zinc en plasma ó suero, para tratar de entender mejor la interrelación que juegan los mecanismos homeostásicos del cuerpo humano.

Todos los factores descritos anteriormente están conectados entre sí; el factor NF- $\kappa$ B, ha sido estudiado en procesos infecciosos e inflamatorios al igual que el óxido nítrico (NO) dentro del disparo inicial de la respuesta inmune inespecífica, mientras que el factor activador AP-1, parece tener cierta tendencia al nivel de elementos como es el zinc puesto que va a actuar en combinación con la metalotioneína (MT).

Ambos factores transcripcionales, regulan la expresión de varias citocinas entre ellas IL-6 y FNT- $\alpha$ . IL-6 por un lado y como ya también fué referido, es estimulada durante esta baja de zinc, para dirigirse al hígado donde actúa a su vez estimulando la producción de proteínas de respuesta de fase aguda, que son tan importantes en el shock séptico. Por el otro lado, tenemos que el FNT- $\alpha$  es estimulado también por componentes bacterianos y modulado por los factores transcripcionales NF- $\kappa$ B, pero poco se conoce como esta interrelación se ve afectada por la concentración de zinc, por lo tanto para nuestro estudio nosotros planteamos la siguiente hipótesis.



## HIPÓTESIS

El zinc a concentraciones menores de la fisiológica modula la expresión de los factores transcripcionales NF- $\kappa$ B y AP-1 producidos por el macrófago y modula también la expresión de sus efectores pro-inflamatorios FNT- $\alpha$ , IL-6 y NO.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

**I.-CULTIVO CELULAR.**- Los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 (células leucémicas) se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATCC # TIB-71) y se mantuvieron en congelación en nitrógeno líquido hasta su cultivo en DMEM (medio basal de Eagle y modificado por Dulbecco) (76, 77), conteniendo 1000 mg/L de Glucosa 6 % de suero fetal de bovino, (cuyas unidades de endotoxina son menores de 0.3) (Gibco-BRL), 5,000 U.I. de Penicilina, 5,000 µgr / ml de Estreptomicina (Cellgro) y L-Glutamina en una concentración de 200 mM, 29.2 mg / ml (Cellgro). También se le adicionó 2.2 gr / Lto de bicarbonato de sodio antes de llevar el medio a un pH final de 7.36 para posteriormente ser esterilizado por filtración.

Los Macrófagos fueron descongelados, mantenidos en baño de agua a 37 °C por 10 minutos, y colocados en frascos para cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> (Costar Co.) con 10 - 12 ml. de DMEM suplementado. Posteriormente se incubaron a 37 °C con 10 % de CO<sub>2</sub> y en atmósfera húmeda por (24 - 48 hrs) (el color del medio se va acidificando conforme las células crecen), asegurándose de mantener ligeramente abierta la tapa del frasco para permitir la entrada del CO<sub>2</sub>. Las células cultivadas se adhirieron al fondo del frasco permitiendo su fácil observación al microscopio de fase invertido. Para coleccionar las células fue necesario raspar el fondo para desprenderlas con el raspador (Sarstedt Co.), recolectando la suspensión celular en un tubo estéril de 15 ml; (todo el proceso de cultivo fué bajo estrictas condiciones de esterilidad). Posteriormente se

centrifugó a 188 g por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y las células se traspasaron a un frasco nuevo de cultivo para iniciar el experimento, ó continuar creciendo la población celular.

**II.-MEDIO DE CULTIVO (DMEM), DEPLETADO DE ZINC.-** Para eliminar el zinc del medio de cultivo, fue utilizada una combinación de una resina de poliestireno insoluble y ácido iminodiacético, conocido como chelex 100 (Sigma). El proceso se realizó de la siguiente manera: se pesaron las siguientes sales: KCl = 400 mg / lto, MgSO<sub>4</sub> = 97.67 mgs, NaCl = 6,800 mgs, NaHCO<sub>3</sub> = 2,200 mgs y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O = 1400 mgs, todas las sales se mezclaron y se disolvieron en un litro de agua desionizada, agregándose posteriormente 10 ml de chelex. Se dejó esto en agitación constante y a 4 °C durante 24 hrs, separándose el chelex por decantación y posteriormente por centrifugación. A 500 ml de DMEM se le agregó 6 ml de chelex sin suero fetal bovino, dejándose en agitación constante y a 4 °C por 24 hrs., mientras que el suero fetal de bovino (SFB) fué tratado con 2 ml de chelex por cada 10 ml. de SFB, dejándose en agitación constante y a 4 °C durante 48 hrs., finalmente se mezclaron el medio de cultivo y el SFB que fueron quelados separadamente y se esterilizaron por filtración.

Por último se le agregó a dicho medio los siguientes cationes: 10 µl de una solución de 12.5 µg/ml. de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 10 µl de una solución de 2.5 mg en 500 ml. de MnCl<sub>2</sub> y 10 µl de una solución de 500 µgr / ml. de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, procediendo a filtrarse junto con el mismo medio de cultivo ( 78 ). Este medio depletado de zinc fué utilizado como BAJO en ZINC, mientras que al mismo

cuándo se le agregó 15 µl de un Stock de 10 mM de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  se le denominó como MEDIO en ZINC .

**III.-PREPARACIÓN DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS.-** Las bacterias que se utilizaron fueron Staphylococcus aureus ( gram positiva ) y Escherichia coli

( gram negativa ). La primera fue crecida en agar sangre a 37 °C por 24 hrs e identificada por su morfología colonial , la hemólisis , su reacción positiva a la coloración de gram de primera instancia , para posteriormente pasar a las pruebas específicas como son : la detección de coagulasa y la fermentación del manitol . Después de mantener el cultivo puro se procedió a sembrarlo en caldo de tripticase y soya al 3 % y se incubó por 24 hrs a 37°C para preparar una población a gran escala . Finalmente se ajustó con solución salina estéril al 0.85 % al tubo # 1 del Nefelómetro de Mc Farland para tener una población bacteriana de  $300,000 \times 10^6$  ; después se hicieron alíquotas de 50 ml y se congelaron a -20 °C hasta su uso.

Para el aislamiento e identificación de la Escherichia coli fue básicamente el mismo procedimiento ; Se sembró en medio de cultivo diferencial de eosina azul de metileno ( EMB ) el cual después de incubarlo a 37 °C por 24 hrs se presentó su característico brillo metálico . Se procedió a la confirmación mediante las siguientes pruebas bioquímicas : lactosa + ; fermentación de TSI = ácido / ácido e Indol + . ( 79 ) . Posteriormente se hizo crecer en caldo de tripticase y soya al 3 % durante 24 Hrs y a 37°C y se preparó una población

a gran escala, ajustándose al tubo # 1 del Nefelómetro de Mc Farland , conservándose finalmente en alíquotas de 50 ml a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Antes de ajustarse las poblaciones bacterianas al nefelómetro de Mc Farland, cada bacteria fue muerta por ebullición durante 1 - 2 hrs dependiendo del resultado negativo del control de viabilidad efectuado en caldo tripticase y agar sangre.

**IV.- FAGOCITOSIS.-** Para efectuar la fagocitosis , se ensayaron tres diferentes concentraciones de macrófagos :  $4 \times 10^6$  ,  $2 \times 10^6$  y  $1 \times 10^6$  , con dos diferentes concentraciones bacterianas  $600 \times 10^6$  y  $300 \times 10^6$  , durante 4 hrs de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  con 10 % de  $\text{CO}_2$  y 100 % de humedad relativa.

Tanto los macrófagos como las bacterias fueron suspendidas en 2 ml. de medio de cultivo ( DMEM ) hiperglucosado ( 4500 mg/L de glucosa ) y suplementado. La fagocitosis se evaluó al microscopio en preparaciones que fueron fijadas

al portaobjetos con metanol durante un minuto y posteriormente teñidas al Gram ( 80 , 81 ).

#### **V.- DISEÑO EXPERIMENTAL BÁSICO .**

Los macrófagos fueron lavados una vez con DMEM y suspendidos en 20 ml. del mismo medio de cultivo y contados en la cámara de Neubauer al microscopio , utilizando el colorante azul tripano al 0.4 % ( Sigma ). El diseño experimental se llevó a cabo con tres medios de cultivo conteniendo las diferentes concentraciones de zinc :

1-NORMAL.- Consistió de 10 ml del medio de cultivo normal con una población de macrófagos de  $10 \times 10^6$ .

2.-BAJO en ZINC.- Consistió de 10 ml del medio tratado con el quelante ( chelex ) para eliminar el zinc además de una población de macrófagos de  $10 \times 10^6$ .

3.- MEDIO en ZINC.- El mismo medio de cultivo anterior conteniendo  $15 \mu\text{l}$  de  $\text{ZnSO}_4$  10 mM y una población celular de  $10 \times 10^6$  macrófagos.

Los frascos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en 5 % de  $\text{CO}_2$  y atmósfera húmeda durante 40 hrs haciéndose dos observaciones al microscopio de fase invertido durante el crecimiento y multiplicación celular. Después de completar las 40 hrs se agregaron las bacterias y el LPS a probar , excepto al control .

Las concentraciones utilizadas de los antígenos fueron :

1.-*Control - Células + medio de cultivo.*

2.- *LPS = Células +  $100 \mu\text{l}$  de una concentración de  $100 \mu\text{g/ml}$  de LPS*

*(E. coli O26 : B6 ) .*

3.- *Bacteria gram negativa = Células + 5 ml de la población estandarizada a  $300 \times 10^6$  de E. coli.*

4.- *Bacteria gram positiva = Células + 5 ml de la población estandarizada a  $300 \times 10^6$  de S. aureus .*

Este mismo diseño experimental fue la base para la obtención de las muestras en diferentes tiempos de incubación .

## **VI-EXTRACCIÓN NUCLEAR DE PROTEÍNAS PARA LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE NF/ $\kappa$ B Y AP-1 ( 82, 83, 84 ).**

Las muestras que fueron utilizadas en la determinación de NF- $\kappa$ B y AP-1 fueron incubadas en las condiciones ya explicadas en el diseño experimental y durante un tiempo de dos hrs, al término del cual se cerraron los frascos y se colocaron en hielo. Posteriormente se rasparon uno por uno el fondo de los frascos, colectándose las muestras en tubos cónicos nuevos de 15 ml para posteriormente centrifugarse a 188 g por 5 min y continuar con los siguientes pasos:

- 1.-Las células fueron lavadas 1 ó 2 veces con PBS frío ( buffer salina - fosfato, pH = 7.4 )( Sigma ) y centrifugadas a 188 g durante 5 min a 4°C.
- 2.-Los sobrenadantes se removieron y los botones celulares se despegaron lentamente por la adición de 500  $\mu$ l del Buffer A con IGEPAL ( detergente ).
- 3.-Se incubó durante 7 min en hielo para posteriormente centrifugar a 188g por 5 a 4°C. El sobrenadante se aspiró y se desechó.
- 4.-El botón celular se lavó una vez más con buffer A pero sin IGEPAL, centrifugándose a 188 g durante 5 min y a 4°C. El sobrenadante se eliminó quedando un botón nuclear claro en el fondo del tubo.
- 5.-Se adicionaron 7  $\mu$ l de buffer B al botón nuclear subiendo y bajando la suspensión hasta que los núcleos se rompieron y que el botón nuclear llega a ser viscoso. ( se puede corroborar este punto utilizando Yoduro de Propidio en concentración final de 5  $\mu$ g/ml y microscopio de Fluorescencia )

6.-Posteriormente se incubó por 10 min. a 4°C y se adicionaron 70 µl del buffer C ( ó 10 veces el volumen del buffer B usado ) centrifugándose a alta velocidad 8,160 g por 15 min y a 4°C.

7.-Se colectaron los sobrenadantes donde se encontraban presentes las proteínas nucleares.

8.- Para la determinación de proteínas se tomaron de 2-5 µl del sobrenadante.

9.-Las proteínas nucleares se congelaron en alíquotas a -70°C hasta su uso.

#### ***VII.-DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS ( 85 ) :***

1.- Se sacaron las muestras de las proteínas nucleares fuera de el congelador y se colocaron en hielo hasta su determinación

2.-Los estándares para la determinación de proteínas ( Bio-Rad , albúmina sérica bovina ) fueron también colocados en el hielo,manejándose las siguientes concentraciones :

1 µg / ml ; 0.5 µg / ml ; 0.25 µg / ml ; 0.125 µg / ml y Buffer "C" como blanco.

3.-Se adiciona 4 µl de los estándares y las muestras ( por duplicado ) dentro de una microplaca de 96 pozos .

4.-Se les agregó 200 µl del reactivo de Bio-Rad utilizado en la determinación , diluyendo 1 ml del reactivo con 4 ml. de agua destilada . Dicho ensayo esta basado en el cambio de color del azul Brillante de Coomasie G-250 , en respuesta a varias concentraciones de proteínas . El colorante se une a aminoácidos básicos ( especialmente arginina ) y aromáticos .

5.- La microplaca se leyó en el lector de ELISA a 595 nm ( ELISA READER BIO-RAD , MODELO No. 3550. ) , mezclándose por tres segundos antes de



leer. Los datos obtenidos se graficaron y se obtuvieron las concentraciones finales en  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ .

### **VIII.- ENSAYO DE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA ( GELSHIFT ) :**

Las proteínas unidas al DNA son importantes en actividades celulares tales como : transcripción , replicación ó recombinación . Este ensayo de Gelshift ha sido ampliamente usado en el estudio de tales proteínas y los complejos que estas proteínas forman . Este ensayo esta basado en que los complejos de proteína y DNA , pueden ser detectados por su movilidad electroforética alterada ( Shift ) diferente de la del DNA.

El ensayo consta de tres partes que son : ELABORACIÓN DE LA SONDA ; LIMPIEZA DE LA SONDA y ENSAYO DEL CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA . ( EMSA )( Electrophoretic Mobility Shift Assay ) ( 86 ).

#### **1.- ELABORACIÓN DE LA SONDA ( 87 ) :**

a).- En un tubo de ensayo eppendorf se combinaron los siguientes reactivos :

- 1.- 2  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido ( en este caso son tanto para NF $\kappa$ B como para AP - 1 ) . La concentración para cada uno de los oligonucleótidos fué de 25 ng /  $\mu\text{l}$ .
- 2.- 1  $\mu\text{l}$  de buffer de T<sub>4</sub> Polinucleótido Kinasa 10 X .
- 3.- 1  $\mu\text{l}$  de [  $\gamma$  -<sup>32</sup>P ] ATP ( 3,00 Ci /mM , 10 mCi / ml. )
- 4.- 5  $\mu\text{l}$  de Agua Destilada.
- 5.- 1  $\mu\text{l}$  de T<sub>4</sub> Polinucleótido Kinasa.

b).-La mezcla se incubó a 37°C por 10 minutos y la reacción se paró agregando 1 µl de EDTA 0.5 M.

c).- Finalmente se adicionaron 89 µl del Buffer TE.

## 2.-LIMPIEZA DE LA SONDA :

La eliminación de el exceso de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P se llevó a cabo a través de columnas MicroSpin G-25 que contienen Sephadex G-25 DNA Grado F, de Pharmacia Biotech.

### 1.-Preparación de la columna :

a).-La resina se resuspendió en la columna usando el vortex y agitando gentilmente.

b).-La tapa se aflojó a un cuarto y se cortó el fondo de ella.

c).-La columna se colocó en un tubo eppendorf ( se cortó la tapa del tubo primero ) para usarlo como soporte .

d).-Se pre-centrifugó la columna por un minuto a 735 g en cuarto frío.

e).-Después de centrifugar , se tiró el tubo usado como soporte

( Contenia el líquido que se desprendió de la columna ).

### 2.-Aplicación de la Muestra:

a).-La columna se insertó en un nuevo tubo eppendorff y la muestra se aplicó en el centro de la resina compacta , evitando que la muestra fluyera alrededor de la cama de la resina ( en el espacio formado entre la resina y el tubo ). Un volumen de 25 – 50 µl del oligonucleótido marcado fué aplicado a la columna.( Nosotros usamos 2 columnas cada vez puesto que, el volumen final era de 100 µl ).

b).-La columna se centrifugó por dos minutos a 735 g . La muestra purificada fué colectada en el fondo del tubo que soportaba a la columna , procediéndose a tapar el tubo que ahora contenía la muestra y se descartó la columna.

### 3.-ENSAYO DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA ( EMSA ) . ( 88, 89 ) .

a).-GEL CONCENTRADOR .- Es el gel al 5 % que va en la superficie de la cámara de protean , dónde fueron colocadas las muestras a determinarse.

b).-GEL DE CORRIMIENTO.-Es el gel al 9 % que fué colocado después del gel concentrador.( 87 ) .

#### c).-PREPARACIÓN DE MUESTRAS ( 90 , 91 ) :

1.-Los tubos para microcentrifuga de 0.5 ml. fueron marcados.

2.- Se agregaron 4  $\mu$ l del buffer de unión del gel ( 5 X).

3.-Se añadió 1 $\mu$ l de 50 mM de Dithiothreitol ( DTT ) ( el cuál se preparó fresco cada vez que se usó = 7.7 mg / ml , en agua desionizada ) .

4.-Luego ,1  $\mu$ l de Poly [ d ( I - C ) ]\* en una concentración de 0.5  $\mu$ gr /  $\mu$ l fue agregado.

5.- Se calculó la cantidad de proteína requerida, en este caso fue de 4  $\mu$ g /  $\mu$ l .

6.- La sumatoria del buffer de unión, más DTT , más Poly-IdC nos dió un volumen de 6  $\mu$ l al cual se le sumó a su vez el volumen requerido de proteína para los 4  $\mu$ g señalados en el punto anterior y se adicionó agua destilada para hacer un volumen final de 20  $\mu$ l.

7.-Se incubó a la temperatura del cuarto por 20 minutos.

8.-Finalmente se adicionó 1  $\mu$ l de la sonda marcada a cada tubo y se incubó a la temperatura del cuarto por 30 minutos.

\* Poly[ d ( I-C ) ] = Poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidylic Acid, Poly[d ( I-C )],Sodium Salt.,Boehringer Mannheim labs.

#### d).-PREPARACIÓN DEL GEL EN LA CÁMARA DE PROTEAN II (Bio-Rad).

1.-Se mantuvo limpia la cámara protean lavándola con agua y jabón después de preparar el gel y limpiarla con alcohol.

2.-Se colocaron los empaques de hule en el fondo que sirvieron de soporte para las placas de vidrio que contenían el gel.

3.-El vidrio grande y el vidrio pequeño se limpiaron con alcohol ,y se colocaron los espaciadores ( pedazos de plástico que corren a lo largo de los vidrios con un diámetro de 1.5 mm ) entre ambos vidrios. Posteriormente se equilibraron sobre una superficie plana para que queden perfectamente alineados.

4.-Se colocaron los sujetadores que prensaron el sandwich formado por los vidrios mas el espaciador , llevando un sujetador por cada lado y atornillados hasta que quedaron perfectamente firmes.

5.-La cámara fue colocada con los tornillos de los sujetadores hacia arriba y se pusieron los peines entre los dos vidrios ( dichos peines tenían 15 espacios con un diámetro de 1 mm ).

7.-Se vació el primer gel, ( de corrimiento ) con jeringa de 20 ml y aguja de 18 G 1 ½ , hasta más ó menos un centímetro abajo del límite del peine, dejando el gel sobrante en un vaso de precipitado para checar el tiempo de solidificación.

8.-Ya solidificado el primer gel se procedió a preparar el gel concentrador que se vació igual que el primero ( distribuyéndose alrededor de los espacios del peine ) teniendo como límite el vidrio grande .

9.-Se preparó el gel un día anterior para el corrimiento de las muestras.

#### e).-ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORETICA .

1.- El gel se pre-corrió por 10 - 20 minutos a 100 volts ( Bio-Rad cámara de electroforesis , 25 mA ).

2.-Se adicionó 1  $\mu$ l de colorante ( 10 X loading buffer ) a cada muestra.

3.-Se aplicaron las muestras en el gel ( 20  $\mu$ l ) con pipeta Hamilton ( Hamilton Co ).

4.-Se llenó la cámara de electroforesis con buffer de corrimiento , Tris , Ac. Bórico y EDTA ( TBE = 0.25 X ) ( 91 ) .

5.-El gel se corrió a 100 volts para el gel concentrador y posteriormente se cambió a 190 volts para el gel de corrimiento , durando aproximadamente de 2-3 hrs.

6.-Cuando el colorante fué localizado a la mitad del gel, iniciamos el secado del gel ( slab gel dryer, Savant Co ).

7.-Ya que el colorante alcanzó más ó menos dos centímetros antes del extremo opuesto , se apagó el aparato y se desarmó el sandwich colocando al gel en papel filtro , ( electrophoresis blotting paper , Scientific specialities group ) cortado a su medida y señalando cual es el orden de las muestras.

8.- Se envolvió el papel filtro que contenía el gel con papel transparente, procurando no tener burbujas entre ellos.

9.-Se colocó el gel sobre la superficie perforada de acero del secador , situando entre ellas el papel filtro y tapándolo posteriormente con la cubierta de silicona que posee el aparato.

10.-Se establecieron las condiciones de temperatura de 50°C , durante 30 min y la posición automática para posteriormente conectar el vacío y comenzar con el proceso de secado.

11.-Terminado el tiempo se apagó el aparato , retirándose el gel ( el cual se adhirió totalmente al papel filtro ) y se colocó en el cassette ( Autoradiography Cassette, Fisher Biotech ) hacia el lado de la pantalla colocándose entre ellos el film ( Hyperfilm MP, Amersham Life Science ) , el cuál se marcó con un ligero corte en la esquina de acuerdo al orden de las muestras. Todo este proceso se realizó en el cuarto oscuro.

12.-Se puso el cassette en una bolsa negra de plástico y se guardó a -70°C por 24 hrs , cuando el P<sup>32</sup> fué nuevo porque cuando fué más viejo debió dejarse ó 48 ó 72 hrs.

13.- Después de incubarse, se dejó el cassette por una hora a la temperatura del cuarto.

14.-Se procedió a revelar el film en el cuarto oscuro de la siguiente manera :

a).- 2 minutos en desarrollador ( Developer , Kodak GBX ).

b).-15 segundos en ac. acético al 10 %

c).-2 minutos en fijador ( Fixer , Kodak GBX ).

d).-5 minutos bajo el agua de la llave.

15.- El film se secó al aire y se observó .

## ***IX .- INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO COMPETITIVO PARA LA DETECCIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- $\alpha$ EN RATONES.***

Nosotros usamos el kit CYTokit Red<sup>tm</sup> mTNF $\alpha$  (CYTimmune Science Inc.) el cual utiliza placas precubiertas con anticuerpos de cabra anti-conejo, los cuales fueron usados para capturar un complejo de citoquina específico en cada muestra. Posteriormente se le agregó anticuerpo específico para la citoquina y la citoquina conjugada - biotinilada (ligando competitivo) ó las muestras ó los estándares. La cantidad de citoquina biotinilada que fué detectada, resultó de una relación inversa entre la densidad óptica (OD) y la concentración: a más alta densidad óptica, menos citoquina en la muestra.

### **a).- PREPARACIÓN DE REACTIVOS :**

1.-Anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral murino (mTNF- $\alpha$ ). – La muestra se diluyó con 3.5 ml. del diluyente, se selló con el tapon de plástico y se mezcló.

2.-Para el estándar del factor de necrosis tumoral murino (mTNF- $\alpha$ ): Se marcaron 6 tubos del # 2 - #6 y el último como "0". Se adicionaron 600  $\mu$ l del medio de cultivo (DMEM) a cada uno de los tubos. El estándar mTNF- $\alpha$  liofilizado fue reconstituido con 1000  $\mu$ l del DMEM y correspondió al estándar # 1 que tiene una concentración de 200 ng/ml. Los estándares del 2 al 6 fueron preparados en una dilución 1:4 de la siguiente manera: para hacer el estandard 2 se adicionaron 200  $\mu$ l del estándar # 1 y se mezcló; así se continuó hasta el tubo No 6. El tubo "0" no se le adicionó nada y fué utilizado como blank.

3.-Conjugado mTNF- $\alpha$ .- Se resuspendió con 3.5 ml. del diluyente sellando con el tapón de plástico y mezclando.

4.-Buffer de lavado.- Se diluyó el contenido total del buffer concentrado con dos litros de agua desionizada .

5.-Estreptavidina-fosfatasa alcalina .- Se preparó el vial de estreptavidina ,tomando 400  $\mu$ l para mezclarse con 12 ml del diluyente .

6.-Solución sustrato.- Se reconstituyó el sustrato 10 minutos antes de usarlo, utilizando el contenido total de su diluyente y mezclando gentilmente hasta que se disolvió completamente .

7.-Solución amplificadora .-Se reconstituyó 10 min antes de usarse , adicionando el contenido total del diluyente y mezclando gentilmente hasta que se disolvió completamente .

#### b ).-PROCEDIMIENTO GENERAL:

1 ).- Se pipetearon 100  $\mu$ l del tubo marcado como "0" y de los estándares del #1 al # 6 dentro de los pozos designados.

2 ).-Para cada uno de los pozos escogidos se pipetearon 100  $\mu$ l de las muestras problema obtenidas de los sobrenadante de los cultivos celulares.

3 ).- Se les agregó 25  $\mu$ l del anticuerpo mTNF- $\alpha$  .

4).-La microplaca se selló para prevenir evaporización y se incubó a la temperatura del cuarto por 3 horas.

5 ).-Después de remover gentilmente el sellador de la placa se agregaron 25  $\mu$ l del conjugado dentro de cada pozo , resellando la placa e incubando a la temperatura del cuarto por 30 min.

6 ).-Lavado.-Después de desprender el sellador de plástico se lavó 5 veces , ( para reducir el porcentaje de error ) ,usando la pipeta multicanal cargada con



250  $\mu$ l del buffer y removiendo el fluido posteriormente por inversión de la placa y golpeteo en el fondo del pozos con el dedo para finalmente secar la placa sobre papel filtro limpio al momento de la inversión. Se repitió el mismo procedimiento 4 veces y en la quinta lavada, se dejó el buffer por espacio de 10 min antes de removerlo de la manera ya indicada.

7).-Posteriormente se les agregó 50  $\mu$ l de la estreptavidina - fosfatasa alcalina ya diluída dentro de cada pozo, sellando la placa e incubando a temperatura del cuarto por 30 min.( En este momento se sacaron del refrigerador los reactivos generadores de color para que tomaran la temperatura del cuarto ).Después de 20 min se prepararon las solución del substrato y la solución amplificadora.

8).-El sellador se removió gentilmente y las placas se lavaron 5 veces de acuerdo al proceso descrito en el paso 6.

9).-Se pipetearon 50  $\mu$ l de la solución de substrato preparada a cada pozo y la placa se selló para incubarla a la temperatura del cuarto por 20 min.

10).-Se pipetearon 50  $\mu$ l de la solución amplificadora ya preparada dentro de cada pozo y en el mismo orden que se les agregó la solución de substrato. La placa se leyó en los siguientes 5 min después de añadir la solución amplificadora a 490 nm y a intervalos cortos, teniendo como referencia la densidad óptica entre 1.5 - 2.0 de la muestra conocida como "0".

12).- La curva de referencia estándar presentó una forma sigmoide que mostró una relación inversa entre las concentraciones de mTNF- $\alpha$  y las correspondientes absorbancias (D. O.), ó sea, a mayor concentración de mTNF- $\alpha$  en la muestra, más baja D.O. ó menos color rojo.

EL LECTOR DE ELISA tiene la computadora integrada para trazar la curva y calcular así las concentraciones de las muestras.

\*.-Una curva estándar fué corrida en cada determinación.

***X.- CUANTIFICACIÓN DE INTERLEUCINA – 6 , MURINA MEDIANTE INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO ( 92 , 93 ) .***

El InterTest-6X<sup>TM</sup> Mouse IL-6 ELISA es un kit de ELISA de fase sólida, empleando el principio de sandwich de múltiple anticuerpo . Primero ,una microplaca de 96 pozos ( pre-cubierta con anticuerpo anti-mIL-6 ) fue utilizada para capturar la mIL-6 presente en los estándares y las muestras problema . Después de lavar la microplaca para remover el material que no se unió, fué agregado un anticuerpo anti-mIL-6 biotinilado el cual se unió al capturado mIL-6a , para finalmente agregar estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano y medir la absorbancia a 450 nm, la cual fué proporcional a la concentración de mIL-6 presente en los estándares y muestras problema .

**1.- PROCEDIMIENTO:**

- a).- El InterTest-6X<sup>TM</sup> murino fué sacado del refrigerador 30 minutos antes de usarlo para permitirle a los reactivos tomar la temperatura del cuarto.
- b).-Se determinó el número de muestras para ensayar y el número de hileras que se utilizaron , tomando en cuenta que una curva estándar debió ser corrida en cada ensayo.
- c).-Se preparó el buffer de lavado con 100 ml del buffer concentrado y 900 ml de agua desionizada el buffer fué estable por 6 meses conservándolo entre 2 y 8 °C .

d).-Se reconstituyó el estándar por la adición de un ml del medio de cultivo utilizado. La curva estándar fue preparada de acuerdo a las siguientes instrucciones :

Concentraciones	Medio de Cultivo	Estandar agregado
1.- 560 pg/ml.	----	----
2.- 140 pg/ml.	150 $\mu$ l	50 $\mu$ l del Std. # 1
3.- 35 pg/ml.	150 $\mu$ l	50 $\mu$ l del Std. # 2
4.- 8.8 pg/ml.	150 $\mu$ l	50 $\mu$ l del Std. # 3
5.- 0 pg/ml.	150 $\mu$ l	---

e).-Se sacaron las microplacas de la bolsa de aluminio las tiras que no se utilizaron fueron guardadas otra vez , y selladas en la misma bolsa a una temperatura entre 2 y 8<sup>o</sup> C .

f).-Se adicionaron 50  $\mu$ l de las muestras problema y de los estándares a la microplaca y por duplicado de acuerdo a el esquema de trabajo.

g).-La placa se selló con cubierta adhesiva y se incubó por una hora  $\pm$  5 min a la temperatura del cuarto ( 18 – 24<sup>o</sup>C ) y con agitación regulada a 150 rpm.

h).-El líquido de los pozos fue removido por aspiración ó por inversión cuidando de no desprender las tiras en la inversión .

i ).-Las placas fueron vigorosamente lavadas agregando 250  $\mu$ l del buffer de lavado a cada pozo y decantando posteriormente.

\*Una vigorosa y consistente técnica de lavado fué necesaria para una apropiada elaboración del ensayo.

- j).-La placa fue secada golpeando fuertemente sobre papel seco.
- k).-Se pipetearon 50  $\mu$ l de anticuerpo biotinilado anti -IL- 6 murino, dentro de cada pozo.
- l).- La placa fue sellada con cubierta adhesiva e incubada por 1 hora  $\pm$  5 minutos a la temperatura del cuarto y con agitación a 150 rpm.
- m).-El líquido fue removido por aspiración ó inversión y la placa se lavó 3 veces vigorosamente de la manera ya indicada .
- n).-La placa fue secada por golpeteo sobre papel seco.
- o).-Se agregaron 50  $\mu$ l de peroxidasa de rábano conjugada a estreptavidina dentro de cada pozo.
- p).-La placa se selló y se incubó por 30 minutos  $\pm$  2 a la temperatura del cuarto y con rotación a 150 rpm.
- q).-El líquido fue removido y la placa fue lavada y secada de la manera ya indicada.
- r).-Se adicionaron 50  $\mu$ l del substrato Tetramethylbenzidine ( TMB ) a cada pozo y se incubó por 15 minutos  $\pm$  1 a la temperatura del cuarto con agitación a 150 rpm.
- s).-La reacción fue bloqueada por adición de 50  $\mu$ l de solución de finalización , tornando el color azul que había en los pozos a amarillo.
- t).-La placa se leyó a 450 nm en el LECTOR DE ELISA ( BIO-RAD ) Modelo No. 3550 y se utilizaron como blank los pozos que contenían el estándar de “ 0 pg / ml. “

u).-El lector d ELISA estuvo integrado a la computadora con el programa para realizar la curva de regresión lineal ,utilizando los estándares de 8.8 pg/ml a 560 pg/ml ,calculando también la concentración existente en las muestras problema .

#### **XI- MEDICIÓN DE ZINC :**

Se transfirió una alícuota de la muestra ( los tres diferentes medios de cultivo , normal , medio y bajo zinc ) previamente homogeneizada , en un vaso de precipitado para realizar la determinación de zinc por espectrofotometría de absorción atómica usando flama de acetileno ( modelo 3030B , Perkin Elmer , Norwalk , CT )( 94 , 95 ),de la siguiente manera :

- a).- Se utilizó la mezcla aire - acetileno para la generación de la flama .
- b).- Se fijó la lámpara a la longitud de onda de 213.9 nanómetros.
- c).- Se leyeron cuatro soluciones estándar de zinc antes y después de cada grupo de muestras que fue determinado, fijándose el cero de absorción cada vez que se practicó lo anterior.
- d).-Se preparó la curva de calibración a partir del promedio de las lecturas obtenidas de cada estándar antes y después del grupo de muestras .
- e).-Se leyó la concentración de las muestras a partir de una gráfica de absorción elaborada .
- f).-Se utilizó agua desionizada por medio de resinas de intercambio iónico para dichas determinaciones.

#### **XII.- DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO ( 96 ,97 ) :**

##### **A.- PROCEDIMIENTO :**

- 1.-El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos de fondo en "U".

- 2.-En una microplaca se pipetearon 100  $\mu$ l de solución de trabajo del reactivo de "GRIESS" para cada muestra y los estándares ( ver preparación de el reactivo de griess en la sección de reactivos ).
- 3.-Por duplicado se adicionaron 100  $\mu$ l de medio de cultivo ( Blanco ), muestra ó solución estándar dentro de los pozos que contenían el reactivo de GRIESS .
- 4.-La placa se incubó por 10 minutos a la temperatura del cuarto y se llevó al lector de microplaca a una D.O. de 562 nm.
- 5.-Una curva estándar fue construida para posteriormente extrapolar los resultados y conocer las concentraciones de la muestras .
- 6.-La curva estándar fué construida con concentraciones conocidas de Nitrito de Sodio (  $\text{NaNO}_2$  ), utilizando las siguientes concentraciones : 150 , 125 , 100 , 75 , 50 , 25 , 12.5, 6.25 micromolar .
- 7.-Todos los reactivos se prepararon frescos al momento de usarse.

#### **LISTA DE REACTIVOS :**

#### **.VII.-PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK PARA LOS BUFFERS USADOS EN LA EXTRACCIÓN NUCLEAR ( 83 ) :**

##### **1.-BUFFER "A" ( DE LISIS CELULAR ) :**

Ingrediente	Cantidad	Solución Stock	Conc. Final
KCL	5 ml	1.5 M ( 100X )	15 mM
HEPES *	5 ml	1.0 M ( 100X )	10 mM ( pH=7.6)
MgCl	5 ml	200 mM ( 100X )	2 mM

EDTA	5 ml	10 mM ( 100X)	0.1mM
H <sub>2</sub> O	480 ml		
	= 500 ml	guardar en refrigeración , el pH debe ser 7.6	

II.-BUFFER " B " ( DE LISIS NUCLEAR ) : Este Buffer tiene alto contenido de sal para ayudar a remover la Proteína del DNA .

-Esta solución stock es para 400-800 muestras ( 5-10 µl por muestra ) .

Ingrediente	Cantidad	Solución Stock	Conc. Final
KCL	1.33 ml	1.5 M ( 3X )	0.5 M
HEPES	100 µl	1.0 M ( 40 X )	25 mM (pH=7.6)
EDTA	40 µl	10 mM	0.1 mM
H <sub>2</sub> O	2.3 ml		
	= 3.8 ml		

\*Hepes = ( N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[ 2-ethanesulfonic acid ] ) . ( Sigma ) .

III.- BUFFER "C" ( DE DILUCIÓN Y ALMACENAMIENTO ) : Este buffer diluye las sales del buffer B y actua como un buffer de almacenamiento para proteínas unidas al DNA. ( Solución stock para hacer 24 ml. ( es suficiente para 500 muestras de 50 µl por muestra ) .

Ingrediente	Cantidad	Solución Stock	Conc. Final
HEPES	625 µl	1.0 M ( 40 X )	25 mM ( pH=7.6 )
EDTA	250 µl	10 mM ( 100 X )	0.1 mM
GLICEROL	2.5 ml	100 %	10 %
H <sub>2</sub> O	21 ml		
	= 24 ml		

## VII.-PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO DIARIAS :

**BUFFER "A".**-Solución diaria para 20 muestras ( 20 ml.) : Tomar 19 ml. del stock para el buffer "A" y adicionar fresco:

Ingredientes	Cantidad	De la Sol. Stock	1 X
DTT (Dithiothreitol )	400 $\mu$ l	500 mM ( 50 X )	1mM
Inhibidor de Proteasas	200 $\mu$ l	( 100 X )	1 X
AEBSF *	400 $\mu$ l	25 mM ( 50 X )	0.5.mM
NaF	200 $\mu$ l	1 M	10 mM
	= 20 ml		

A 10 ml. de esta solución se le agrega uno de los detergente para facilitar la lisis celular:

IGEPAL	200 $\mu$ l	15 % ( 50 X )	0.3 %
NP-40	100 $\mu$ l	10 % ( 100 X )	0.1 %

Usar los 10 ml. restantes para enjuagar en el paso donde se remueven los contaminantes citoplasmáticos .

DTT = ( 2,3-dihydroxy-1,4-dithiobutane ,  $C_4H_{10}O_2S_2$  ( Sigma ) ( 9 )

\*AEBSF  $\approx$  4-(2-Aminoethyl)-Benzensulfonil Fluoride. Hydrochloride

**BUFFER "B".**Solución diaria para hacer 200  $\mu$ l para 40 muestras : Tomar 190  $\mu$ l del stock para el buffer "B" y adicionar fresco :

Ingredientes	Cantidad	De la Sol. Stock	1 X
DTT	4 $\mu$ l	50 mM ( 50 X )	1 mM



AEBSF	4 $\mu$ l	0.5 mM ( 50 X )	25 mM
Inhibidor de Proteasas	2 $\mu$ l	cocktel 100 X	1 X
NaF	2 $\mu$ l	1 M ( 100 X )	10 mM
	200 $\mu$ l		

**BUFFER "C". Solución diaria para hacer 2 ml : Tomar 1.9 ml del stock para el buffer y adicionar fresco:**

Ingredientes	Cantidad	De la Sol. Stock	1X
DTT	40 $\mu$ l	50 mM ( 50 X )	1 mM
AEBSF	40 $\mu$ l	0.5 mM ( 50 X )	25 M
Inhibidores de Proteasas	20 $\mu$ l	cocktel 100 X	1 X
NaF	20 $\mu$ l	1 M ( 100 X )	10 mM
	= 2 ml		

La cantidad utilizada de este buffer viene a ser 10 veces el volumen del buffer B y puede ser usado como buffer de almacenamiento para congelar las muestras.

a).-GEL DE CORRIMIENTO .-las cantidades proporcionadas a continuación sirven para hacer dos geles ( 12 ).

	Gel al 9 %	Gel al 7 %
H <sub>2</sub> O	70.8 ml.	78.8 ml.
5X TBE	12 ml.	12 ml
30 % Bis/Poli acrilamida ( Bio-Rad ).	36 ml	28 ml
10 % APS *	1.2 ml	1.2 ml



\* APS = Persulfato de Ammonio se prepara fresco cada día = 0.2 g / 2 ml ( sigma )

\*\*TEMED = N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine ( Bio-Rad ).

\*TRIS = ( hydroxymethyl )- aminomethane.

\*\* EDTA ( Ethylenedinitrilo)-tetraacetic Acid.

## INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO COMPETITIVO PARA LA DETECCIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL - $\alpha$ MURINO.

### a).- MATERIAL INCLUIDO EN EL KIT.

- 1.- 100 ml. del Buffer de lavado al 20 X.
- 2.- 75 ml. del diluyente del ensayo al 1 X.
- 3.- Dos viales de anticuerpo liofilizado mTNF- $\alpha$ .
- 4.- Dos viales del estandard de mTNF- $\alpha$  liofilizado.
- 5.- Dos viales del conjugado mTNF- $\alpha$  liofilizado.
- 6.- Un frasco con 15 ml. de suero diluyente.
- 7.- Un frasco liofilizado de substrato.
- 8.- Un frasco de 13 ml. del diluyente del substrato.
- 9.- Dos frascos liofilizados de amplificador.
- 10.- Dos frascos de 8 ml. de diluyente de amplificador.
- 11.- Dos viales de 0.5 ml. de Estreptavidina- Fosfatasa alcalina.
- 12.- Dos Inmunoplasmas de 96 pozos pre-cubiertas , selladas en bolsas de aluminio.
- 13.- Cuatro selladores de placa.

### 1.- MATERIAL INCLUIDO EN EL KIT

- a).- Una microplaca cubierta con anticuerpo anti-mIL-6 , con 12 hileras desprendibles , con 8 pozos por hilera.
- b).-100 ml. de 10 X detergente en buffer ( Solución de lavado , contiene 0.05 % de pro-Clin 300 como preservativo ).
- c).- IL-6 recombinante murino liofilizada con la concentración indicada en cada vial.
- d).- 5 ml. biotinilada anti-mIL-6 en buffer ( Contiene 0.05 % de pro-Clin 300 como preservativo ).
- e).- 5 ml. de Peroxidasa de rábano conjugada a estreptavidina en una solución buffer que contiene proteína.
- f).-Diluyente .- 14 ml. de solución buffer que contiene proteína ( con pro-Clin y 0.01 % de Gentamicina como preservativos ).
- g).-Substrato TMB.- 10 ml. de Tetramethylbenzidine conteniendo peróxido de hidrógeno en solvente orgánico ( N,N-Dimethylformamide ).
- h).-Solución bloqueadora de la reacción .
- i).-Selladores de plástico para la placa.

## 2.-PREPARACIÓN DE REACTIVOS :

- a).- Reactivo "A" de Greiss = 0.1 % N -1- Naphthethylenediamine diluido con agua destilada.
- b).- Reactivo "B" de Greiss = 1.0 % Sulfanilamide diluido en 5 % de Ácido Fosfórico.
- c).- Ambos reactivos se conservaron en el refrigerador a 4<sup>o</sup>C , protegidos de la luz dónde durarán de 1 – 2 meses.

d).-La solución de trabajo de GREISS se prepara mezclando los reactivos A y B en proporción de 1 : 1 ( esto se hace en el momento que se monta la prueba y otra vez protegiendo dicha solución de la luz ).

## RESULTADOS

La decisión de seleccionar en el proceso de la fagocitosis una población de macrófagos de  $1 \times 10^6$  y una población bacteriana de  $300 \times 10^6$  fué en base a los siguientes resultados :

### NÚMERO DE BACTERIAS DENTRO DEL MACRÓFAGO

	1 hr.	2 hrs	3 hrs	4 hrs
<u>S. aureus</u>	15 - 30	$100 \pm 10$	$100 \pm 10$	$100 \pm 10$
<u>E. coli</u>	$20 \pm 5$	$40 \pm 5$	$40 \pm 5$	$40 \pm 5$

En dónde el tiempo óptimo seleccionado fué el más corto a mayor fagocitosis ( 2 hrs. en este caso ), porque también ha este tiempo ya han sido producidos los factores de transcripción a determinar en este proyecto.

Las poblaciones de macrófagos de  $4 \times 10^6$  y de bacterias de  $600 \times 10^6$  fueron eliminadas en los primeros experimentos , porque los macrófagos eran tantos que obstruían la cuantificación de la fagocitosis . En cuanto a las bacterias , también por su elevada cantidad , muchas de ellas quedaban fuera de los macrófagos.

Finalmente se concluyó que la población celular sería de  $1 \times 10^6$  macrófagos y la

población bacteriana de  $300 \times 10^6$ , de ésta manera se veían claramente los macrófagos mientras que las bacterias fueron fagocitadas en su totalidad.

## I.- FACTORES TRANSCRIPCIONALES :

### A.- FACTOR NF-KB

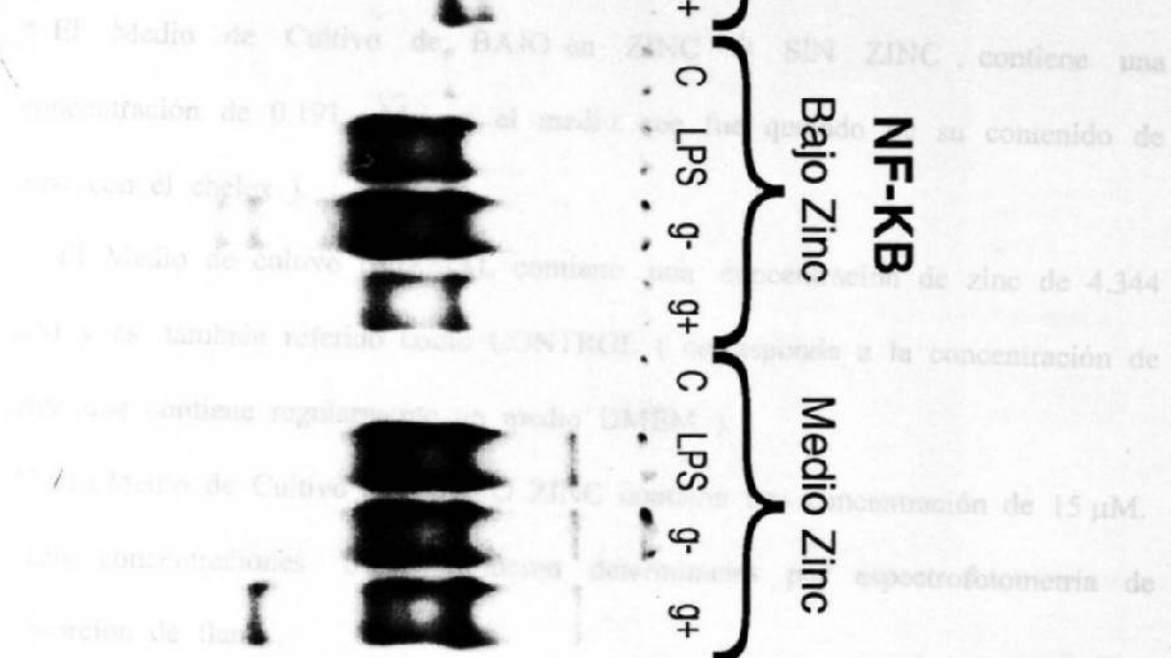
Las bandas que aparecen en los films ( fotografía No. 1 ) después del revelado son , una superior que corresponde a la fracción p65 y una inferior , que corresponde a la fracción p50 , las cuales fueron medidas en el Densitómetro ( Alpha Immunotech Corp. ) y posteriormente analizadas estadísticamente , teniendo las siguientes medias en base a sus resultados porcentuales .

TABLA No. 1 FRACCIÓN P 65 DEL FACTOR NF-κB

TRATAMIENTO	Bajo en Zinc*	Normal en Zinc**	Medio en Zinc**
Control	4.364	4.350	3.492
LPS	11.371	9.585	9.792
<u>E. coli</u>	10.357	9.914	9.685
<u>S. aureus</u>	10.428	8.214	8.350

TABLA No. 2. TRACCIÓN P 60 DEL FACTOR NF- $\kappa$ B

TRATAMIENTO	Normal en Zinc	Medio en Zinc
Control	0.000	2.492
LPS	13.761	14.061
<i>E. coli</i>	1.000	11.472
<i>S. aureus</i>	1.000	4.845



Fotografía No. 1: (EMSA) Ensayo del cambio de movilidad electroforética para las bandas P-65 y P-50 en tres diferentes concentraciones de Zinc. Después de dos horas de estímulo antigénico.



TABLA No. 2 FRACCIÓN P 50 DEL FACTOR NF-κB

TRATAMIENTO	Bajo en Zinc	Normal en Zinc	Medio en Zinc
Control	3.772	2.690	3.492
LPS	13.763	7.763	14.081
<u>E. coli</u>	14.490	7.581	11.472
<u>S. aureus</u>	12.027	4.572	4.845

\* El Medio de Cultivo de BAJO en ZINC Ó SIN ZINC , contiene una concentración de 0.191  $\mu\text{M}$  ( es el medio que fue quelado de su contenido de zinc con el chelex ).

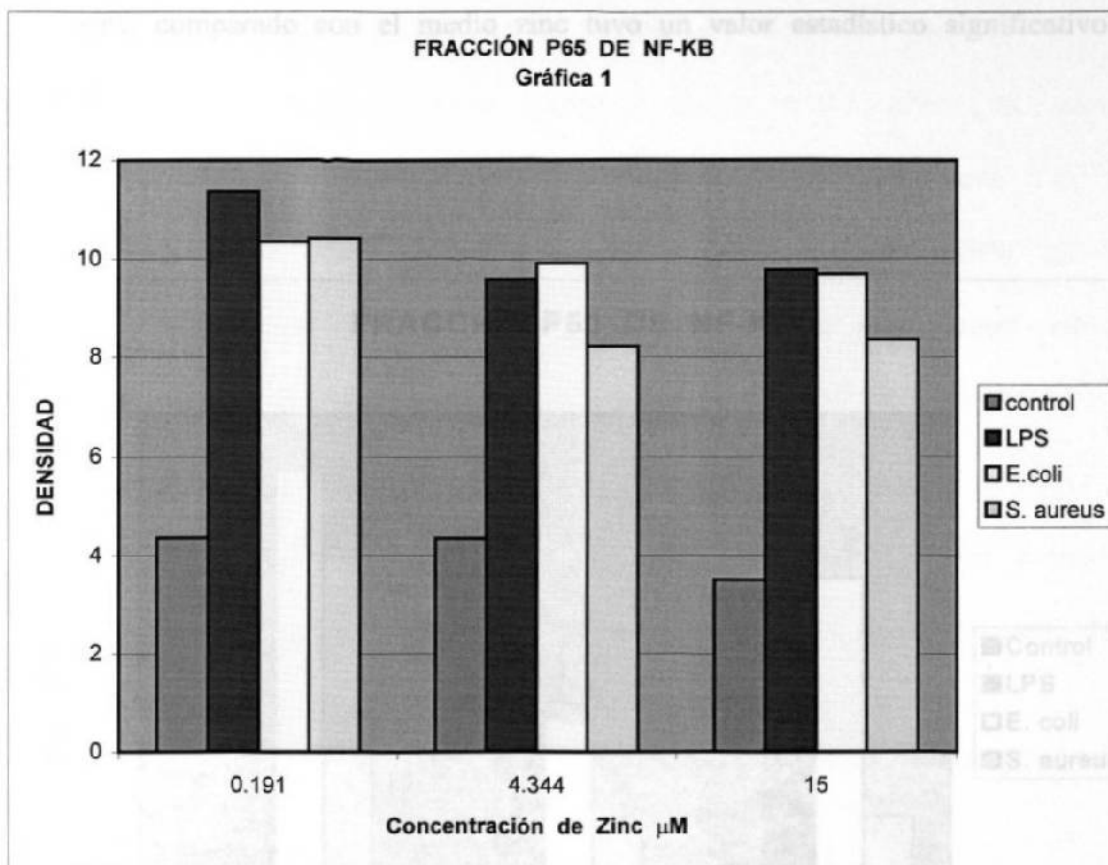
\*\* El Medio de cultivo NORMAL contiene una concentración de zinc de 4.344  $\mu\text{M}$  y es también referido como CONTROL ( corresponde a la concentración de zinc que contiene regularmente un medio DMEM ).

\*\*\* El Medio de Cultivo de MEDIO ZINC contiene una concentración de 15  $\mu\text{M}$ .

Las concentraciones de zinc fueron determinadas por espectrofotometría de absorción de flama .

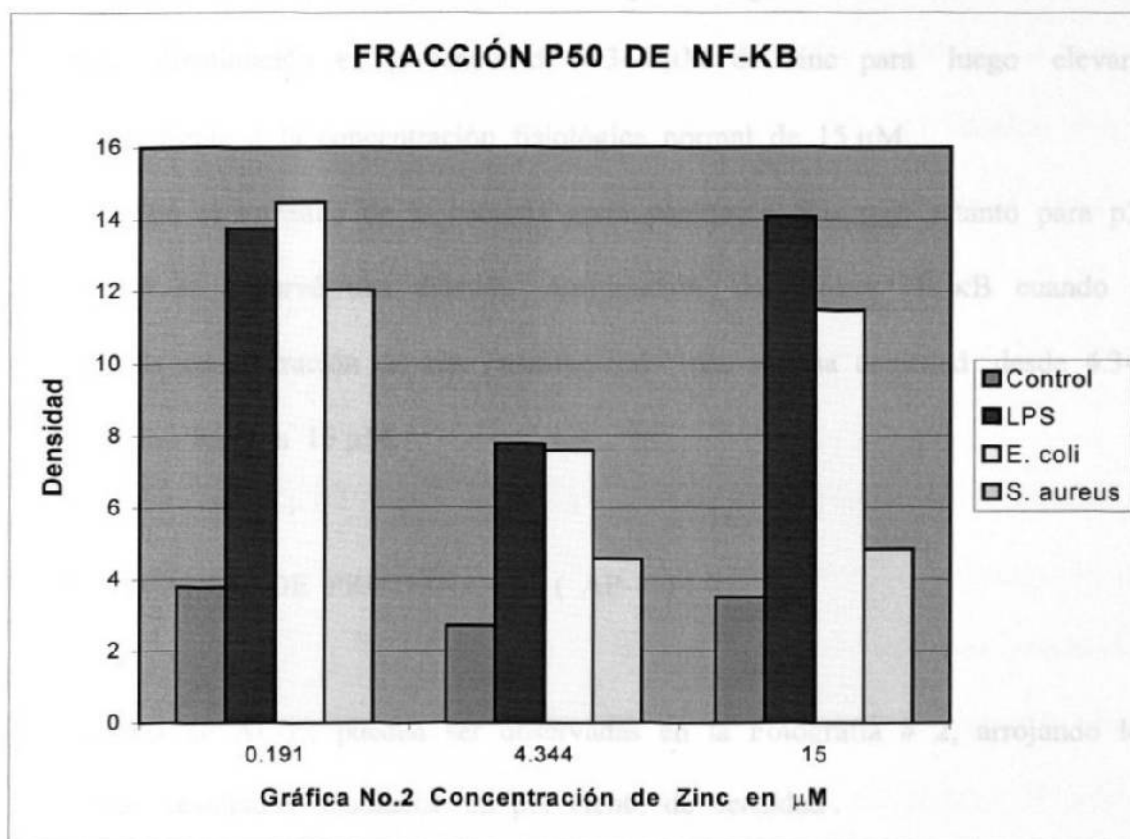
La mínima producción del factor NF-κB fué definitivamente para los controles dentro de los tres grupos , tanto para la banda superior ( p65 ) , como para la inferior ( p50 ). Después ,tenemos que en la fracción p65 del grupo que recibió estímulo antigénico con LPS , se encontró mayor producción del grupo denominado de concentración baja en Zinc , mientras que los grupos de las concentraciones normales y media , fueron casi iguales . En la fracción p50 para

el mismo antígeno, tanto en la concentración baja de Zinc, como en la media, arrojaron un resultado similar, mientras que en la concentración normal de Zinc, el resultado fue casi la mitad de la cantidad reportada para la concentración media de Zinc. P/65 para la bacteria gram negativa (*E. coli*) tuvo el mismo



comportamiento que para LPS, sucediendo también casi lo mismo para P/50, sólo que a nivel de la concentración media de Zinc, en este caso fue menor que la

reportada para LPS. La menor producción de NF- $\kappa$ B correspondió a la bacteria gram positiva (*S. aureus*), tanto para la fracción p65 como p50 y dentro de los grupos que recibieron estímulo antigénico. Los resultados de los controles tuvieron importancia estadística ( $p < 0.001$ ); así también fué para la banda inferior de la bacteria gram positiva quien a nivel del medio de bajo en zinc ó sin zinc, comparado con el medio zinc tuvo un valor estadístico significativo de  $p < 0.05$ .



En las gráficas 1 y 2 se presentan los resultados de las concentraciones de zinc contra la densidad medida en los geles. Los controles tanto de las bandas

superiores como inferiores , mostraron el mínimo valor de densidad ,observándose la banda superior p65 aún más disminuída, a la concentración de 15  $\mu\text{M}$ .

El lipopolisacárido y la bacteria gram negativa ( E. coli ), tuvieron un comportamiento similar . Primero tenemos que la banda superior ( p65 ) disminuyó al aumentar la concentración de zinc a 4.344  $\mu\text{M}$  , para guardar un comportamiento parecido cuando se agregó el zinc a 15  $\mu\text{M}$  ; ahora , en cuanto a la banda inferior ( p50 ) , tenemos otra vez algo semejante en el comportamiento del LPS y la bacteria gram negativa , manifestado en una marcada disminución en presencia de 4.344  $\mu\text{M}$  de zinc para luego elevarse otra vez frente a la concentración fisiológica normal de 15  $\mu\text{M}$ .

Con el estímulo de la bacteria gram positiva ( S. aureus ) tanto para p50 como p65 se observó una drástica disminución del factor NF- $\kappa$ B cuando se aumentó la concentración de zinc , manteniendo una misma densidad desde 4.344  $\mu\text{M}$  de zinc hasta a 15  $\mu\text{M}$ .

#### B.- ACTIVADOR DE PROTEÍNA – 1 ( AP-1 ) :

Las bandas de AP-1 , pueden ser observadas en la Fotografía # 2, arrojando los siguientes resultados tabulados en por ciento de densidad .

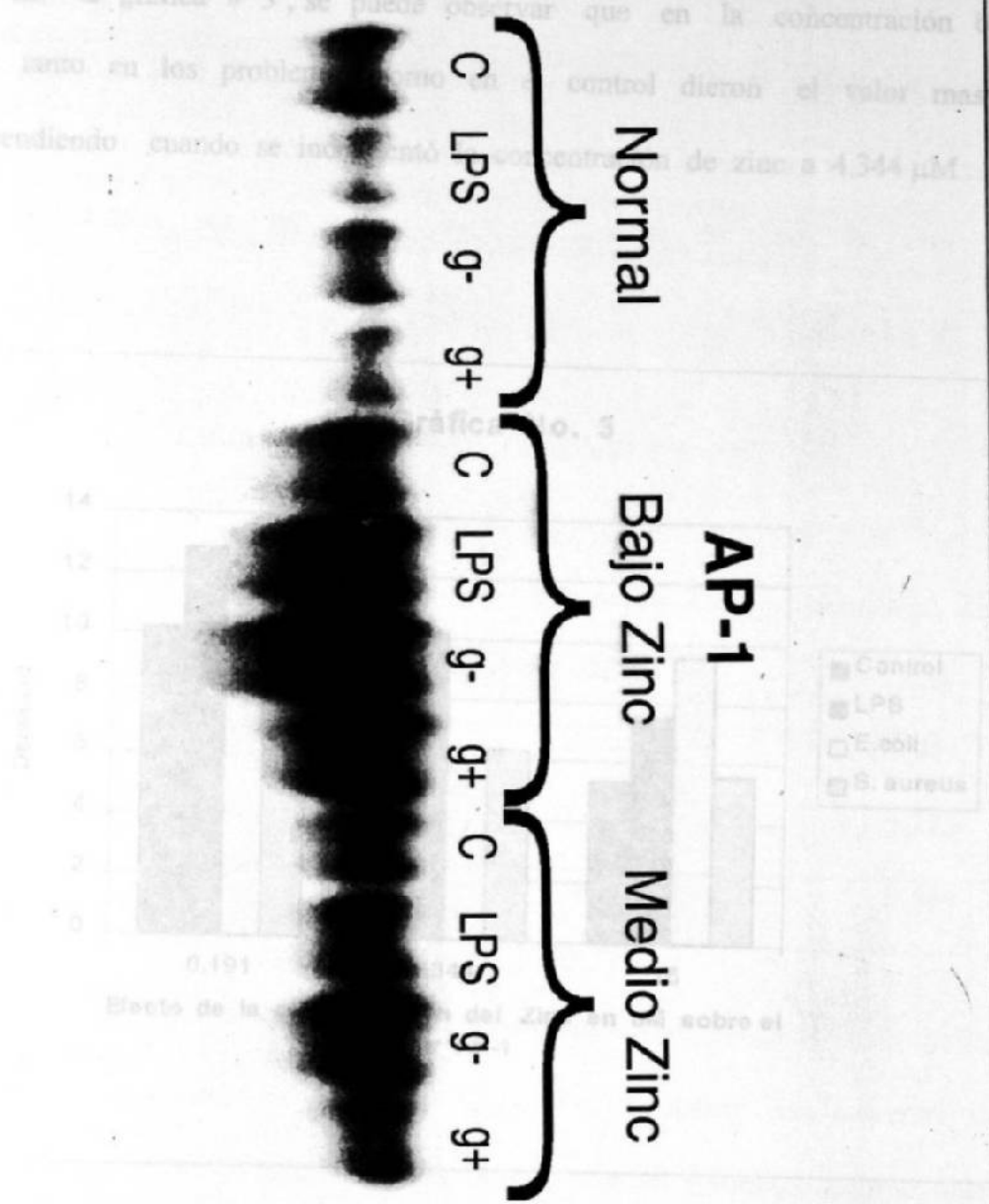
TABLA No. 3 BANDAS DE AP- 1

TRATAMIENTO	Bajo en Zinc*	Normal en Zinc**	Medio en Zinc***
Control	10.166	4.844	5.388
LPS	12.855	10.166	7.488
<u>E. coli</u>	11.322	5.888	9.522
<u>S. aureus</u>	10.377	6.366	5.588

Como se puede observar en la tabla No. 3, los resultados de la estimulación con los antígenos comparados con el control, no son tan altos como lo fué para el factor NF- $\kappa$ B, puesto que el factor AP-1 es un factor más en relación con la concentración de zinc que con estímulos antigénicos, pero se puede observar que en la baja concentración de zinc utilizada en estos experimentos (0.191  $\mu$ ) aún el control dio un valor alto significativo, en comparación con las demás concentraciones de zinc (4.344 y 15  $\mu$ M).

Para la producción del factor AP -1 estimulado con LPS, tuvimos un comportamiento de disminución gradual conforme se aumentó la concentración del zinc, mientras que para E. coli si bien disminuyó casi a la mitad la producción de AP -1 a la concentración de 4.344  $\mu$ M de Zinc, volvió a aumentar dicha producción al aumentar la concentración de Zinc, aunque no alcanzó el mismo valor que AP-1 tuvo a la concentración de 0.191  $\mu$ M de Zinc.

En la gráfica # 3, se puede observar que en la concentración baja de zinc tanto en los probandos como en el control dieron el valor más alto, descendiendo cuando se incrementó la concentración de zinc a 4,344  $\mu$ M.

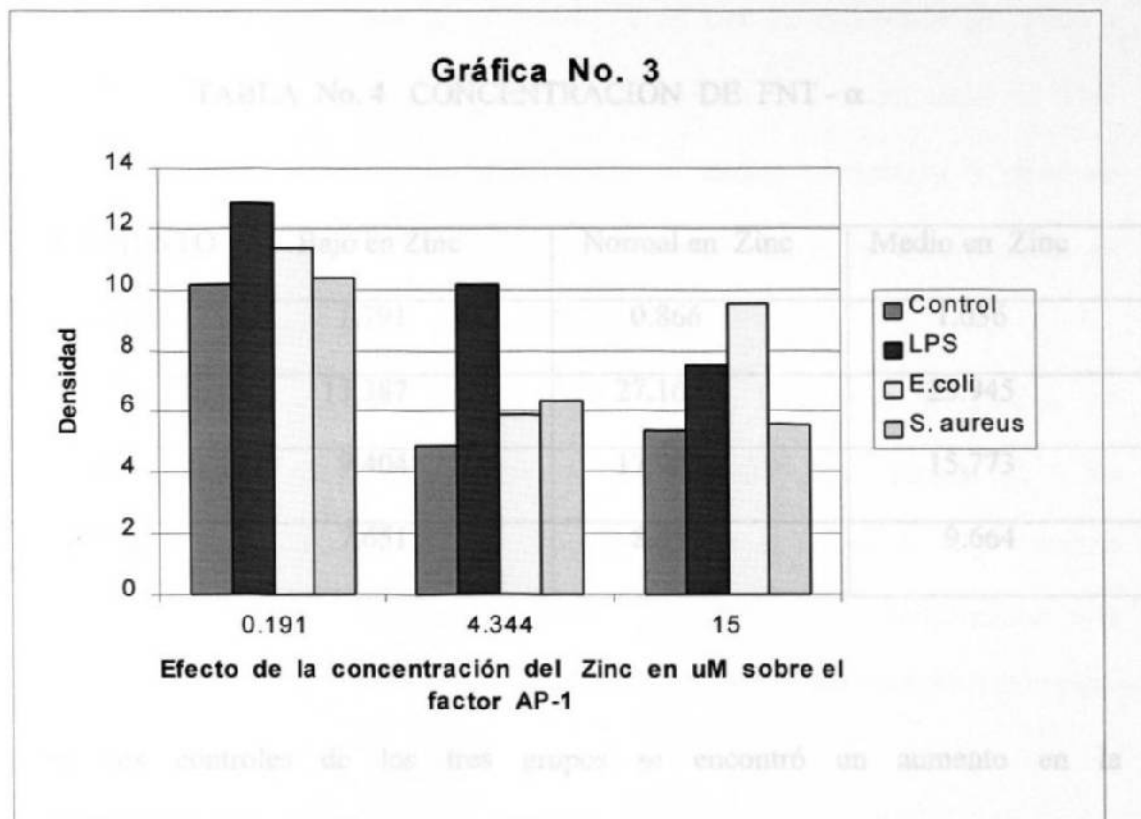


Fotografía No. 2 (EMSA) Ensayo del cambio de movilidad electroforética para AP-1

En tres diferentes concentraciones de Zinc.

## II-CITOCINAS

En la gráfica # 3, se puede observar que en la concentración baja de zinc tanto en los problemas como en el control dieron el valor mas alto, descendiendo cuando se incrementó la concentración de zinc a 4.344  $\mu\text{M}$ .



Posteriormente cuando se elevó la concentración a 15  $\mu\text{M}$  el control permaneció casi sin cambio, mientras que de los estimulados con la bacteria gram negativa y el LPS tuvieron un valor mas alto.

## II.- CITOCINAS :

A.- FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- ALFA ( FNT -  $\alpha$  ) .- Los valores encontrados a las 7 hrs en la determinación de esta citoquina, fueron expresados en nanogramos por ml y las medias obtenidas de todos los experimentos fueron las siguientes :

TABLA No. 4 CONCENTRACIÓN DE FNT -  $\alpha$ .

TRATAMIENTO	Bajo en Zinc	Normal en Zinc	Medio en Zinc
Control	1.791	0.866	1.036
LPS	13.387	27.160	25.945
<u>E. coli</u>	9.404	17.007	15.773
<u>S. aureus</u>	7.651	8.534	9.664

En los controles de los tres grupos se encontró un aumento en la producción de FNT -  $\alpha$  aunque el que utilizó sólo el medio de cultivo normal ( 4.344  $\mu$ M de zinc ) fué menor que los problemas que utilizaron ó media concentración de Zinc ( 15  $\mu$  ), ó baja concentración de zinc ( 0.191  $\mu$ M ). Las mayores concentraciones se obtuvieron en los problemas estimulados con LPS y con la bacteria gram negativa , siendo encontrados aún un poco más altos dichos valores a la concentración de Zinc de 4.344  $\mu$ M . La respuesta hacia la

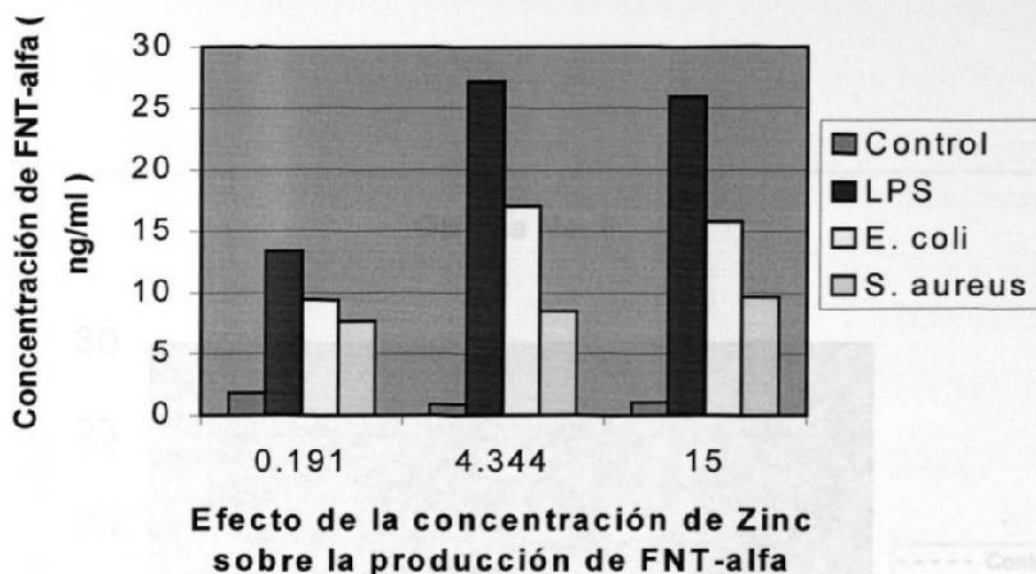


bacteria gram positiva ( S. aureus ) fue la menor encontrada de los grupos estimulados antigénicamente.

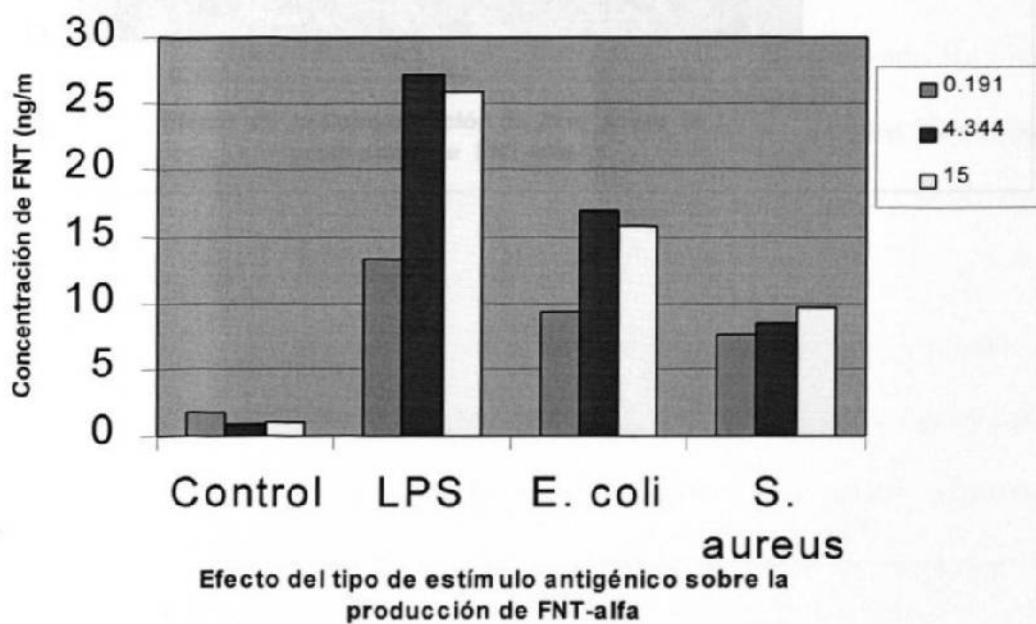
Observando las barras de distribución de los tres grupos de acuerdo a la concentración de Zinc ( gráfica # 4 ), tenemos que la mayor respuesta en todos los grupos fué para LPS , y la menor , ( exceptuando el control ) fué para la bacteria gram positiva , pero entre los tres grupos de distribución la más alta fué para LPS a la concentración de 4.344  $\mu\text{M}$  de zinc descendiendo un poco a la concentración de 15  $\mu\text{M}$  . En la gráfica 5 apreciamos la concentración de TNF -  $\alpha$  por grupo de experimentación encontrando la mayor producción a nivel de LPS , siguiéndole E. coli y siendo la mayor producción para la concentración de 4.344  $\mu\text{M}$  y siguiéndole la concentración de 15  $\mu\text{M}$  .

Los resultados ya descritos en las gráficas No. 4 y 5 se pueden ver muy claramente en la gráfica # 6 , en donde el valor más bajo corresponde a los controles y luego en forma ascendente encontramos la respuesta hacia la bacteria gram positiva, continuando la gram negativa y por último la concentración más alta para LPS.

GRÁFICA No 4

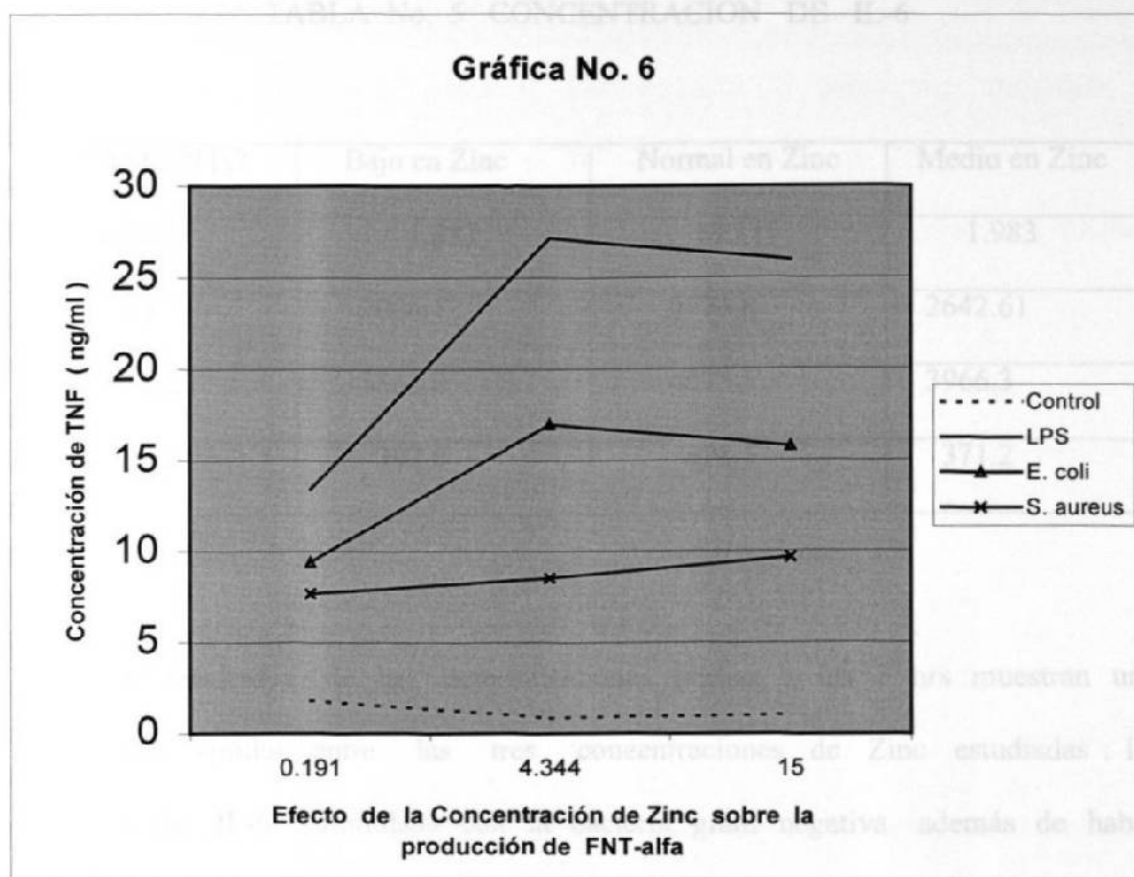


Gráfica No. 5



IL-6 INTERLEUCINA - SEIS ( IL-6 ) - Tabulando las medias obtenidas de las determinaciones tenemos los siguientes resultados :

Tabla No. 5 CONCENTRACIÓN DE IL-6



Se puede observar que el grupo con mayor concentración de zinc dentro de los tres grupos

de la gráfica 6, comparando las respuestas dependiendo del estímulo y de la bacteria, tuvo una elevada producción de IL-6 para *E. coli*, siguiéndole en grado de respuesta la respuesta a LPS. Se puede observar una mayor respuesta al estímulo de zinc de 4.344 µM, siguiéndole en grado de respuesta la respuesta de 15 µM de zinc. Los resultados correspondientes a la bacteria

B.- INTERLEUCINA – SEIS ( IL- 6 ) .-Tabulando las medias obtenidas de las determinaciones tenemos los siguientes resultados :

TABLA No. 5 CONCENTRACIÓN DE IL-6

TRATAMIENTO	Bajo en Zinc	Normal en Zinc	Medio en Zinc
Control	1.883	13.115	1.983
LPS	2006.1	2773.8	2642.61
Gram neg	3865.0	4075.3	3966.3
Gram pos	392.0	498.1	371.2

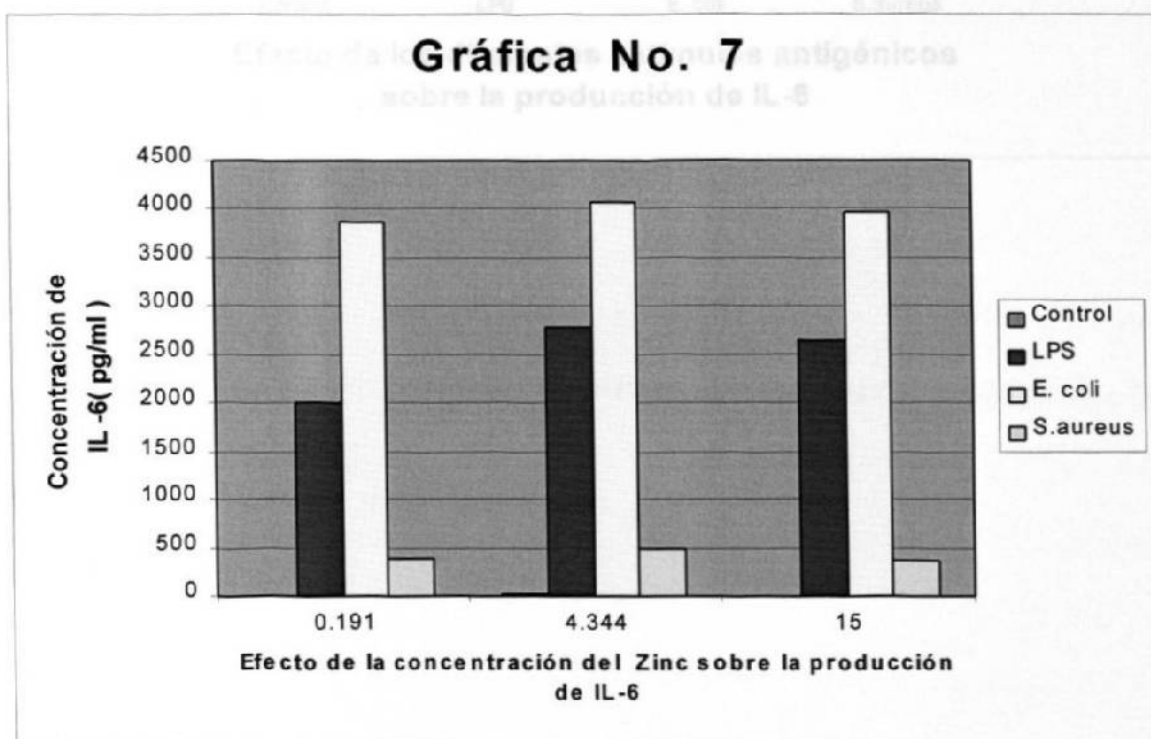
Los resultados de las determinaciones hechas a las 7 hrs muestran una distribución similar entre las tres concentraciones de Zinc estudiadas . La respuesta de IL-6 estimulada con la bacteria gram negativa además de haber sido encontrada en mayor concentración ( ver gráfica # 7 ) , tuvo una distribución muy semejante dentro de los tres grupos .

En la gráfica 8 , comparamos las respuestas dependiendo del estímulo y encontramos también una elevada producción de IL – 6 para E. coli , siguiéndole en concentración la respuesta a LPS . Se puede observar una mayor respuesta para la concentración de zinc de 4.344  $\mu$ M , siguiéndole en grado de respuesta la concentración de 15  $\mu$ M de zinc. Los resultados correspondientes a la bacteria

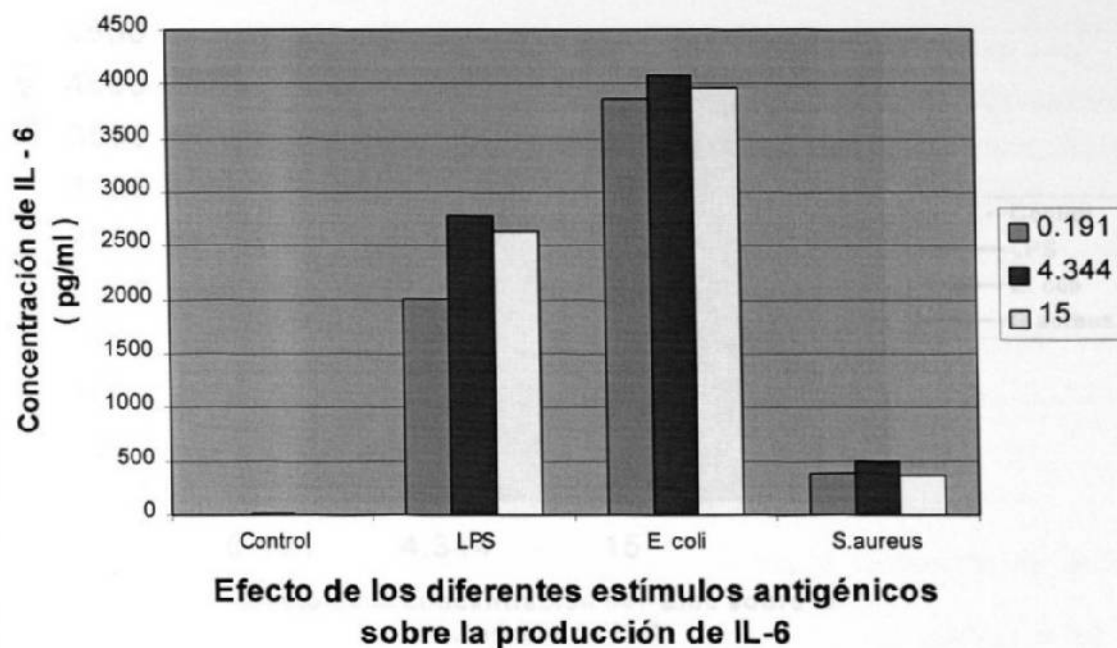
gram negativa tuvieron una significancia estadística de (  $p < 0.01$  ) frente a los controles de los tres grupos ,mientras que el resto de los grupos comparados con su control tuvieron una significancia estadística de (  $p < 0.05$  ).

El valor menor encontrado ( exceptuando el control ), fué para la bacteria gram positiva ,siendo casi 10 veces menor que la encontrada para la bacteria gram negativa . Se puede observar también que S. aureus ,no modificó la concentración de IL-6 con ninguna de las concentraciones de Zinc.

La gráfica # 9 nos señala muy claramente lo ya descrito para las gráficas # 7 y 8.

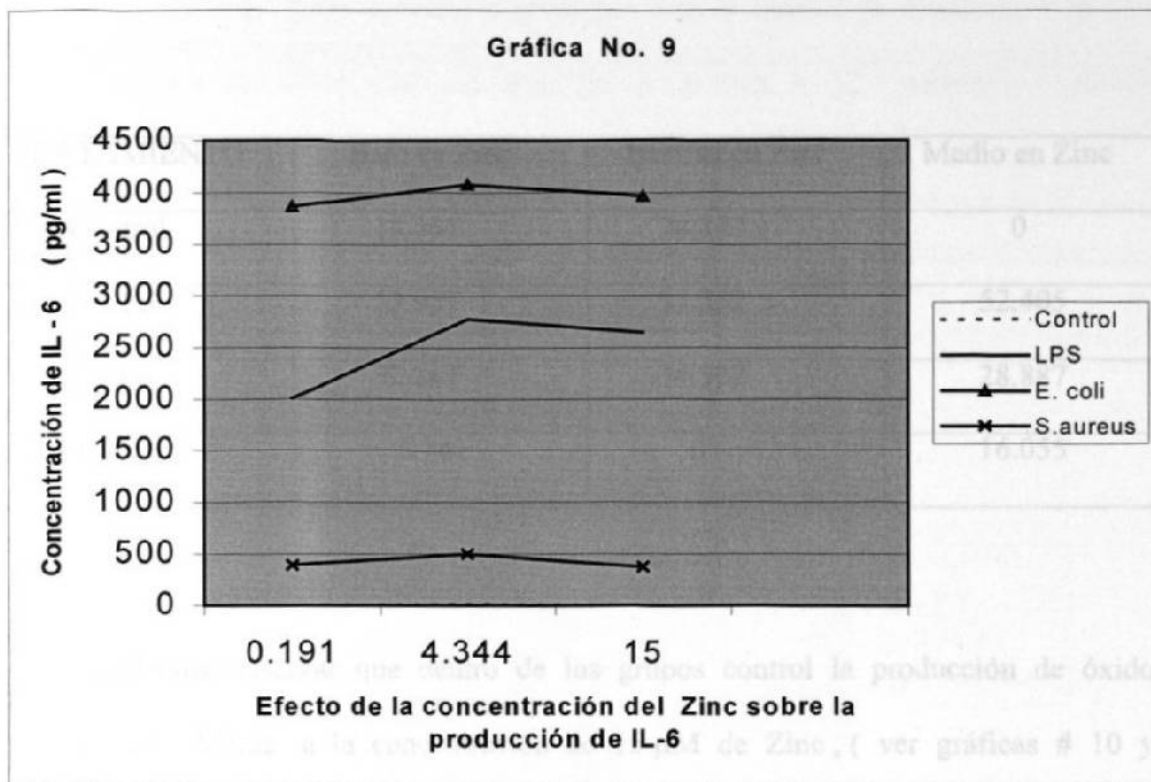


Gráfica No. 8



Los valores de las medias de esta molécula se expresaron en pg/ml a las 12 hrs después de la exposición al antígeno y expresadas en los ejes correspondientes.

TABLA No. 6 CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO



III.- ÓXIDO NÍTRICO ( NO ).-Los valores de las medias de esta molécula encontrados a las 12 hrs después de la exposición al antígeno y expresadas en  $\mu\text{M}$  fueron los siguientes:

TABLA No. 6 CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

TRATAMIENTO	Bajo en Zinc	Normal en Zinc	Medio en Zinc
Control	18.367	28.377	0
LPS	53.957	53.352	52.405
<u>E. coli</u>	32.167	34.562	28.887
<u>S.aureus</u>	6.74	0	16.055

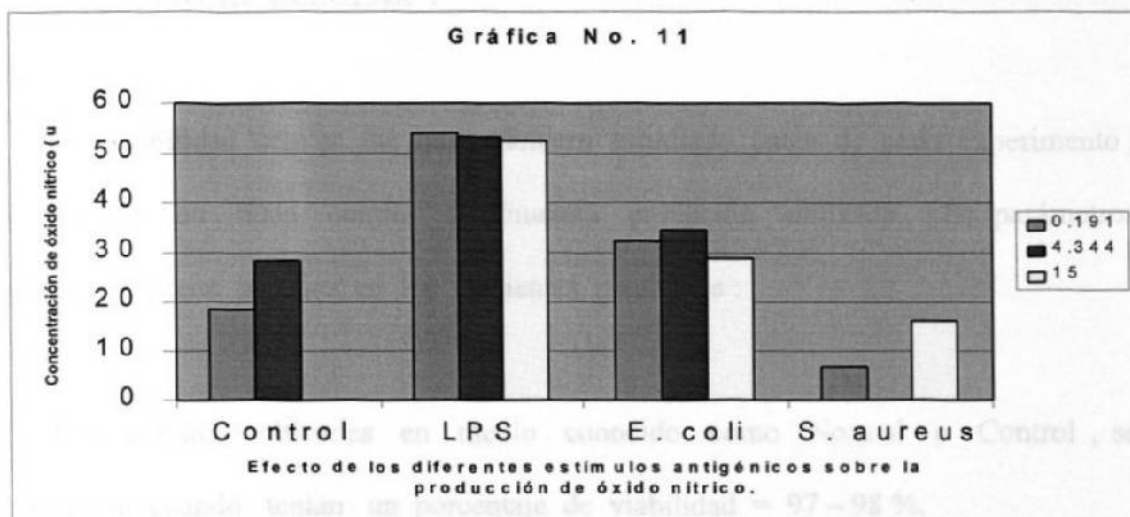
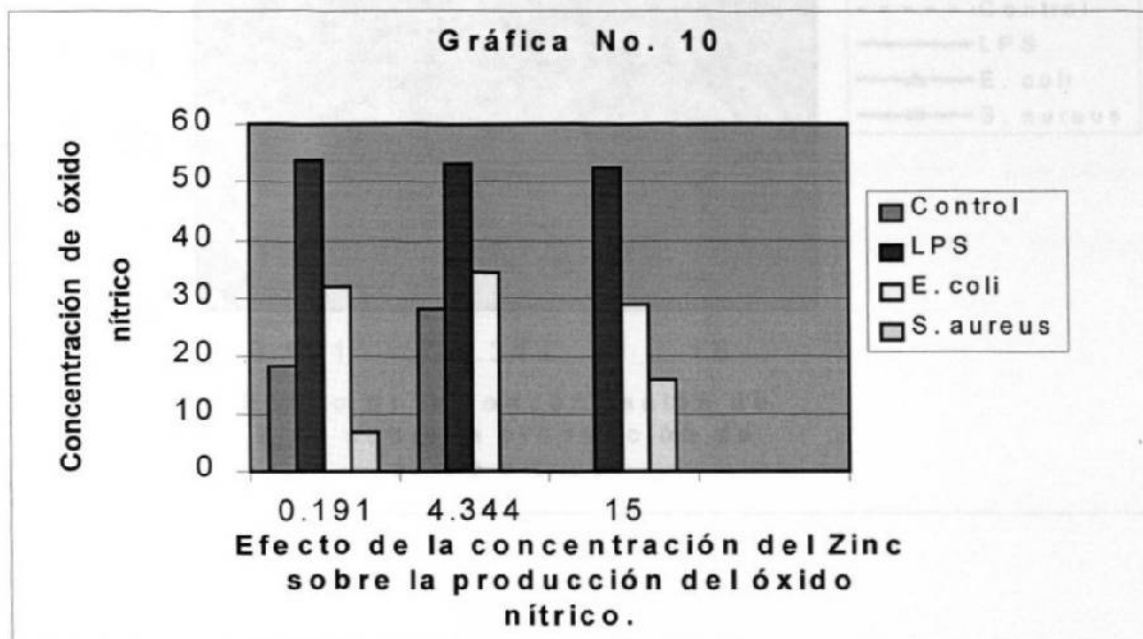
Podemos observar que dentro de los grupos control la producción de óxido nítrico fue inhibida a la concentración de 15  $\mu\text{M}$  de Zinc, ( ver gráficas # 10 y # 11 ). La respuestas observadas tanto para LPS como para la bacteria gram negativa tuvieron un similar comportamiento, puesto que fueron los valores más altos encontrados y no parecen haber sido afectadas por la concentración de zinc.

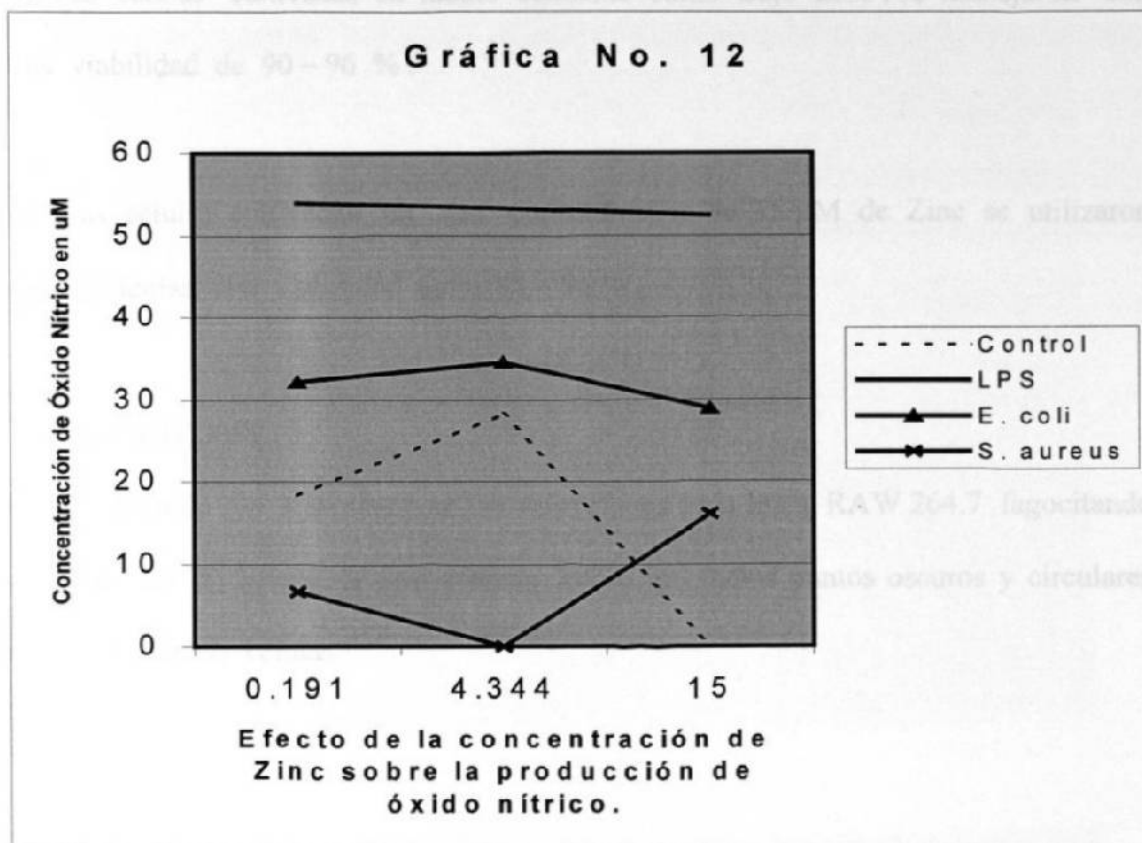
El óxido nítrico producido con el estímulo antigénico bacteriano gram positivo, fué la menor producción encontrada dentro de los problemas estudiados, mientras que la producción más alta fue para LPS.

La bacteria gram positiva ( S. aureus ) aumentó su producción de NO cuando se aumentó la concentración de zinc a 15  $\mu\text{M}$ . En la gráfica No. 11, observamos que la mayor producción de NO fué para el LPS, notando que la



respuesta a este antígeno, fué casi similar para las tres concentraciones de zinc, mientras que para la bacteria gram positiva, se inhibió la respuesta a la concentración de 4.344  $\mu\text{M}$  del zinc. En la gráfica # 12 podemos también observar lo ya descrito para las gráficas # 10 y 11.





#### IV.- VIABILIDAD CELULAR :

La viabilidad celular fué un parámetro estudiado antes de cada experimento, para llevar un buen control de nuestra población utilizada. Los parámetros utilizados fueron basados en los siguientes resultados :

- a).- Las células cultivadas en medio conocido como Normal o Control, se manejaron cuando tenían un porcentaje de viabilidad = 97-98 %.

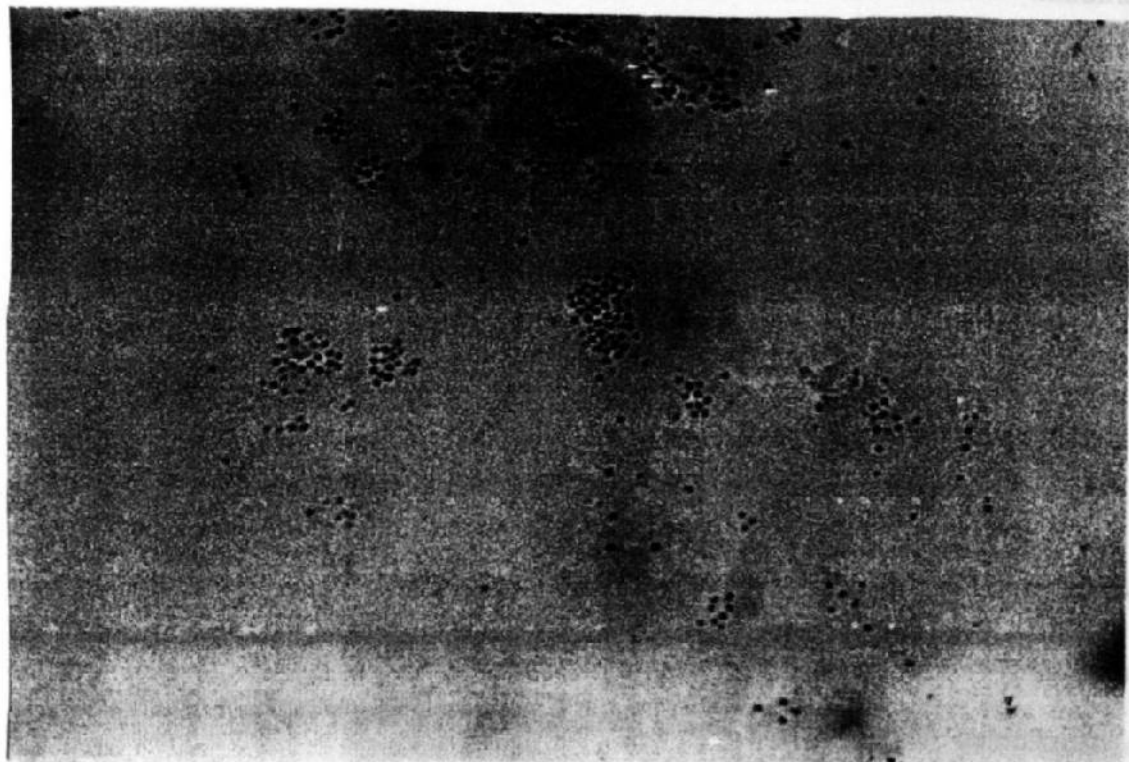
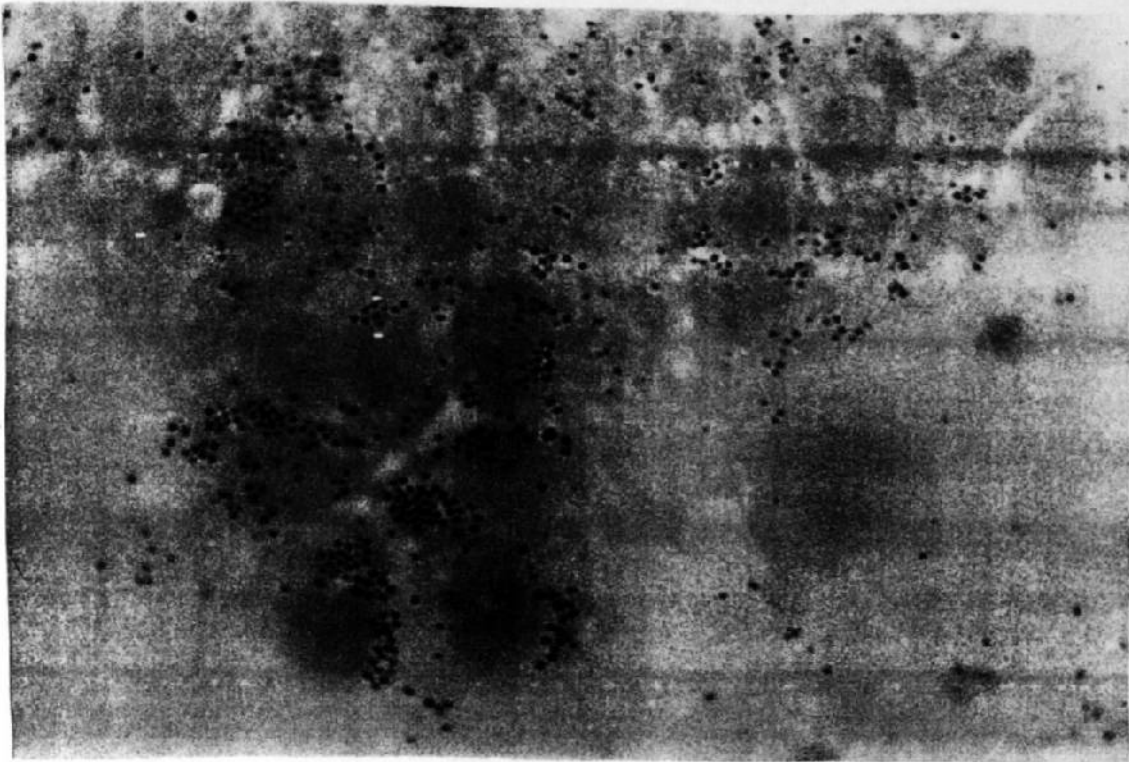
b).-Las células cultivadas en medio conocido como Bajo Zinc, se manejaron con una viabilidad de 90 – 96 %.

c).- Las células cultivadas en una concentración de 15  $\mu$ M de Zinc se utilizaron cuando tenían una viabilidad entre 91 – 96 %.

#### V.-FAGOCITOSIS.

En la fotografía No. 3 se observan los macrófagos de la línea RAW 264.7 fagocitando a la bacteria S. aureus, la cual aparece como pequeños puntos oscuros y circulares dentro de dichas células.

## DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

### 1.- FACTOR NF- $\kappa$ B .-

El zinc tiene un papel fisiológico fundamental como antioxidante por proteger grupos sulfidrilo contra la oxidación, e inhibir la producción de oxígeno reactivo para metales de transición ( 98, 99 ). Matthews et al ( 100 ) , reportaron que existe una regulación redox para el factor NF- $\kappa$ B, el cual es inhibido por agentes modificantes del grupo -SH , que involucra a la Tioredoxina como catalizador reductor central ( 101, 102 ) .

En base a lo anterior , nosotros postulamos que el zinc por sus propiedades ya descritas tendría un efecto antiinflamatorio, es decir inhibiría la producción del factor NF- $\kappa$ B a diferentes concentraciones de la fisiológica . Analizando los resultados encontramos que la banda p65 ( gráfica # 1 ) tanto del problema estimulado con LPS como el estimulado con S. aureus , mostró una inhibición tanto a nivel de la concentración de Zinc de 4.344 como a la de 15  $\mu$ M ; mientras que en la banda inferior p50 ( gráfica # 2 ) a nivel de los problemas estimulados con LPS y E. coli , mostró una marcada disminución a nivel de la concentración de 4.344  $\mu$ M de zinc .

Lo arriba descrito, podría ser explicado por el hecho que el factor NF- $\kappa$ B además de unirse al sitio  $\kappa$ B de la cadena  $\kappa$  del gene de las inmunoglobulinas en las células B, ( 103 ) puede unirse a otros genes , como ha sido demostrado en

estudios del receptor para IL-2R $\alpha$  y de la IL-2, por lo que parece ser un elemento de control vital en la activación del Linfocito T ( 104, 105 ). También se ha reportado que existe una regulación de la expresión del gene de IL-2 por las subunidades p50 y p65, que fué estudiada por Kang et al ( 106 ), donde encontraron que la cantidad del complejo p50-50 disminuye después de una completa estimulación antigénica, mientras que la cantidad del heterodímero p50-65 fué aumentada.

Libermann y Baltimore ( 107 ), han reportado que el factor NF- $\kappa$ B es un importante mediador en la producción de IL-6, mientras Le Clair, Blonar y Sharp, encontraron que el NF-IL6, el gene de la expresión de IL-6, interactúa con las proteínas NF- $\kappa$ B p50, estimulando de esta manera la producción de IL-6 siendo así, un importante evento en la respuesta inmune de fase aguda ( 108 ). Sundstedt et al ( 109 ) encontraron que el complejo heterodimérico p50-65 es predominantemente expresado en células T CD $_4^+$  activadas, mientras células T anérgicas expresaron principalmente el transcripcionalmente inactivo homodímero p50.

Todo parece indicar que el heterodímero p50-65, y el homodímero p65 estimulan la transcripción, mientras dímeros p50-50 pueden activar o suprimir la transcripción. En nuestros resultados encontramos que p50 fue inhibido a la concentración de 4.344  $\mu$ M, lo cual parece indicar que existe una "modulación" inmunológica por parte del zinc hacia este factor, que fué el más afectado.

Por último la respuesta de NF- $\kappa$ B al estímulo por S. aureus, parece guardar la misma relación del efecto tanto para p65 como para p50, a diferencia de que fue más marcado también para p50 demostrando que el aumento en la concentración del zinc no parece afectar el estímulo que produce esta bacteria.

## 2.- FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP-1 :

La modulación del estado redox como un mecanismo de control, es llevado a cabo en el activador de proteína 1, ( AP-1 ) por el factor redox-1 ( Ref-1 ), el cual es idéntico a una enzima reparadora de DNA, la endonucleasa AP ( 110, 111 ). En nuestro proyecto, habíamos postulado para el factor AP-1, lo mismo que para el factor NF- $\kappa$ B, que sería inhibido por el Zn tomando en cuenta también su capacidad redox anteriormente señalada y encontramos que, si bien disminuyó la cantidad del factor AP-1 a la concentración de 4.344 de zinc, sorprendentemente aumentó considerablemente a la concentración de 0.191  $\mu$ M de zinc. Tratando de justificar lo anterior tenemos, que desde el punto de vista inmunológico la interleucina-1 ( IL-1 ), induce el crecimiento de Linfocitos T para actuar como una segunda señal, - junto con el antígeno -, en aumentar la producción de interleucina-2 ( IL-2 ). Muegge y Col. ( 112 ) reportaron que IL-1 aumenta la expresión del RNAm de c-Jun, mientras que la señal antigénica aumenta la expresión del RNAm del c-Fos así, los dos componentes del factor AP-1 son independientemente regulados y pueden servir como un mediador nuclear de algunas acciones de IL-1 en las células. Jain y col. ( 113 ) publicaron que el componente nuclear del factor NF-AT es el factor

transcripcional AP-1, demostrando también al mismo tiempo que la forma inducible nuclear de NF-AT contiene las proteínas Jun / Fos. Dicho factor NF-AT es inducido en células T estimuladas a través del receptor de células T y el complejo CD3 ( TCR / CD3 ) y es requerido para la inducción del gene de la interleucina 2 ( IL-2 ) ( 114 ) .

Tomando en cuenta nuestros resultados y lo descrito anteriormente, podemos pensar en la posibilidad que esta elevación del AP-1 al disminuir la concentración de zinc en el organismo, sea realmente una señal que no había sido considerada, para la producción de la IL-2 . Tratando de apoyar lo anterior, tenemos que Kang y Cols. ( 115 ) , encontraron que en células T anérgicas el factor de transcripción AP-1 fué encontrado en baja concentración , datos que también concuerdan con lo publicado por Sudstedt ( 109 ) , en los cuáles células T CD4+ anérgicas , contienen reducidos niveles de complejos AP-1 y Fos / Jun contenidos en NF-AT .

### 3.- CITOQUINAS :

#### a).- FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA. ( TNF- $\alpha$ ) .

De acuerdo a nuestros resultados, hubo una gran respuesta en la producción de FNT- $\alpha$  frente al estímulo antigénico con LPS y E. coli , lo cual no es de gran trascendencia en este trabajo, puesto que ya ha sido ampliamente documentado que el FNT- $\alpha$  juega un papel endocrino muy importante en la patogénesis del shock endotóxico por bacterias gram negativas ( 116, 117, 118 ) ;



lo que llama la atención aquí, es que los picos de mayor producción para este factor fueron a las concentraciones de 4.344  $\mu\text{M}$  y 15  $\mu\text{M}$ . Esto parece indicar que el FNT- $\alpha$ , se puede elevar a otra concentración diferente de la encontrada para el factor AP-1, lo cuál parece ser un juego entre mecanismos homeostáticos que tratan de guardar un equilibrio para mantener un "efecto de respuesta de fase aguda"; además conviene señalar que el FNT- $\alpha$ , tiene una de las funciones más importantes como citoquina, que es la de ser capaz de regular la producción de factores como: NF- $\kappa\text{B}$  ( 119, 120, 121 ) y AP- 1 ( 122 , 123 ) y de interleucinas como: IL- 6 e IL- 1 ( 124, 125, 126, 127 ).

b).- INTERLEUCINA - 6 :

Nosotros encontramos que la mayor producción de IL- 6 en nuestro estudio correspondió, a la inducida por la bacteria gram negativa ( E. coli ), sin una aparente influencia del zinc en la modulación de su respuesta . Ha sido demostrado, que componentes bacterianos tales como , fosfolipasas y lipopolisacáridos , son liberados después de la disrupción de las bacterias gram negativas y tienen la habilidad de liberar Acido Araquidónico , el cuál a través de la vía de la Ciclooxygenasa , es metabolizado para formar prostaglandina  $\text{E}_2$  , ( también , la endotoxina bacteriana ha sido demostrada que causa un incremento dosis-dependiente, en la producción de prostaglandinas )( 128 ) , las cuales son capaces de estimular a su vez la secreción de IL - 6 en una forma biológicamente activa ( 129 ). Nuestros resultados en esta sección , coinciden con lo recientemente publicado por Reisenberger et al ( 130 ) , quienes encontraron

mayor producción de IL - 6 con dos bacterias gram negativas E. coli y Bacteroides fragilis, en contraste con la bacteria gram positiva ( S. aureus ), que dió una pobre respuesta de IL - 6 ( ver gráfica # 8 ). Cabe señalar también , que ha sido recientemente publicado por Zhang y Col. ( 131 ), que LP ( lipoproteína ) y LPS actúan sinérgicamente para inducir producción de citoquinas en macrófagos , a través de diferentes receptores y diferentes señales , que cuando el LPS actúa solo.

Por otro lado, tratando de justificar la elevada concentración de IL- 6 hallada, conviene señalar que el gene encargado de la producción de IL- 6 , es también fuertemente activado por el factor transcripcional NF-  $\kappa$ B ( 132 ,133 ) y por AP- 1, factores que aunque son influenciados por la concentración de zinc, activan la producción de ésta citocina( 134, 135 ). También debemos recordar , que existe la activación de IL- 6 mediada por IL- 1 y FNT-  $\alpha$ , según lo reportado por Shalaby y Cols. ( 136 ) y que la IL- 6 , a su vez puede funcionar como un modulador negativo de los niveles de FNT- $\alpha$  ( 137 ).

#### 4.- ÓXIDO NÍTRICO :

En nuestros resultados , la producción de NO por S. aureus, fué menor aún que la concentración encontrada en el control , sin una aparente influencia del zinc. Malawista et al ( 138 ), reportaron evidencia de muerte para S. aureus por NO en neutrófilos humanos, mientras el grupo de Kaplan y Col. ( 139 ) no fueron capaces de encontrar un mecanismo NO-dependiente para muerte bacteriana,

Lo que según estos autores explican es que probablemente los PMNs producen menos cantidad de NO que los Macrófagos. Creemos que en nuestros resultados influyó el hecho que la bacteria utilizada estaba muerta, lo cual según se ha reportado ( 140 ) parece ser un punto crítico para algunos microorganismos.

Los Macrófagos utilizados en nuestro sistema, línea RAW 264.7 han sido previamente comprobados ser productores de NO frente a estímulos como IFN- $\gamma$ , E. coli y LPS ( 141 ), lo cual concuerda totalmente con nuestros resultados, si observamos las gráficas # 10 , # 11 y # 12 , que corresponden a los problemas retados respectivamente con los antígenos ya mencionados.

El segundo punto a señalar aquí es la disminución que exhibió el control de NO ( sin estímulo antigénico ) a la concentración de 15  $\mu$ M de Zn , ( concentración Fisiológica Normal ) manifestando una regulación por el Zinc , lo cual ha sido documentado por Cuajungo & Lees ( 142 ). Además el grupo de Persechini y Col. ( 143 ) , han reportado que el Zinc es capaz de inhibir completa y reversiblemente la actividad de la sintetasa inducible del óxido nítrico ( iNOS ).

También es conveniente señalar que la activación de NF- $\kappa$ B, estimula la transcripción del gene iNOS , conduciendo a un incremento de óxido nítrico ( 144, 145 ), lo cual bien pudo haber sucedido en nuestro sistema , activados con LPS y E. coli así como el estímulo colateral efectuado por FNT- $\alpha$  , quién también es capaz de iniciar la producción de iNOS ( 146, 147 ).

Por último, referente al factor AP- 1 ha sido reportado que NO aplicado a células induce la expresión de genes inmediatos y tempranos como c-Fos y

c-Jun los cuales conducen a un fuerte aumento en la actividad de AP-1 ( 148,149 ).

En las gráficas # 13, # 14, # 15 , intentamos relacionar las concentraciones de TNF- $\alpha$  y las de NO, basados en el probable efecto sinérgico que pudieran tener estos dos elementos entre sí y manejándolos con respecto a la concentración de Zinc . Observamos que a la concentración de 15  $\mu$ M de zinc, el efecto fué sinérgico de acuerdo al estímulo que lo provocó, tanto en el control como en los problemas.

## DISCUSIÓN GENERAL

El descenso de Zinc en plasma, puede contribuir a evitar la implantación bacteriana puesto que es ahora conocido, que todo organismo viviente requiere zinc. Las bacterias, requieren al menos de  $10^{-10}$  M a  $10^{-7}$  M para su crecimiento y de  $10^{-5}$  M un óptimo crecimiento ( 150, 151 ).

Aunque solo pequeñas cantidades son necesarias, la función del zinc en Metaloenzimas de diferentes clases como : Aldolasas , Proteasas , Dehydrogenasas , Polimerasas y Transcriptasas ,muestra la importancia de este metal ( 150, 152 ). Esporulación y producción de Antibiótico por especies de Bacillus , son fenómenos también dependientes del Zinc ( 153, 154 ) , y la metaloenzima elastasa de Pseudomonas y la producción de Proteasas por Pseudomonasaeruginosa en medio de cultivo, requiere trazas de algunos cationes, incluyendo concentraciones micromolares de Zinc ( 155 ). Sugarman et al ( 156 ) han publicado que el Zinc significativamente aumenta la habilidad de bacterias gram positivas y gram negativas con pilis para adherirse a células Hela, efecto no presente en microorganismos que carecen de pilis.

Por otro lado, también existe enorme información sobre el efecto activador del Zinc en la respuesta inmune, ( 157, 158, 159, 160, 161, 162 ) , pero en este caso del inicio de una infección ó estimulación con bacterias ó en la Endotoxemia , cuando el Zinc disminuye, los fenómenos de

regulación son diferentes porque nos encontramos frente un proceso agudo. Analizando nuestros resultados obtenidos y la bibliografía consultada, proponemos que, el activador de Proteína - 1 ( AP -1 ) aumenta significativamente ante la disminución del Zinc, lo que produce una señal para la producción de IL- 6 por el Macrófago. Este gran incremento en la producción de IL- 6 es a su vez, otro disparo que estimula la producción de la Metalotioneína, la cual puede capturar más Zinc en el Hígado ( 163, 164 ) y almacenarlo actuando así como un regulador, de la concentración de Zinc plasmático. Ghassemifar et al ( 165 ) y Sugaman et al ( 166 ) entre otros, han publicado que esta baja de Zinc en el cuerpo humano, parece coincidir con una mayor actividad fagocítica. Stankova et al ( 167 ), reportó al respecto que la actividad de movilización y migración de macrófagos peritoneales, fué máxima en cobayos alimentados con dieta deficiente en Zinc, lo cual resultó en una disminución de zinc sérico; además, Chvapil y su grupo ( 168 ) observaron que una inadecuada fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, había sido reportada por urólogos en algunas infecciones inflamatorias bacterianas de la próstata. Chvapil y Cols. puntualizan el hecho de que el fluido prostático, el fluido seminal y tejido prostático, son estructuras que contienen, las más altas concentraciones de Zinc en el cuerpo humano, por lo cual señalan que esto influye para mantener la naturaleza crónica de las infecciones en estos tejidos.

En este caso, nuestra Hipótesis fue cierta al proponer que el Zinc, actuaría como un inhibidor de los factores NF- $\kappa$ B y AP-1.

El factor NF- $\kappa$ B en la banda superior p65, está elevado al igual que AP-1 a la concentración de 0.191  $\mu$ M, para estar posteriormente disminuído en las otras concentraciones, además sabemos que este aumento del NF- $\kappa$ B dará el disparo para la producción de FNT- $\alpha$ , que junto con el estímulo antigénico elevará considerablemente la producción de este factor que con su propiedad que tiene de estimular al factor NF- $\kappa$ B reflejará aún más el efecto inhibitorio del Zinc como ha sido recientemente propuesto por Connell y Col. (169).

Ahora, respecto a la subunidad p50, no se se comportó de la misma manera que p65, puesto que permaneció al mismo nivel a la concentración de 0.191 y de 15  $\mu$ M de Zinc y descendió a 4.344  $\mu$ M. Es interesante si tomamos en cuenta que p50 interactúa con el gene de la expresión de IL-6, estimulando ó inhibiendo su producción por lo que el zinc podría no tener un efecto relevante en su producción (108). Como dato importante para el factor p50, tenemos que han sido reportados defectos del linfocito "B" como falta de proliferación y anomalías en la respuesta de anticuerpos cuando carecen de esta unidad (170). Además, se ha publicado que aunque p50, no juega un papel en el desarrollo del sistema inmune, es un componente crítico en la programación de los genes que regulan la respuesta de Linfocitos maduros y la respuesta no-específica a agentes patógenos

( 171 ).

FNT -  $\alpha$  fue, contrario a lo propuesto , el que se vió enormemente influenciado por el Zinc, aumentando su concentración al aumentar la concentración del zinc ( 172 ) . Podríamos plantear aquí, que el organismo al disminuir el Zinc plasmático, también minimiza el probable efecto mortal que podría ser disparado a través del Zinc en la respuesta de fase Aguda ?.

Consideremos ahora la IL -6 quien también se vió influida por el Zinc ( 173 ) , aunque no en la proporción de FNT -  $\alpha$  . Sabemos que el gene de la IL-6 tiene un sitio de unión para AP - 1, y AP-1 se eleva cuando se depleta el zinc , así que podríamos esperar esta respuesta tan elevada, de IL -6, que junto con los estímulos que va a recibir de TNF-  $\alpha$  e IL - 1 va a contribuir importantemente en el desarrollo del shock séptico ( 174, 175 ) , también es conveniente señalar, que nosotros encontramos una enorme diferencia en la producción de IL-6 entre las bacterias gram positiva y gram negativa , aunque Hack et al ( 50 ), reportaron no hallar diferencia en la producción de IL -6 en el suero de humanos afectados de Shock séptico. Cabe aclarar que las bacterias usadas en nuestro sistema, fueron muertas por calor y esto probablemente influyó en la concentración de IL -6.

IL -6 también debe ser contemplada desde otros puntos de vista por ejemplo : la asociación que tiene con enfermedades como , enfermedad



de Castleman's, artritis reumatoide, y mixoma cardíaco, donde se ha evidenciado a IL-6 como un potente factor trombopoyético (176); así también, su importante función en rechazo de trasplantes de diferentes órganos (177) y en enfermedades autoinmunes, plasmacitoma / mieloma, osteoporosis y SIDA (134). Futuras direcciones que se tienen acerca del tratamiento para las enfermedades provocadas por IL-6, van encaminadas hacia el uso de antagonistas de IL-6 como el bloqueo del receptor IL-6 R $\alpha$  y el traductor de señal gp 130 (178,179).

También es conveniente señalar, que Taubeneck et al (180) han publicado que cuando se administra FNT -  $\alpha$  en ratones hembra embarazadas, se provoca un acumulamiento de Zinc en el hígado, dejando al producto en escasez del elemento, lo que provoca malformaciones embriológicas por la deficiencia de Zinc. Traduciendo esta información a mujeres embarazadas, que padecen enfermedades infecciosas y que incrementan su producción de FNT -  $\alpha$ , ¿podríamos esperar que este mismo fenómeno ocurra y tratar de prevenir probables defectos en el neonato?

También es necesario enfatizar, la importancia de la finalización del proceso de inflamación, puesto que es conocido, que Rel A (p65) tiene alta homología con el oncogene v-Rel (originalmente descrito como un retrovirus aviario Rev T), el cual causa tumores de células linfoides en pájaros (181, 22), por lo que la inflamación constante ó repetida pudiera influir en estos procesos oncogénicos.

Por otro lado, en AP-1 tenemos que, una desregulada expresión de c-Jun y c-Fos, conducen a transformación neoplásica de fibroblastos de Rata y también se encuentran elevados en cancer cervical pre-maligno y maligno . Además Sun y Oberley ( 110 ), describen al Activador AP -1, como un complejo de proteínas oncogénicas de las familias Jun y Fos : Jun ( c-Jun, Jun B, & Jun D ) y ( c-Fos, Fra-1, Fra-2 & Fos- B ). La sobreexpresión de c-Fos y c-Jun en células malignas, afecta la expresión genética de MHC clase 1, permitiendo de esta manera a las células ser altamente metastásicas ( 183 ), de la misma manera que p50 ( homodímero ), actúa como un represor también de MHC clase 1, causando alta malignidad y baja inmunogenecidad de ciertos tumores murinos ( 184 ).

Ahora por último y apoyando nuestros resultados, se ha reportado que suplementación de Zinc parenteral en adultos humanos, durante la fase aguda de la respuesta , incrementa la respuesta febril ( 185 ), por lo tanto se debería considerar el manejo del Zinc con discreta precaución, dentro de la práctica médica ( 186 ).

## CONCLUSIONES

1.-A bajas concentraciones de Zinc se observó que el factor NF- $\kappa$ B y el factor AP-1 aumentaron su expresión celular.

2.-La producción del FNT- $\alpha$  fue mayor a las concentraciones del Zinc cercanas a la fisiológica.

3.-Las elevaciones encontradas de IL-6 fueron independientes de la concentración de Zinc usada.

4.-Estos resultados sugieren que a bajas concentraciones de Zinc hay mecanismos diferentes de activación para la producción de los factores transcripcionales estudiados y para los mediadores pro-inflamatorios FNT- $\alpha$ , IL-6 y NO.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1.-**Pekarek , R .S., and Beisel ,W.** 1969. Effect of Endotoxin on Serum Zinc Concentrations in the Rat. *Applied Microbiology* . **18** : 3 : 482 – 484 .
- 2.-**Pekarek , R.S., and Beisel , W.R.** 1971 . Characterization of the Endogenous Mediator ( s ) of Serum Zinc and Iron Depression During Infection and Other Stresses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **138** : 728 – 732 .
- 3.-**Pekarek, R. S., Burghen, G.A., Bartelloni, P.J., Calia, F.M., Bostian,K.A., and Beisel,W.R.** 1970. The effect of live attenuated Venezuelan equine encephalomyelitis virus vaccine on serum iron , zinc , and copper concentrations in man. *J. Lab. Clin. Med.* **76** : 293 – 303.
- 4.-**Pekarek , R. S.** 1971. Effect of Synthetic Double-Stranded RNA on Serum Metals in the Rat, Rabbit and Monkey . *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **136** : 584 – 587.
- 5.-**Butler, E. J., and Curtis , M. J.** 1973 . The effects of *Escherichia coli* and ACTH on the plasma Zinc Concentration in the Domestic Fowl. *Res. Vet. Sci.* **15** : 363-367.
- 6.-**Wannemacher, R.W., Pekarek, R.S., Klainer, A.S., Bartelloni , P.J., Dupont, H.L., Hornick, R. B., and Beisel, W. R.** 1975 . Detection of a Leukocytic Endogenous Mediator-Like Mediator of Serum Amino Acid and Zinc Depression During Various Infectious Illnesses.

- 7.-Kampschmidt , R. F. and Upchurch , H. F. 1970 . The effect of Endogenous Pyrogen on the Plasma Zinc Concentration of the Rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **134** : 1150- 1152.
- 8.-Pekarek, R. S., Wannemacher, Jr., R. W., and Beisel,W.R. 1972 . The effect of leukocytic Endogenous Mediator ( LEM ) on The Tissue Distribution of Zinc and Iron. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **140** : 685 – 688.
- 9.-Pekarek R. S., and Evans G. W. 1975. Effect of Acute Infection and Endotoxemia on Zinc Absorption in the Rat. Proceeding of Society for Experimental Biology and Medicine . **150** : 755 – 758 .
- 10.-Goldblum, S. E., Cohen, D. A., Jay, M., and McClain , C. J. 1987. Interleukin 1 –induced Depression of Iron and Zinc : Role of Granulocytes and Lactoferrin. The American Physiological Society . **252** : E-27 – E-32.
- 11.-Etzel, K. R., Swerdel, J. N., and Cousins, R. J. 1982. Endotoxin – Induced Changes in Copper and Zinc Metabolism in the Syrian Hamster. J. Nutr. **112** : 2363 - 2373.
- 12.-Sobocinski, P. Z., Canterbury, Jr.,W. J., Hauer, E. C., and Beall, F. A. 1979. Induction of Hypozincemia and Hepatic Metallothionein Synthesis in Hypersensitivity Reactions. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **160** : 175 – 179 .
- 13.-Sobocinski, P. Z., Canterbury, Jr.,W. J.,Mapes, C. A., and Dinterman , R. E. 1978. Involvement of Hepatic Metallothioneins in Hypozincemia Associated with Bacterial Infection. Am. J. Physiol. **234** : E 399 – E 406.
- 14.-Kampschmidt, R. F., and Upchuch, H. F. 1962. Effects of Bacterial Endotoxin on Plasma Iron. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **110** : 191 – 193.

- 15.-**Giroux, E. L.** 1975 . Determination of Zinc Distribution Between Albumin and  $\alpha$ 2-Macroglobulin in Human Serum. *Biochemical Medicine* . **12** : 258 – 266.
- 16.-**Klasing, K.,C.** 1984 . Effect of Inflammatory Agents and Interleukin – 1 on Iron and Zinc Metabolism. *Am. J. Physiol.* **247** : R901 – R904.
- 17.-**Tupper, E. D. R., and Wormall, A.** 1961 . The zinc Content of Erythrocytes and Leukocytes of Blood from Normal and Leukemic Subjects . *Biochem. J.* **78** : 578-587.
- 18.-**Vallee, B. L., and Gibson, J. G.** 1948 . The Zinc Content of Normal Human Whole Blood , Plasma , Leucocytes and Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **176** : 445 – 457.
- 19.-**Tupper, E. D. R., and Wormall, A.** 1961. Transport of Zinc and Incorporation of Zinc in Leucocytes. *Biochem. J.* **82** : 466 – 476.
- 20.-**Sen, R., Baltimore, D.** 1986 . Multiple Nuclear factors interact with the Immunoglobulin enhancer Sequences. *Cell* ; **46** : 705 – 16.
- 21.-**Sen Ranjan , and Baltimore David.** 1986 . Inducibility of  $\kappa$  Immunoglobulin Enhancer- Binding Protein by a Posttranslational Mechanism. *Cell.* **47** : 921 – 928.
- 22.-**Baeuerle Patrick, A., and Henkel Thomas.** 1994 . Function and Activation of NF- $\kappa$ B in The Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* **12** : 141- 179 .
- 23.-**Baeuerle Patrick, A., and Baltimore David.** 1996. NF- $\kappa$ B : Ten Years After. *Cell.* **87**: 13 – 20 .
- 24.-**Ghosh ,S.,Gifford, A. M.,Riviere, L.R., Tempst,P., Nolan, G.P., and Baltimore D.** 1990 . *Cell* . **62** : 1019 – 1029.

- 25.-**Gilmore Thomas,D.** 1990 . NF- $\kappa$ B, KBF1, dorsal , and related Matters. *Cell.* **62** : 841- 843.
- 26.-**Ghosh Sankar, & Baltimore David.** 1990 . Activation in vitro of NF- $\kappa$ B by Fosforilation of its inhibitor I $\kappa$ B. *Nature.* **344** : 678 – 682.
- 27.-**Baeuerle Patrick,A., and Baltimore David.** 1988 . I $\kappa$ B : A Specific Inhibitor of the NF- $\kappa$ B Transcription Factor. *Science.* **242** : 540 – 546.
- 28.-**Palombella,V. J.,Rando,O.J.,Goldberg, A.L. and Maniatis, T.** 1994. The Ubiquitin-Proteosome Pathway is Required for Processing the NF- $\kappa$ B Precursor Protein and the Activation of NF- $\kappa$ B. *Cell.* **78** : 773 – 785.
- 29.-**Zabel, U.,Henkel, T., Dos Santos Silva, M. and Baeuerle, P.A.**1993 . Nuclear uptake control of NF-  $\kappa$ B by MAD-3 an I $\kappa$ B Protein present in the Nucleus. *The EMBO Journal* , **12** : 201 – 211.
- 30.-**Arenzana-Seisdedos,F.,Thompson,J., Rodriguez,M.S., Bachelerie, F., Thomas, D., Hay,R.T.** 1995. Inducible Nuclear expression of newly synthesized I $\kappa$ B $\alpha$  negatively Regulates DNA-binding and Transcriptional activities of NF- $\kappa$ B . *Mol. Cell. Biol.* **15** : 2689 – 2696.
- 31.-**Bennett, B.L., Lacson,R.G., Chen, C.C.,Cruz, R.,Wheeler , J.S.,Kletzien, R.F.,Tomaselli, A.G.,Heinrikson, R.L. and Manning, A.M.** *The Journal of Biological Chemistry.* **271** : 19680 – 19688.
- 32.-**Barnes, P. J., and Karin, M.** 1997 . Nuclear Factor- $\kappa$ B- A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *The New England Journal of Medicine.* **336** : **15** : 1067 – 1071.

- 33.-**Angel , P. and Karin , M.** 1991. The role of Jun , Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta* , **1072** : 129 – 157 .
- 34.-**Karin Michael.**,1992 . Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease. *FASEB J.* **6** : 2581 – 2590.
- 35.-**Lee,W., Mitchell, P. and Tjian, R.** 1987 . Purified Transcription Factor AP-1 Interacts with TPA- Inducible Enhancer Elements. *Cell* , **49** : 741 – 752 .
- 36.-**Curran , T. and Franza , B. R. Jr.** 1988 . Fos and Jun : The AP-1 Connection. *Cell* , **55** : 395 – 397 .
- 37.-**Angel, P.,Imagawa , M.,Chiu, R., Stein, B., Imbra , R. J.,Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, and Karin M.** 1987 . Phorbol Ester – Inducible Genes Contain a Common Cis Element Recognized by a TPA – Modulated Trans-Acting Factor . *Cell* . **49** : 729 – 739 .
- 38.-**Angel , P., Hattori , K., Smeal , T., and Karin , M.** 1988 . The Jun Proto-Oncogene is Positively Autoregulated by its Product , Jun /AP-1.*Cell* . **55** : 875 – 885 .
- 39.-**Nakabeppu ,Y., Ryder , K, and Nathans , D.** 1988. DNA Binding Activities of Three Murine Jun Proteins : Stimulation by Fos. *Cell* . **55** : 907 – 915 .
- 40.-**Gentz, R.,Rauscher III , F. J., Abate , C.,Curran , T.** 1989 . Parallel Association of Fos and Jun Leucine Zippers Juxtaposes DNA Binding Domains . *Science* . **243** . 1695 – 1699.



- 41.-Prywes, R., Dutta, A., Cromlish, J. A. and Roeder, R.G. 1988 . Phosphorylation of serum response factor, a factor that binds to the serum response element of the c-FOS enhancer . Proc. Natl. Acad. Sci. **85** : 7206 – 7210 .
- 42.-Kouzarides, T., & Ziff, E. 1988 . The role of the Leucine Zipper in the Fos - Jun Interaction . Nature . **336**, : 646 – 651.
- 43.-Abate, C., Luk, D., Gentz, R., Rauscher III, F. J., and Curran, T. 1990 . Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of Fos and Jun : Both Fos and Jun contact DNA directly . Proc. Natl. Acad. Sci. **87** : 1032 – 1036.
- 44.-Koj, A., 1985. In The acute Phase Response to injury and infection ( Gordon, A.H. & Koj, A., eds. ) pp. 139 – 232, Elsevier Amsterdam.
- 45.-Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Tran-Thi, T., Decker, K., and Heinrich, P.C. 1988. Regulation of synthesis and secretion of major rat acute-phase proteins by recombinant human interleukin - 6 ( BSF-2 / IL-6 ) in hepatocyte primary cultures. Eur. J. Biochem. **173** : 287 – 293 .
- 46.-Cerami, A., Beutler, B. 1988 . The role of cachectin / TNF in endotoxin shock and cachexia . Immunol. Today **9** : 28 .
- 47.-Wagge, A., Espevik, T. 1988 . Interleukin 1 potentiates the lethal effect of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  / Cachectin in mice . J. Exp. Med. **167**: 1987.
- 48.-Beutler, B., Milsark, I. W., Cerami, A. 1985 . Passive immunization against cachectin / tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin . Science **229** : 869 .

- 49.-Tracey, K. J., Fong, Y.,Hesse, D.G.,Monogue, K.R., Lee, A. T.,Kuo, G.C., Lowry, S.F.,Cerami, A. 1987 . Anti-cachectin / TNF Monoclonal Antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia . Nature 330 : 662.
- 50.-Hack, C.E., De Groot, E.R., Felt-Bersma, J.F., Nuijens, J.H., Strack Van Schijndel, R.J.M.,Eerenberg-Belmer, A.J.M.,Thijs,L.G., and Aarden, L.A.1989. Increased Plasma Levels of Interleukin - 6 in Sepsis . Blood . 74 : 1704 - 1710 .
- 51.-Fong,Y., Moldawer, L.L., Marano, M. et.al. 1989 . Endotoxemia Elicits Increased Circulating  $\beta_2$  - IFN / IL-6 in Man . The Journal of Immunology . 142 : 2321 - 2324.
- 52.- Jirik, F.R., Podor, T.J.,Hirano, T., Kishimoto,T., Loskutoff, D.J., Carson,D.A., and Lotz, M. 1989 Bacterial Lipopolisaccharide and Inflammatory Mediators Augment IL-6 Secretion by Human Endothelial Cells. The Journal of Immunology . 142 : 0144 - 0147 .
- 53.-Woloski, B.M.,Smith, E. M.,Meyer III, W.J., Fuller, G. M.,Blalock, J.E. 1985. Corticotropin - Releasing Activity of Monoquines . Science : 230 : 1035 - 1037.
- 54.-Failla, M.L. & Cousins , R.J. 1978 . Zinc Uptake by Isolated Rat Liver Parenchymal Cells. Biochem. Biophys. Acta 538 : 435 - 444 .
- 55.-. Failla, M.L. & Cousins , R.J 1978 . Zinc Accumulation and Metabolism in primary cultures of Adult 543Rat Liver Cells. Regulation by Glucocorticoides. Biochem. Biophys. Acta : 293 - 304 .
- 56.-Hammer, D.H. 1986 . Metallothionein. Ann. Rev. Biochem. 55 : 913 - 951.

- 57.-Schroeder, J. J., and Cousins , R.J. 1990 . Interleukin 6 Regulates Metallothionein Gene Expression and Zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. **87** : 3137 – 3141 .
- 58.-Old, L.J., 1985. Tumor Necrosis Factor ( TNF ). Science ( Wash. D.C. ) **230** : 630 – 632.
- 59.-Shalaby, M. R., Aggarwal, B.B., Rinderknecht, E., Svedersky, L.P., Finkle, B.S., and Palladino , M.A. 1985 . Activation of Human Polymorphonuclear neutrophil function by Interferon -  $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor . J. Immunol. **135** : 2069 – 2073.
- 60.-Darlington, G., Wilson, D. R., and Lachman, L. B. 1986 . Monocyte-conditioned Medium, Interleukin-1, and Tumor Necrosis Factor Stimulate the Acute Phase Response in Human Hepatoma Cells In Vitro. The Journal of Cell Biology. **103** : 787 – 793 .
- 61.-Perlmutter, D. H., Dinarello, C. A., Punsal, P.I., Colten, H. R. 1986 . Cachectin/Tumor Necrosis Factor Regulates Hepatic Acute- Phase Gene Expression. **78** : 1349 – 1354 .
- 62.-Bettger, W.J., and O' Dell, B.L. 1981 . A Critical Physiological Role of Zinc in The Structure and Function of Biomembranes. Life Sciences **28** : 1425 – 1438.
- 63.-Hesketh, J. E. 1983. Zinc Binding To Tubulin. Int. J. Biochem. **15** : 743 – 746.
- 64.-Fee, J.A. and Teitelbaum, H. D. 1972 . Evidence That Superoxide Dismutase Plays a Role In Protectong Red Blood Cells Against Peroxidative Hemolysis. Biochemical and Biophysical Research Communications. **49** : 1 : 150 - 157 .

- 65.-Karl, L., Chvapil, M. and Zukoski, C. F. 1973 . Effect of Zinc on the Viability and Phagocytic Capacity of Peritoneal Macrophages. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **142** : 1123 – 1127.
- 66.-Chvapil , M. 1973 . New Aspects In The Biological Role of Zinc : Stabilizer of Macromolecules and Biological Membranes. Life Sciences **13** : 1041 – 1049 .
- 67.-Chen, K. L., and Mc Cay P. B. 1972 . Lysosome Disruption By A Free Radical- Like Component Generated During Microsomal NADPH Oxidase Activity. **48** : 1412 – 1417 .
- 68.-Cheung, W. Y. Properties of Cyclic 3', 5'- Nucleotide Phosphodiesterase from Rat Brain: . **6 : 4** : 1079 - 1087 .
- 69.-Ignarro, L. J., Oronsky, A. L., Perper, R.J. 1973 . Effects Of Prostaglandins On Release Of Enzymes From Lysosomes Of Pancreas , Spleen and Kidney Cortex. Life Sciences . **12** : 1 : 193 - 201.
- 70.-Koshland De Jr. 1992 . The Molecule Of The Year [ editorial ] . Science **258** : 1861.
- 71.-Schoedon, G., Schneeman, M., Blau, W.N., Hofer, S., Schaffner, A. 1995 . Nitric Oxide and Infection : Another View. **21** ( Suppl. 2 ) : S152 - 7 .
- 72.-Nathan, C., 1992 . Nitric Oxide as a secretory Product of Mammalian Cells. Faseb J.. **6** : 3051 – 64 .
- 73.-Moncada, S., Higgs, A. 1993 . The L- Arginine – Nitric Oxide Pathway . N. Engl. J. Med . **329** : 2002 – 12 .
- 74.-Nathan, C.F., and Hibbs, J. B. Jr. 1991. Role of Nitric Oxide Synthesis in Macrophage Antimicrobial Activity. Current Opinion in Immunology . **3** : 65 – 70.

- 75.-Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z., 1987 . Macrophage Cytotoxicity : Role for L- Arginine Deiminase and Imino Nitrogen Oxidation to Nitrite. *Science* . 235 : 473 - 476.
- 76.- Dulbecco , R. and Freeman, G.1959 . Plaque Production by the Polyoma Virus . *Virology* . 8 : 396 ; 397.
- 77.-Morton, H.J., 1970 . A Survey of Commercially Available Tissue Culture Media . *In Vitro* . 6 : 89.
- 78.-Krezoski, K.S, Villalobos, J. C. Shaw, F.,Petering, D.H. 1988 . Kinetic Lability of Zinc bound to Metallothionein in Erlich cells. *Biochem. J.* 255 : 483 – 491.
- 79.-Microbiology, Immunology, & Parasitology , Laboratory Manual. Louisiana State University , Medical Center , New Orleans LA. USA. 1995.
- 80.-Gram, C. 1884 . Ueber die isolierte farbung der Schizomyceten in Schnitt und Trocken preparaten . *Fortschr Med* 2: 185
- 81.-Shaw , D.R. and Griffin, F.M.J.Jr. 1981. Antibody- dependent and Antibody-independent phagocytosis . In *Methods for studying mononuclear phagocytes* , eds. D.O. Adams, P.J. Edelson and H.Koresn, pp. 511- 528 . New York . Academic Press.
- 82.-Dignam, J.D., Lebovitz, R.M.,and Roeder, R.G. 1983 . Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Research* . 11 : 5 : 1475 – 1489.
- 83.-Manley, J.L.,Fire, A.,Cano, A., Sharp, P.A. and Gafter,M.L. 1980. DNA- dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell extract. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77 : 7 : 3855- 3859.

- 84.-**Bode, V.C.**, 1967. Single- strand Scissions induced in Circular and Linear  $\lambda$  DNA by The presence of Dithiothreitol and other reducing Agents. *J. Mol. Biol.* **26** : 125 – 129.
- 85.-**Bradford, M.M.** 1976 , A Rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the principle of Protein- Dye Binding . *Analytical Biochemistry* . **72** : 248 - 254.
- 86.-**Hendrickson, W.** 1985. Protein – DNA Interactions Studied by the Gel Electrophoresis-DNA Binding Assay . *Biotechniques*. **3** : 198 – 207.
- 87.-Gelshift™ Assay Kit . Instruction Manual . Catalog # 203001 ( Oligos A ) and # 203021 ( Oligos B ) STRATAGENE.
- 88.-**Fried, M. and Crothers, D.M.** 1981 . Equilibria and Kinetics of Lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*. **9** : 23 : 6505
- 89.-**Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of Structural Proteins during The assembly of the head of Bacteriophage T<sub>4</sub> . *Nature* . **227** : 680 –685.
- 90.-**Cech, C.L., and Mc Clure, W.R.** 1980. Characterization of Ribonucleic Acid Polymerase – T<sub>7</sub> Promoter Binary Complexes . *Biochemistry* . **19** : 2440 – 2447.
- 91.-**Garner, M.M., and Revzin, A.** 1981. A Gel electrophoresis Method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions : Application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system . *Nucleic Acids Research*. **9** : 13 : 3047 – 3059.

- 92.-Hirano and Kishimoto, "Handbook of Experimental Pharmacology-Peptide Growth Factors and Their Receptors", Vol. 95, M.B. Sporn and A.B. Roberts eds., Springer Berlin, 1990 pp. 633-65.
- 93.-Hirano, Interleukin – 6 in "The Cytokine Handbook", A. Thomson ed., Academic Press, San Diego, 1994, pp. 573 –81.
- 94.-Escobar,O.,Sandoval, M.,Vargas, A., and Hempe, J. M. 1995. Role of Metallothionein and Cysteine-Rich Intestinal Protein in the Regulation of Zinc Absorption by Diabetic Rats. *Pediatric Resarch.* 37 : 3 : 321-327.
- 95.-Gonick,P.,Oberleas,D.,Knechtges,T., and Prasad, A.S. 1969. Atomic Absorption Spectrophotometric determination of Zinc in The Prostate. *Investigative Urology.* 6 : 4 : 345 – 347.
- 96.-Castellani, A.G., and Niven, C. F. Jr. 1955. Factors affecting the Bacteriostatic Action of Sodium Nitrite. *Appl. Microbiol.* 3 : 154 – 159.
- 97.- Schneemann, M.,Schoedon, G.,Hofer, S.,Blau, N.,Guerrero, L., and Schaffner, A. 1993. Nitric Oxide Synthase Is Not a Constituent of the Antimicrobial Armature of Human Mononuclear Phagocytes. *The Journal of Infectious Diseases* 167 : 1358 - 63.
- 98 .- Sato , M., Bremner, I. 1993 . Oxygen free radicals and Metallothionein. *Free Rad. Biol. Med.* 14 : 325.
- 99.-Bray, T. M., and Bettger, W. 1990 . The Physiological Role of Zinc as an Antioxidant. *Free Rad. Biol. Med.* 8 : 281 - 291.
- 100.-Matthews, J. R., Wakasugi, N., Virelizier, J. L. Yodoi, J. and Hay , R. T. 1992 . Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF- $\kappa$ B by reduction of a

disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Research*, **20** : 15 : 3821 - 3830.

101.-Hayashi, T., Ueno, Y., and Okamoto, T. 1993 . Oxidoreductive Regulation of Nuclear Factor  $\kappa$ B. *The Journal of Biological Chemistry* . **268** : 15 : 11380 - 11388.

102.-Holmgren, A. 1989. Thioredoxin and Glutaredoxin Systems . *The Journal of Biological Chemistry* . **264** : 24 : 13963 - 13966.

103.-Blanar, M.,A., Burkly, L.C., and Flavell, R. 1989 . NF- $\kappa$ B Binds within a Region for Required for B- Cell- Specific Expression of the Major Histocompatibility Complex Class II Gene E $^d$ . *Molecular and Cellular Biology* . **9** : 2 : 844 - 846.

104.-Lenardo, M.,J., and Baltimore, D. 1989 . NF- $\alpha$ B : A Pleiotropic Mediator of Inducible and Tissue- Specific Gene Control. *Cell*, **58** : 227 - 229.

105.- Kuang, A., A., Novak,K.,D.,Kang,S.,Bruhn, K., and Lenardo, M.,L. 1993 . Interaction Between NF- $\kappa$ B and Serum Response Factor-Binding Elements Activates an Interleukin - 2 Receptor  $\alpha$  -Chain Enhancer Specifically in T Lymphocytes. *Molecular and Cellular Biology* **13** : 4 : 2536 - 2545.

106.-Kang, S.,Tran, A.C., Grilli, M., Lenardo, M., J. 1992 . NF- $\kappa$ B Subunit Regulation in Nontransformed CD4+ T Lymphocytes. *Science* **256** : 1452 - 1455.

107.-Libermann, T.,A., and Baltimore, D. 1990 . Activation of Interleukin - 6 Gene Expression Through the NF- $\kappa$ B Transcription Factor. *Molecular and Cellular Biology* **10** : 5 : 2327 - 2334.

108.-LeClair, K.,P., Blanar, M.,A., and Sharp, P.,A. 1992 . The p50 subunit of NF- $\kappa$ B associates with the NF- IL6 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89** : 8145 - 8149.



- 109.- **Sundstedt, A., Sigvardsson, M., Leanderson, T., Hedlund, G., Kalland, T., and Dohlsten, M.** 1996. In vivo anergized CD4<sup>+</sup> T cells express perturbed AP-1 and NF- $\kappa$ B transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93** : 979 - 984.
- 110.-**Yi, S., and Oberley, L.W.** 1996. Redox Regulation of Transcriptional Activators. *Free Radical Biology &* **21** : 3 : 335 - 348.
- 111.-**Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., and Yodoi, J.** 1997. AP- 1 Transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref - 1 . *Pro. Natl. Acad. Sci.* **94** : 3633 - 3638.
- 112.**Muegge, K. Williams, T.M., Kant, J., Karin, M., Chiu, R., Schmidt, A., Siebenlist, U., Young, H.A., Durum, S.K.** 1989. Interleukin-1 Costimulatory Activity on the Interleukin- 2 Promoter Via AP -1. *Science* **246** : 249 - 251.
- 113.-**Jain, J., McCaffrey, G., Valge-Archer, V.E., & Rao, A.** 1992. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* **356** : 801 - 804.
- 114.- **Shaw, J.P. Utz, P.J., Durand, D.B., Toole, J.J., Emmel, E.A., Crabtree, G.R.** 1988. Identification of a Putative Regulatory of Early T Cell Activation Genes. *Science* **241** : 202- 205.
- 115.-**Kang, S.M., Beverly, B., Tran, A.C., Brorson, K., Schwartz, R.H., Lenardo, M.J.** Transactivation by AP - 1 Is a Molecular Target of T Cell Clonal Anergy. *Science*, **257** : 1134 - 1138.
- 116.-**Mannel, D., N., Moore, R.N., and Mergenhagen, E.** 1980. Macrophages as a Source of Tumoricidal Activity ( Tumor- Necrotizing Factor ). *Infection and Immunity* **30** : 2 : 523 - 530.
- 117.-**Larrick, J.W., and Wright, S.,C.** 1990. Cytotoxic mechanism of Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  . *The FASEB Journal.* **4** : 3215 - 3223.

- 118.- **Beutler,B., and Cerami, A.** 1988 . The History, properties and Biological effects of cahectin . *Biochemistry* **27** : 7575 -7582.
- 119.-**Collart,M.A.,Bauerle,P., and Vassalli,P.** 1990. Regulation of Tumor Necrosis Factor Alpha Transcription in Macrophages : Involvement of Four  $\kappa$ B-Like and of Constitutive and Inducible Forms of NF- $\kappa$ B. *Molecular and Cellular Biology* **10** : 4 : 1498 - 1506.
- 120.- **Drouet,C.,Shakhov,A.N., and Jongeneel, C.V.** 1991. Enhancers and Transcription Factors Controlling The Inducibility of The Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Promoter In Primary Macrophages. *The Journal of Immunology* **147** : 5 : 1694 - 1700.
- 121.-**Hsu,H.,Xiong,J., and Goeddel,D.**1995. The TNF Receptor 1- Associated Protein TRADD Signals Cell Death and NF- $\kappa$ B Activation. *Cell* **81** : 495 - 504.
- 122.-**Brenner,D.A.,O'Hara,M.,Angel,P.,Chojkier,M., & Karin,M.** 1989. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor -  $\alpha$  . *Nature* : **337** : 661 - 663.
- 123.- **Lin, J.X., and Vilcek, J.** 1987. Tumor Necrosis Factor and Interleukin - 1 Cause a Rapid and Transient Stimulation of c-Fos and c-myc mRNA levels in Human Fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry.* **262** : 25 : 11908 - 11911.
- 124 - **Atkins, E.** 1960. Pathogenesis of Fever. *Physiol. Rev.* **60** : 580 .
- 125.-**Dinareello, CH. A.** 1984. Interleukin 1 . *Reviews of Infectious Diseases* **6** : 151 - 95.
- 126- **Le, J., and Vilcek, J.** 1987. Biology of Disease : Tumor Necrosis Factor and Tnterleukin 1 : Cytokines with Multiple Overlapping Biological Activities. *Laboratory Investigation* **56** : 3 : 234 - 248.

- 127.- **Dinarello,C.A.,Cannon,J.G., Wolff,S.M.,Bernheim,H.A.,Beutler,B.,Cerami,A., Figari, I.S.,Palladino,M.A.Jr.,O'Connor,J.V.** 1986. Tumor Necrosis actor ( Cachectin ) Is an Ebdogenous Pyrogen and Induces Production of Interleukin - 1 . J. Exp.Med.163 : 1433 .
- 128.-**Casey, M.L.,Cox, S.M.,Word, R.A.,Macdonald, P.C.** 1990. Cytokines and Infection - induced preterm labor. *Reprod. Fertil Dev* 2 : 499 - 509.
- 129.-**Zhang, Y.,Lin, J.X., and Vilcek, J.** 1988. Synthesis of Interleukin 6 ( Interferon -  $\beta$ 2 Cell Stimulatory Factor 2 ) in Human Fibroblasts Is Triggered by an Increase in Intracellular Cyclic AMP. *The Journal of Biological Chemistry* 263 : 13 : 6177 -6182.
- 130.-**Reisenberger,K.,Egarter,C.,Knofler,M.,Schiebel, H.G.,Hirschl,A.M., Heinze,G., and Husslein, P.** 1998. Cytoquine and Prostaglandin production by amnion cells in response to the addition of different bacteria . *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178 : 1 : 50 -53 .
- 131.-**Zhang, H.,Peterson, J.W.,Niesel, D.W., and Klimpel, G.R.** 1997 . Bacterial Lipoprotein and Lipopolysaccharide Act Synergistically to induce Lethal Shock and Proinflammatory Cytoquine Production. *The Journal of Immunology* 159 : 4868 -4878.
- 132.-**Matusaka, T.,Fujikawa, K.,Nishio, .,Mukaida,N.,Matsushima,K.,Kishimoto,T., and Akira, S.** 1993. Transcription factors NF- IL6 and NF- $\kappa$ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines , interleukin 6 and interleukin 8 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 10193 - 10197.
- 133.-**Shimizu, H.,Mitomo, K.,Watanabe, T.,Okamoto, S., and Yamamoto, K.I.** 1990. Involvement of a NF-  $\kappa$ B- Like Transcription Factor in the Activation of the Interleukin - 6 Gene by Inflammatory Lymphokines. *Molecular and Cellular Biology* 10 : 2 : 561 - 568.

- 172.-Akira, S.,Taga, T., and Kishimoto T. 1993. Interleukin - 6 in Biology and Medecine. *Advances in Immunology* 54 : 1 - 79.
- 134.- Akira, S.,Isshiki,H.,Sugita, T.,Tanabe, O.,Kinoshita, S.,Nishio, Y.,Nakajima, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. 1990. A nuclear factor for IL - 6 expression ( NF - IL6 ) is a member of a C/EBP family. *The EMBO Journal* 9 : 6 : 1897 - 1906.
- 135.-Akira,S.,Isshiki,H.,Sugita,T.,Tanabe,O.Kinoshita,S.,Nishio,Y.,Nakajima, T.,Hirano,T., and Kishimoto,T. 1990. A nuclear factor for IL- 6 expression ( NF-IL6 ) is a member os a C/EBP family. *The EMBO Journal* 9 : ( 6 ) : 1897 - 1906.
- 136.-Shalaby, M.R., Waage, A.,Aarden, L., Espevik, T. 1989. Endotoxin, Tumor Necrosis factor - alpha and interleukin - 1 induce interleukin - 6 production in-vivo. *Clin Immunol Immunopathol* 53 : 488 - 98.
- 137.-Stornes, H.F.Jr.,Pearce, M.K.,Tewari, A.,Yim, J.H.,Zou, J.C.,Abrams, J.S. 1990. Anti - IL-6 monoclonal antibodies protect against lethal *Escherichia coli* infection and lethal tumor necrosis factor alpha challenge in mice. *J Immunol* 145 : 4185 - 91.
- 138.-Malawista, S.S.,Montgomery, R.R., and Van Blaricom, G .1992. Evidence for Reactive Nitrogen Intermediates in killing of *Staphylococci* by Human Neutrophil Cytoplasts. *J. Clin. Invest.* 90 : 631 - 636.
- 139.-Kaplan, S.S.,Billiar, T.,Curran, R.D.,Zdziarski, U.E.,Simmons, R.L., and Basford, R.E. 1989. Inhibition of Chemotaxis With NG-Monomethyl-Arginine : A Role for Cyclic GMP. *Blood* : 74 : 1885 - 887.
- 140.-Denis, M. 1991. Human Monocytes-macrophages: No or no NO? *Journal of Leokocyte Biology* . 55 : 682 - 684.
- 141.- Marletta, M.A.,Yoon, P.S.,Iyengar, R.,Leaf, C.D., and Wishnok, J.S. 1988. Macrophage Oxidation of L-Arginine to Nitrite and Nitrate : Nitric Oxide Is an Intermediate. *Biochemistry* 27 : 8706- 8711.

- 142- **Cuajungco, M.P., Lees, G.J.** 1997. Zinc metabolism in the brain relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease*. **4** ( 3-4 ) : 137 - 69.
- 143.- **Persechini, A.,McMillan, K.,Masters, B.S.** 1995. Inhibition of nitric oxide synthase activity by Zn<sup>2+</sup> ion. *Biochemistry* **34** ( 46 ) : 15091 - 5.
- 144.- **Baldwin, A.S:** 1996. The NF-  $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins . *New discoveries and Insights* . *Annu. Rev. Immunol.* **14** : 649 - 81,
- 145.- **Qiao-wen,X.,Kashiwabara, Y., and Nathan, C.** 1994. Role of Transcription Factor NF-  $\kappa$ B/Rel in Induction of Nitric Oxide Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. **269** : 7 : 4705 - 4708.
- 146.- **Lowenstein, C.J.,Alley, E.,Raval, P.,Snyder, S.H.,Russel, S.W.,Murphy, W.** 1993.Nitric Oxide Synthase gene : two upstream regions mediate its induction by interferon - gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . **90** : 9730 -4.
- 147.- **Xie,Q. Whishant, R. Nathan, C.** 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium - independent nitric oxide confers inducibility by interferon - gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **177** : 1779 - 84.
- 148.- **Peunova, N., & Enikolopov, G.** 1993 . Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* **364** : 450 - 453.
- 149.- **Stamler, J. S.** 1994. Redox Signaling : Nitrosylation and Related Target Interactions of Nitric Oxide. *Cell* **78** : 931 -936.
- 150.- **Failla, M.L.,**Zinc : functions and transport in Microorganisms. In **E.D. Weinberg** [ Ed. ], *Microorganisms and Minerals* . **Marcel Dekker, Inc.** New York, 1977. P. 151 - 214.
- 151.- **Falchuk, K.H.,Fawcett, D.W.Valle, B.L.** 1975. Role of Zinc in cell division of *Euglena gracilis*. *J. Cell. Sci.* **17** : 57 - 78.

- 152.- **Hsu, J.M.** Biochemistry and Metabolism of Zinc. In Z.A. Karcioğlu and R.M. Sarper [ ed. ] Zinc and Cooper in Medicine. C.C. Thomas Springfield, 1980 , p 66-93.
- 153- **Feeney, R.E.,Lightbody, H.D.,Garibaldi, J.A.** Zinc as an essential element for growth and subtilin formation by *Bacillus subtilis*. Arch. Biochem. **15** : 13 - 17.
- 154.-**Lee, K.Y.,Weinberg, E.D.** 1971. Sporulation of *Bacillus megaterium* : roles of metal ions. Microbios **3** : 215 - 224.
- 155.-**Jensen, S.E.,Fecycz, I.T.,Campbell, J.N.** 1980. Nutritional factors controlling exocellular proteases prod. By *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **144** : 844-847.
- 156.- **Sugarman, B.,Epps, L.R.,Stenback, W.A.** 1982. Zinc and Bacterial Adherence. Infection and Immunity **37** : 3 : 1191 - 1199.
- 157.-**Tanaka, Y.,Shiozawa, S.,Morimoto, I., & Fujita, T.** 1990 . Role of Zinc in Interleukin 2 ( IL- 2 ) - Mediated T- Cell Activation. Scand. J. Immunol. **31** : 547 - 552 .
- 158.- **Abul, H.T.,Abul, A.T.,AL-Athary, E.A.,Behbehani, A.E.,Khadadah, M.E., and Dashti, H.M.** 1995 . Interleukin -1 $\alpha$  ( IL -1 $\alpha$  ) production by alveolar macrophages in patients with acute lung diseases : the influence of Zinc supplementation. Molecular and Cellular Biochemistry **146** : 139 - 145.
- 159.- **Driessen, C.,Hirv, K.,Rink, L., and Kirchner, H.** 1994. Induction of Cytoquines by Zinc Ions in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and separated monocytes. Lymphokine and Cytoquine Research **13** : 1 : 15 - 20.
- 160.- **Scuderi, P.** 1990 . Differential effects of Copper and Zinc on Human Peripheral Blood Monocyte Cytoquine Secretion. Cellular Immunology **126** : 391 - 405.

- 161.- Grummt, F.,Weinmann-Dorsch, C.,Schneider-Schaulies, J., and Lux, A. 1986 . Zinc as a Second Messenger of Mitogenic Induction. *Experimental Cell Research* **163** : 191 - 200.
- 162.- Csermely, P.,Somogyi, J. 1989 . Zinc as a Possible Mediator of Signal Transduction in T Lymphocytes. *Acta Physiologica Hungarica* **74** : 2 : 195 - 199.
- 163.- Philcox, J.C.,Coyle, P.,Michalska, A.,Choo, K.H.A., and Rofe, A.M. 1995. Endotoxin - Induced inflammation does not cause hepatic zinc accumulation in mice lacking metallothionein gene expression. *Biochem. J.* **308** : 543 - 546.
- 164.- Gaetke, L.M.,McClain, C.J.,Talwalkar, R.T., and Shedlofsky, S.I. 1997. Effects of endotoxin on zinc metabolism in human volunteers. *Am. Journal of Physiology* **272** : ( 6 pt 1 ) : E 952 - 6.
- 165.-Ghassemifar, M.R.,Olsson, M.G.,Agren, M.S., and Franzen, L.E. 1995. Impaired function of postoperative macrophage from zinc-deficient rats decreases collagen contraction . *Acta Pathologica Microbiology Immunology Science* **103** : 395 - 400.
- 166.-Sugarman, B. 1983 . Zinc and Infection . *Reviews of Infectious Diseases* **5** : 1 137 - 147.
- 167.-Stankova, L.,Drach, G.W.,Hicks, T., et al. 1976 . Regulation of some functions of granulocytes by zinc of the prostatic fluid and prostate tissue. *J. Lab. Clin. Med.* **88** : 4 : 640 - 8.
- 168.- Chvapil, M. 1976. Effect of Zinc on Cells and Biomembranes. *Medical Clinics of North America.* **60** : 4 : 799 - 814.
- 169.- Connell, P.,Young, V.M., Toborek, M., Cohen,D.A.,Barve, S.,Mc Clain,C.J., Facn, and Henning, B. 1997. Zinc attenuates Tumor Necrosis Factor- Mediated

Activation of Transcription Factors in Endothelial Cells. *Journal of the American College of Nutrition* . 16 : 5 : 411 - 417.

170 - **Kontgen, F., Grumont, R.J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlinton, D., and Gerondakis, S.** 1995 . Mice lacking the c-rel proto- oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin -2 expression. *Genes & Development* 9 : 1965 - 1977.

171 .-**Sha, W.C., Liou, H., Toumanen, E.I., and Baltimore, D.** 1995 . Targeted Disruption of the p50 Subunit of NF -  $\kappa$ B leads to multifocal Defects in Immune Responses. *Cell* 80 : 321 - 330.

172.- **Wellinghausen, N., Schromm, A.B., Seydel, U., Brandenburg, K., Luhm, J., Kirchner, H., and Rink, L.** 1996. Zinc Enhances Lipopolysaccharide-Induced Monokine Secretion by Alteration of Fluidity State of Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology* 167 : 3139 - 3145.

173.- **Falus, A., and Beres, J.Jr.** 1996 . A Trace Element Preparation Containing Zinc Increases the Production of Interleukin - 6 in Human Monocytes and Glial Cells. *Biological Trace Element Research* 51 : 293 - 301.

174.-**Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Passlick, B., Kafferlein, E., Coulie, P.G., and Izbicki, J.R.** 1992. Protection against Lethal Pneumococcal Septicemia in Pigs Is Associated with Decreased Levels of Interleukin - 6 in Blood. *Infection And Immunity* . 60 : 4 : 1692 - 1694.

175.- **Nakajima, Y., Mikami, O., Yoshioka, M., Motoi, Y.** 1997 . Elevated levels of tumor necrosis factor- $\gamma$  ( TNF -  $\gamma$  ) and interleukin 6 ( IL -6 ) activities in the sera and milk of cows with naturally occurring coliform mastitis. *Research in Veterinary Science* 62 : 297 - 298.



- 176.- **Borden, E.C., and Chin, P.** 1994 . Interleukin - 6 : A cytoquine with potential dianostic and therapeutic roles. *J Lab Clin Med* 123 : 6 : 824 - 829
- 177.- **Yoshida, Y.,Iwaki, Y.,Pham, E. et al.** 1993. Benefits of post- transplantation monitoring of Interleukin - 6 in Lung Transplantation. *Am. Thoracic Surg.* 55 : 89 - 93.
- 178.- **Duan, J.,Wang, J.,Cai, X.,Wang, L., Liu, H.,Zou, M.** 1997. Characterization of a Soluble IL- 6 Receptor  $\alpha$  Mutant C277D / H2801 Expressed in *E. coli*. *Biochemistry and Molecular Biology International.* 41 : 6 : 1101 - 1108.
- 179.- **Savino, R.,Lahm, A.,Salvati, A.L.,Ciapponi, L.,Sporeno, E.,Altamura, S.,Paonessa, G.,Toniatti, C., and Ciliberto, G.** 1994 . Generation of interleukin -6 receptor antagonists by molecular - modeling guided mutagenesis of residues important for gp 130 .*The EMBO Journal* 13 : 6 : 1357 - 1367 .
- 180.- **Taubeneck, M.W.,Daston, G.P.,Rogers, J.M.,Gershwin, M.E.,Ansari, A.,Keen, C.L.** Tumor Necrosis Factor -  $\alpha$  Alters Maternal and Zinc Metabolism and Is Developmentally Toxic in Mice. *J Nutr.* 125 : 908 - 919.
- 181.- **Kieran, M.,Blank, V.,Logeat, F.,Vandekerckhove, J.,Lottspeich, F.,Le Bail, O.,Urban, M.B.,Kourlisky, P.,Bauerle, P.A.** 1990 . The DNA binding Subunit of NF- $\kappa$ B Is Identical to factor KBF1 and Homologous to the Rel Oncogene product. *Cell* 62 : 1007- 1018.
- 182.- **Xu, Y.,Moore, D.H.,Broshears, J.,Liu, L.,Wilson, T.M., and Kelley, M.R.** 1997. The Apurinic / apyrimidinic Endonuclease ( APE -ref-1 ) DNA Repair Enzyme is Elevated in Premalignant and Malignant Cervical Cancer. *Anticancer Research* 17 : 3713 - 3720 .
- 183.- **Hezi, A.Y.,Plaskin, D., & Eisenbach, L.** 1994. C-fos and c-jun overexpression

in malignant cells reduces their tumorigenic and metastatic potential, and affects their MHC class 1 gene expression. *Oncogene* **9** : 4 : 1065 - 79.

184.- Plaskin, D., Bauerle, P., and Eisenbach, L. 1993 . KBF1 ( p50 NF - $\kappa$ B ) Acts as a Repressor of H- 2K Gene Expression in Metastatic Tumor Cells . *J Exp. Med.* **177** : 1651 - 1662.

185.- Braunschweig, C.L., Sowers, M., Kovacevich, D.S., Hill, G.M., and August, D.A. Parenteral zinc Supplementation in Adult humans during the Acute Phase Response Increases the Febrile Response. *J. Nutr.* **127**: 70 - 74 .

186.- Mossad, S.B., Macknin, M.L., Medendorp, S.V., Mason, P. 1996.-Zinc Gluconate Lozenges for Treating the Common Cold. *Annals of Internal Medicine* : **125** : 2 : 81 - 88.

