



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

EFFECTOS DEL ZINC COMO
INMUNOMODULADOR DE
LA RESPUESTA HUMORAL

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

VICTOR DANIEL ORIHUELA LUNA



México, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Prof: Magdalena Oliva González
Vocal: Prof: Ma. Dolores Lastra Azpilicueta
Secretario: Prof: Rodolfo Pastelin Palacios
1er. Suplente: Prof: Ana Esther Aguilar Cárdenas
2do. Suplente: Prof: Jesús Guzmán García

Sitio donde se desarrollo el tema: Laboratorio de investigación en
Inmunología
Departamento de Biología
Facultad de Química
UNAM.

Asesor del tema:

M.en C. Ma. Dolores Lastra Azpilicueta

Ma. Dolores Lastra

Supervisor Técnico:

Q.F.B. Ana Esther Aguilar Cárdenas

Ana Esther

Sustentante:

Víctor Daniel Orihuela Luna

Víctor Daniel Orihuela Luna

**A mis padres
Guadalupe y Daniel
por su apoyo, confianza
y amor.**

Mil Gracias.

A mis hermanas

María Susana y fam.

Marcela Patricia y fam.

Adriana Rebeca

Sandra Leticia y fam.

Claudia Velia

porque han creído en mí.

Mil Gracias.

A Norma Angélica
por su gran ayuda
y cariño.

Gracias.

A los profesores

Ma. Dolores Lastra Azpilicueta

Rodolfo Pastelín Palacios

Ana Esther Aguilar Cárdenas

**por su valiosa ayuda para la
realización de este trabajo.**

**A todas aquellas personas
que me han acompañado a lo
largo de este camino.**

No os dejéis corromper por un escepticismo estéril y deprimente; no os desalentéis ante la tristeza de ciertas horas que pasan sobre las naciones. Vivid en la serena paz de los laboratorios y de las bibliotecas. Preguntaos primero: ¿Qué he hecho por instruirme? Y después, a medida que vayáis progresando: ¿Qué he hecho por mi patria? Hasta que llegue el día en que podáis tener la íntima satisfacción de pensar en que habéis contribuido de alguna manera al progreso y al bienestar de la Humanidad.

INDICE

1.- Introducción.	1
2.- Antecedentes.	3
2.1. Oligoelementos.	3
2.2. Oligoelementos y la respuesta inmune.	5
2.3. Zinc.	6
2.4. Zinc en el período de gestación.	10
2.5. Zinc en el período de lactancia.	14
2.6. Zinc en el período de postdestete.	16
2.7. Zinc en la senectud.	19
2.8. Toxicidad del zinc.	20
2.9. Zinc y la respuesta inmune.	22
2.9.1. Zinc y la respuesta inmune celular.	22
2.9.2. Zinc y la respuesta inmune humoral.	26
3.- Objetivo.	28
4.- Material y métodos.	29
5.- Resultados.	34
6.- Discusión.	40
7.- Conclusiones.	45
8.- Bibliografía.	46

1. INTRODUCCION.

Los elementos que se encuentran en los sistemas biológicos de los seres vivos en muy pequeñas cantidades y se conocen como elementos traza y ultratraza realizan funciones metabólicas muy importantes. Existe un creciente interés en el estudio del papel que juegan estos elementos, motivado por la preocupación de conocer sus funciones en el organismo y en el sistema inmunitario. Además, los efectos de los elementos en la respuesta inmunitaria deben ser tomados en cuenta ya que un exceso ó una disminución en la ingesta, de estos micronutrientes puede provocar diversos estados patológicos y también sería factible dar pautas para una posible regulación de la inmunidad y ayudar a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares de la respuesta inmunitaria.

Un elemento esencial puede definirse, como aquel que resulta necesario para mantener la vida de un organismo y cuya falta puede ocasionar la muerte ó un mal funcionamiento del mismo. Un elemento traza esencial se requiere en concentraciones del orden de miligramos ó menores.

Entre los elementos traza esenciales podemos citar los siguientes: manganeso, zinc, níquel, hierro, cobre entre otros; los cuales resultan importantes para el metabolismo de las células debido a que funcionan principalmente como cofactores de numerosas enzimas.

El zinc en particular, juega un papel primordial en una gran variedad de sistemas metabólicos. Es importante para el funcionamiento de la respuesta inmunitaria, ya que la deficiencia de zinc está particularmente asociada con diversos trastornos como son: involución tímica, abatimiento de las células citotóxicas, deterioro en las funciones de macrófagos y disminución en la respuesta humoral primaria y secundaria. Además la deficiencia de zinc en la dieta favorece el desarrollo de una gran variedad de enfermedades incluyendo infecciones, neoplasias y autoinmunidad.

Se ha observado que durante las diferentes etapas de desarrollo, como son la gestación, la lactancia y el postdestete, se presentan inmunodeficiencias fisiológicas transitorias, en donde se han observado niveles bajos de zinc, por lo que se propone que este elemento como inmunomodulador, podría reforzar el sistema inmunológico en esos períodos.

2. ANTECEDENTES.

2.1. OLIGOELEMENTOS.

Existen numerosos elementos que se encuentran en los seres vivos en muy pequeñas cantidades y se conocen como elementos traza y oligoelementos (1). Los avances en la bioquímica, la biología molecular, los métodos analíticos y la inmunología, han enriquecido el campo en la investigación de los mismos, de tal forma, que actualmente se les reconocen funciones metabólicas muy importantes (2). También en la actualidad, se reconoce que las deficiencias subclínicas de varios de estos elementos son frecuentes y varían en diferentes poblaciones y edades (1).

Se acepta que el hombre contiene en su composición corporal cerca de 40 a 50 elementos traza. De ellos, al menos 30 se consideran esenciales. Un elemento se considera esencial, desde el punto de vista nutricional, cuando una especie animal privada de él, desarrolla manifestaciones clínicas y bioquímicas reproducibles. Estas pueden ser prevenidas ó revertidas con la administración de pequeñas cantidades fisiológicas ó suplementarias de tales elementos (3). Hasta 1970, al menos nueve elementos traza eran considerados esenciales para el ser humano. Estos son: hierro, zinc, manganeso, cobalto, cromo, molibdeno, selenio y yodo. En el hombre se han descrito síndromes de deficiencia para la mayoría de ellos.

Hasta el momento, seis elementos más han sido aceptados como esenciales en otros mamíferos; ellos son: flúor, vanadio, estaño, silicio, níquel y arsénico, se les conoce como ultramicroelementos de transición, pero con excepción del conocimiento del papel que desempeña el flúor en la salud dental, hasta ahora todavía no hay evidencias directas que demuestren ser necesarios en el hombre (1).

Actualmente, la información de que se dispone para estimar los requerimientos de la mayor parte de los oligoelementos, es insuficiente, se sabe que los elementos aniónicos se absorben eficientemente, en tanto que los catiónicos, se absorben relativamente mal. La disponibilidad de los oligoelementos es afectada por interacciones con otros factores de la dieta, por ejemplo, la del zinc con el fitato (3).

Tanto en el caso de los elementos aniónicos como de los catiónicos, el organismo responde a niveles excesivos de ingesta, aumentando la excreción y, en algunos casos, disminuyendo la absorción intestinal con el fin de tener un control homeostático y evitar efectos tóxicos (1).

2.2. OLIGOELEMENTOS Y LA RESPUESTA INMUNE.

Varios oligoelementos juegan papeles importantes en funciones metabólicas y celulares, lo que sugiere que pueden influenciar la respuesta inmune, y por lo tanto alterar la susceptibilidad a infecciones y otras enfermedades. En general, las deficiencias de elementos traza deprimen la respuesta inmune, tanto celular como humoral y aumentan el riesgo de infecciones graves (4). Para cada uno de ellos hay tanto un límite inferior como superior para que su función fisiológica sea óptima. De manera que las pruebas de función inmunitaria pueden servir para calibrar los requerimientos fisiológicos de cada uno de estos elementos (2).

Al respecto, existen evidencias clínicas experimentales, que tanto la deficiencia como el exceso de hierro, producen mayor susceptibilidad a las infecciones. La deficiencia de hierro deprime la inmunidad celular y la función de los neutrófilos (4,5).

La deficiencia de zinc, causa atrofia reversible de los tejidos linfáticos, especialmente del timo. Esto se refleja en la disminución del número de linfocitos T y B. La reacción de hipersensibilidad tardía disminuye (2,4). Se ha encontrado deterioro en las funciones de los macrófagos y disminución en la respuesta humoral primaria (6) y secundaria (7,8). Así mismo, se ha asociado una variedad de enfermedades incluyendo infecciones (9), neoplasias y enfermedades autoinmunes (10).

En estudios hechos en niños con acrodermatitis enteropática, una enfermedad en que se presenta grave deficiencia de zinc, se han demostrado alteraciones en la respuesta inmune principalmente relacionadas con la deficiencia de linfocitos T y B y la función de los neutrófilos (2). Estos cambios mejoran rápidamente al administrar suplementos de zinc (1,2).

La deficiencia de oligoelementos como el cobre se ha relacionado con la disminución de la actividad bactericida de los neutrófilos; la de selenio con la depresión de la respuesta inmune humoral y disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa de células fagocíticas; la de yodo con depresión de la función de linfocitos y neutrófilos y otros elementos como cobalto, cadmio y arsénico han demostrado causar alteraciones inmunológicas en experimentos de laboratorio pero no "in vivo" (1,2).

2.3. ZINC.

El zinc se considera como un oligoelemento esencial, involucrado en la síntesis proteica y en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Es necesario, por lo tanto, para el crecimiento y desarrollo normales, para la síntesis de DNA, RNA polimerasa, transcriptasa reversa y nucleósido fosforilasa (2). También para las funciones neurosensoriales y la respuesta inmune (11). Los mecanismos bioquímicos por los cuales este metal ejerce su efecto aún se desconocen (1,2).

El zinc, es componente de una gran variedad de proteínas, de las cuales algunas son enzimas humanas; ejemplos principales son: fosfatasa alcalina, carboxipeptidasa, anhidrasa carbónica, procarboxipeptidasa, deshidrogenasa alcohólica, superóxido dismutasa (2). También juega un papel importante en el metabolismo de la vitamina A. La retinoreductasa es una metaloenzima del zinc que interviene en el ciclo de la rodopsina en la retina. La administración de zinc puede aumentar el nivel de retinol en el plasma (12).

El zinc tiene también interacciones con diferentes hormonas (2). Forma complejos con la insulina e interviene en su almacenamiento, liberación y acción. En ratas deficientes de zinc se han observado alteraciones en la tolerancia a la glucosa (13). En humanos, ésto no se ha logrado demostrar plenamente. Lo que sí se sabe en humanos, es que existen otras influencias hormonales en el "status" del zinc (14). Tanto glucocorticoides, como los estrógenos alteran la distribución tisular del zinc (15). Los glucocorticoides aumentan la captación hepática del zinc, mientras que la administración de estrógenos sintéticos a ratas, disminuyen los niveles plasmáticos de zinc y aumentan la concentración en hígado, eritrocitos, útero y riñon (14).

También se ha visto que la administración de este metal en bajas concentraciones incrementa la actividad de la enzima convertidora de angiotensina encontrándose que es una enzima dependiente de zinc (16).

Las reservas de zinc en el organismo están en un equilibrio muy precario. La falta de zinc en la dieta ocasiona una rápida disminución en su nivel plasmático (17). Del zinc ingerido, sólo un 30 a 40% es absorbido. Dicha absorción depende de la fuente de origen.

El zinc que proviene de alimentos de origen animal es mejor absorbido que el de origen vegetal, esto se debe a que los fitatos y la fibra que contienen los vegetales se unen al zinc en la luz intestinal disminuyendo su absorción (18).

Cuando se absorbe en la célula más zinc del necesario, se sintetizan metalotioneínas y éstas se ligan al zinc residual. Con la descamación celular el zinc retorna al contenido intestinal. El intestino parece ser su principal ruta de excreción, con cantidades significativas presentes en secreciones pancreáticas.

Una vez absorbido el zinc plasmático, se liga a la albúmina, transferrina y macroglobulina. Se requiere zinc para el crecimiento celular y se encuentra en las concentraciones más altas en los espermatozoides, coroides de los ojos, cabello, uñas, huesos, glándula prostática, hígado, riñones, músculos y piel. Todos estos órganos resultan, por consiguiente, afectados por la deficiencia de zinc (1,2).

Durante la última década el zinc como nutrimento, ha sido objeto de considerable interés, por sus propiedades como inmunomodulador (9). Así pues, actualmente la inmunomodulación del zinc está siendo estudiada en forma activa y se ha propuesto como parte del tratamiento en diversas inmunodeficiencias (11).

El zinc modifica y estabiliza las membranas celulares, tal vez interactuando con los grupos fosfato de los fosfolípidos. También puede inhibir algunas funciones inducidas por la calmodulina, la cual interviene en procesos regulados por el calcio. Algunos estudios sugieren que al igual que el calcio el zinc participa en la distribución celular y en la activación de las proteínas cinasas, aunque através de distintos mecanismos. La influencia del zinc sobre estas enzimas, se ha visto que afecta la expresión del receptor para eritrocitos de ratón presente en algunos linfocitos B humanos (19).

Debido a que no todas las manifestaciones clínicas ocasionadas por la falta de zinc pueden explicarse por la alteración y falta de una ó la combinación de varias enzimas, se ha propuesto que deben existir interacciones probablemente entre el zinc y el genoma que expliquen las manifestaciones clínicas de la deficiencia del metal. Dichas interacciones se llevan a cabo, por medio de factores de transcripción denominados dedos del zinc (zinc fingers). Estas son proteínas constituidas por repeticiones de 30 aminoácidos que interactúan con el DNA en una secuencia de pares de bases específicas para el inicio de la síntesis de una proteína (20).

2.4. ZINC EN EL PERIODO DE GESTACION.

Se ha demostrado en modelos animales que la deficiencia de zinc tiene repercusiones importantes sobre la reproducción. En dichos modelos por ser experimentales, el grado de carencia del elemento es mucho mayor que el que se observa en animales en gestación (21). En el embarazo normal, el zinc plasmático desciende probablemente debido a efectos endócrinos y a la expansión del volumen circulante. En realidad, la cantidad total de zinc en el compartimiento plasmático permanece constante ó incluso puede aumentar. Se ha observado, también, disminución del contenido de zinc de los leucocitos, pero esto parece reflejar sólo cambios en las proporciones de los subgrupos de estas células durante el embarazo, más que deficiencia "per se" (1).

Los embarazos anormales y trastornos del crecimiento fetal, pueden ocasionar cambios del zinc plasmático y leucocitario, dando lugar a una impresión falsa de que la causa del problema es la deficiencia de zinc. Sin embargo, parece ser que la combinación de niveles séricos bajos de zinc y aumento en niveles de cobre es una característica de respuesta sistémica a una gran variedad de situaciones de stress y no precisamente a deficiencia de zinc en el período de gestación (22).

La evidencia más clara de la existencia de deficiencia de zinc durante la gestación la ha proporcionado la respuesta a la suplementación. Pero en estudios relacionados, sólo raramente se han controlado otros factores que pueden influir sobre el resultado del embarazo. Sin embargo, un estudio de las etapas finales de la gestación demostró un menor número de nacimientos con bajo peso y de alteraciones del parto, mientras que en otros se observó una disminución de la incidencia de toxemia en madres adolescentes al administrar zinc (1). Se han hecho estudios incluso, para evaluar manifestaciones conductuales, y se ha implicado en la depresión postparto. No obstante, en humanos se requieren más estudios que permitan identificar los subgrupos de madres embarazadas que podrían beneficiarse con la administración de suplementos de zinc (23).

En animales de experimentación, en particular en monos Rhesus, se han evaluado los efectos a largo plazo de la privación de zinc durante el embarazo, y se ha encontrado, que las primeras manifestaciones de deficiencia son en la respuesta inmune más que en los niveles séricos y que en otras funciones del zinc. En dicho estudio, se encontró que tras una dieta baja en zinc por un año (10 ppm), los niveles séricos de IgM, IgG y funciones de quimiotaxis de los neutrófilos estaban disminuídas (21).

En ratones adultos, se ha evaluado la deficiencia de zinc en relación a niveles de metalotioneína. Las metalotioneínas son proteínas inducibles por el zinc y en general se les considera como sustancias inmunomoduladoras. En este estudio, se encontró que los ratones privados de zinc durante el período gestacional, tuvieron disminución en la síntesis y aumento en la degradación de las metalotioneínas (24).

Uriu-Hare y cols., demostraron disminución en el transporte transplacentario de zinc durante la gestación, así como alteración de las proteínas transportadoras de zinc en el feto (25).

Una revisión de la literatura sugiere, que el estado nutricional materno puede ser un importante modulador en el desarrollo de toxicidad (teratogénesis) de una gran variedad de agentes del medio ambiente. Existe evidencia de que el metabolismo del zinc puede ser afectado por estos agentes y como manifestación de embriotoxicidad puede haber reducción en la captación de zinc en el feto, desarrollando consecuentemente un crecimiento anormal (26).

En otros estudios experimentales se ha demostrado que la composición de los tejidos es diferente cuando la dieta es restringida en zinc durante el período gestacional. Los recién nacidos muestran significativa reducción en la concentración de zinc en diferentes tejidos principalmente hígado y hueso, con una compensación de aumento de cobre en los mismos (1,26).

2.5. ZINC EN EL PERIODO DE LACTANCIA.

En estudios hechos con ratas sometidas a privación de zinc durante la gestación y la lactancia se ha comprobado que éstas incrementan la absorción y disminuyen la excreción del mismo, además de que aumentan los niveles de zinc en el calostro tratando de compensar la deficiencia preestablecida (27). Normalmente, durante este período los requerimientos de zinc aumentan, por lo tanto, los efectos de una privación controlada del elemento son graves, y han sido demostrados en estudios experimentales. De tal forma, que se ha comprobado que las consecuencias inmunológicas de la deficiencia de zinc durante la gestación y lactancia persisten a pesar de la suplementación y continúan hasta por tres generaciones (7,28).

Se ha visto que la deficiencia de zinc durante la lactancia, no obstante, no afecta la producción de leche ni la composición de sus nutrientes, lo cual demuestra nuevamente que los efectos de la deprivación de zinc se deben precisamente y únicamente a este elemento y no a las deficiencias mixtas (1). Las concentraciones de zinc en la leche materna varían importantemente de acuerdo a las especies estudiadas, por ejemplo; la leche humana contiene aproximadamente 1.5 microgramos de zinc por mililitro; en cambio, la leche de vaca contiene tres veces más.

Es una constante, que en las diferentes especies de mamíferos estudiados, las concentraciones del elemento van disminuyendo a lo largo del período de lactancia, de tal forma, que las concentraciones más altas se encuentran en el calostro (29).

Además de que varían las concentraciones de zinc en las diferentes especies animales, también se ha observado que en ellos, el zinc básicamente está unido a proteínas del suero, aunque no se ha logrado esclarecer el significado de estas diferencias (1).

Específicamente se ha demostrado que la deficiencia de zinc durante la gestación y lactancia, tiene efectos en la respuesta inmune humoral tanto primaria como secundaria, y en algunos estudios con la demostración de ausencia de niveles detectables de IgM, IgG2 e IgA (30). En otros estudios después de una inmunización con eritrocitos de carnero el número de células formadoras de anticuerpos en el bazo y la hemolisina sérica están marcadamente disminuídas. Este efecto, es más pronunciado en la respuesta inmune primaria, y en las células formadoras de anticuerpos IgG (31).

2.6. ZINC EN EL PERIODO DE POSTDESTETE.

El período postdestete, es decir, cuando termina la lactancia materna, es crítico para todos los mamíferos (2). En referencia al zinc, se sabe que su concentración disminuye en la leche materna a medida que avanza la lactancia por lo tanto, cuando llega el destete, el producto ha estado recibiendo cantidades de zinc menores a los requerimientos normales (32).

En esta etapa, se han realizado varios estudios aleatorios, controlados, en preescolares de nivel socioeconómico bajo de los Estados Unidos y Canadá, aunque realizados en pequeña escala, han producido claras evidencias de que la deficiencia leve de zinc en la niñez puede limitar el crecimiento. Aun cuando la principal secuela clínica a esta edad, es el retardo en el crecimiento, otros estudios clínicos han demostrado que también pueden producirse alteraciones del gusto y sobretodo deficiencias inmunológicas con la consecuente susceptibilidad a infecciones. En la actualidad se está investigando, el efecto de la deficiencia de zinc sobre el crecimiento del cerebro (1).

En algunos niños que viven en su hogar parece haber un grado leve de deficiencia de zinc sin que haya evidencias de otras deficiencias nutricionales, excepto niveles bajos de ingesta de alimentos energéticos. La deficiencia leve es más frecuente en varones que en mujeres. También hay evidencias que indican que la desnutrición proteico-energética puede complicarse con deficiencia de zinc, especialmente en Jamaica y Chile. Niveles bajos de ingesta pueden producir deficiencia en adolescentes del Medio Oriente (1,2).

Los adultos son capaces de adaptarse a márgenes muy amplios de ingestas de zinc. Entonces surge la interrogante de porque ocurren estos estados de deficiencia leve de zinc. Para lo cual, hay que tener en cuenta varios aspectos: a) no se ha determinado si la capacidad de lactantes y niños de adaptarse a ingestas bajas es comparable a la de adultos; si fuera así, parecería probable que la adaptación incluiría una menor velocidad de crecimiento que disminuiría los requerimientos y b) no está claro, ni siquiera en adultos, hasta que punto dicha adaptación es capaz de sobrepasar los efectos de componentes de la dieta que tienden a inhibir la absorción del zinc, ya que las interacciones en la dieta pueden ser importantes en la disminución de la disponibilidad del zinc (2).

Otro reto en el período postdestete, es que hay ingesta de otros oligoelementos que vienen en las leches industrializadas y es probable que la similitud en las propiedades físico-químicas de varios de estos elementos hace surgir la posibilidad de que compitan entre ellos por lugares ó mecanismos de absorción (33,34).

2.7. ZINC EN LA SENECTUD.

Curiosamente existen muchas similitudes entre niños y los ancianos en cuanto a su susceptibilidad a enfermedades e infecciones. El patrón de enfermedades que se presentan en la senectud, sugiere que en edad avanzada disminuye la respuesta inmune (35). El número de células pluripotenciales capaces de habilitarse para colonizar los órganos linfoides y madurar como células inmunocompetentes disminuyen con la edad. Algunos estudios han demostrado disminución en la frecuencia y magnitud de la respuesta cutánea de hipersensibilidad tardía a antígenos derivados de bacterias u hongos. La linfopenia y la anergia que se presentan en esta etapa de la vida, son importantes factores pronósticos. El número de linfocitos T circulantes están disminuidos con subpoblaciones de CD4 disminuidos y de CD8 normales. Las alteraciones funcionales asociadas con esta disminución de proliferación de linfocitos incluyen disminución en la respuesta a mitógenos y antígenos. De ahí que en estudios hechos por Beach y cols., se ha relacionado la deficiencia de zinc con la oncogénesis (36).

En cuanto a inmunidad humoral se ha observado que en la senectud hay disminución en los niveles de IgG y aumento en la IgA séricas. La respuesta proliferativa de células B en relación a un lipopolisacárido bacteriano también está disminuida (35). En el caso de este grupo de población, las alteraciones en la respuesta inmune son multifactoriales, pero se considera que los factores más importantes son la dieta, la nutrición y el ambiente (37).

2.8. TOXICIDAD DEL ZINC.

Se sabe en la actualidad que niveles de ingesta que son sólo cinco veces mayores que la ingesta diaria promedio pueden producir evidencias bioquímicas de toxicidad, tales como deficiencias de cobre. Por lo tanto, cualquier medida para prevenir la deficiencia de zinc debe ser puesta en práctica con precaución usando la cantidad mínima efectiva de este elemento (38).

Hasta el momento se ha prestado poca atención hacia las propiedades tóxicas del metal fuera de considerarlo como un riesgo industrial por la inhalación de las emanaciones tóxicas ó como consecuencia de contaminación grave de un medio localizado. El zinc ha sido considerado como un suplemento no tóxico, particularmente, cuando se ingiere por vía oral. Sin embargo, se pueden presentar algunos síntomas como : náusea, vómito, letargia, fatiga y deficiencia consecutiva de cobre ya mencionada, lo cual provocaría alteraciones en la función inmunológica y efectos adversos en la relación LDL:HDL (38).

Se han realizado estudios tanto en humanos como en animales de los efectos de la administración de altas dosis de zinc. En uno realizado por Chandra en adultos sanos (39), se demostró que al administrar una dosis de 150 mg de zinc dos veces al día, había un ligero aumento en la respuesta a mitógenos y alteraciones en el perfil de lípidos.

En modelos murinos, la exposición a una ingesta excesiva de zinc durante la gestación, lactancia y destete ocasionó una disminución en el número de células formadoras de anticuerpos, sin alterar el porcentaje de células B ni la respuesta a mitógenos. Se provocó también deficiencia secundaria de otros elementos, principalmente cobre (40).

En otro estudio la administración de cantidades elevadas de zinc (5000 ppm) en la dieta de ratones, provocó una reducción significativa en la respuesta citotóxica en contra de las células tumorales (39). La ingestión de zinc puede causar pocas manifestaciones de toxicidad, sin embargo, es necesario tener presente que la administración de suplementos de zinc puede interferir con la utilización del cobre y afectar la respuesta inmune (38).

2.9. ZINC Y LA RESPUESTA INMUNE.

Existen evidencias claras de que el zinc tiene gran influencia en la respuesta inmune (7,11,27,28,39). El papel inmunomodulador del zinc se hace más evidente cuando hay deficiencia y dado que el elemento se obtiene fundamentalmente de la dieta, las manifestaciones se presentan cuando hay desnutrición (1,2,4,11,39), principalmente proteico-energética (1). En estos casos se sabe que la deficiencia de zinc causa atrofia reversible de los tejidos linfáticos especialmente el timo, esto se refleja en la disminución del número de linfocitos T y B (11).

La inmunoesencialidad es un aspecto del zinc, que ha sido investigado en la última década, y ha sido demostrada en muy diversos aspectos de la respuesta inmune, además, dado que el zinc tiene propiedades inmunomoduladoras, tanto el déficit como el exceso puede ser perjudicial para el sistema inmunitario (38).

2.9.1. ZINC Y RESPUESTA INMUNE CELULAR.

La respuesta inmune celular es de importancia en la defensa contra virus, bacterias, protozoarios y células tumorales (41). Existe claramente una inhibición de la respuesta inmune celular durante la deficiencia de zinc.

Algunos estudios reportan efectos como los siguientes: linfocitopenia e infecciones recurrentes en humanos, disminución en el número de células de bazo, menor crecimiento del bazo y del timo en ratones y reducción en la cuenta de leucocitos en ratones deficientes durante el período postnatal, se ha reportado linfopenia con un aumento en la proporción de células T supresoras, disminución en la proporción de células T cooperadoras e inhibición de la respuesta a la sensibilización cutánea en ratones y humanos (42,43).

Estudios recientes han comprobado el efecto de la privación de zinc en la respuesta inmune celular. En ratas Wistar, la falta de zinc en la dieta ocasiona atrofia del timo y leucopenia, con disminución en el número de linfocitos circulantes (44). En cobayos privados de zinc se ha demostrado que hay disminución en la hipersensibilidad tardía a eritrocitos de carnero y disminución en la respuesta inflamatoria (45).

La deficiencia de zinc afecta también la citotoxicidad mediada por células, en algunos experimentos con ratones Balb, sometidos a una dieta baja en zinc, se ha demostrado acumulación en la respuesta citotóxica a la inoculación de células tumorales e inhibición directa del crecimiento tumoral, esto en relación a que se produce un daño en la respuesta a mitógenos, factores de regulación y linfocinas en el suero (46), esto debido a que el zinc es un cofactor esencial de la hormona tímica (47).

Muchas de las alteraciones comprobadas ó inducidas en animales de experimentación, se han observado en una variedad de situaciones clínicas en humanos con deficiencia de zinc (48), como por ejemplo en pacientes con anemia falciforme (deficientes de zinc), la actividad NK de las células mononucleares de sangre periférica está disminuída (49).

La respuesta proliferativa de linfocitos también se vé afectada en la deficiencia de zinc. En monos Rhesus que han estado privados de zinc desde la gestación hasta el año de edad, los linfocitos de sangre periférica, muestran una depresión notoria en su respuesta proliferativa a ConA y PHA, y en la actividad de fosfatasa alcalina (50). La administración oral crónica de zinc a ratas (20mg de zinc por mg de peso corporal por día, durante 7 semanas), dá lugar a un aumento significativo en la respuesta a las células de bazo a ConA y PHA (39).

Se ha observado una baja respuesta proliferativa a mitógenos en linfocitos de pacientes con acrodermatitis enteropática y en pacientes con alimentación parenteral deficientes de zinc (51). La ausencia de zinc en el medio de cultivo durante la inducción de la proliferación, dá lugar a una inhibición notable de la respuesta al adicionar EDTA a un cultivo de esplenocitos de ratón (0.001 a 0.1 mM), además se observa una disminución en la respuesta proliferativa a ConA y PHA, con una recuperación de dicha respuesta al reconstituir el zinc del medio (44).

Otras evidencias del papel del zinc en la mitogénesis, se han observado al cultivar células de bazo de ratas deficientes en zinc ó de ratas control en presencia de suero normal. En este caso la respuesta a ConA es igual para ambos grupos, en cambio al cultivar las células de ratas deficientes ó control en un medio de suero deficiente en zinc, la respuesta a ConA se vé reducida (43).

Con estos estudios, se demuestra que la falta de zinc afecta al proceso de estimulación por mitógenos (52). La anergia es la manifestación más contundente de la deficiencia de zinc (44).

2.9.2. ZINC Y LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL.

La deficiencia de zinc afecta de manera importante la respuesta secundaria de anticuerpos (respuesta de memoria) (53). La privación de zinc provocada en ratones en el período entre el primer y segundo retos con eritrocitos de carnero, dá lugar a una inhibición en la formación de anticuerpos, asociada, a una disminución en el número de células de memoria en el bazo (54). Este efecto no puede ser completamente revertido con la suplementación del zinc en la dieta (7).

En estudios realizados en ratones NZB; se ha demostrado que una deficiencia inducida de zinc provoca una menor frecuencia de anticuerpos antieritrocitos, si se establece antes de la aparición de signos de enfermedad hemolítica autoinmune y en los casos en que se presenta la autoinmunidad, se observa una disminución en los títulos de anticuerpos antieritrocitos de tipo IgA, IgM, IgG1, IgG2b (36). No obstante, una vez que se han producido ya los anticuerpos, la deficiencia inducida de zinc ya no es capaz de disminuir los títulos de estos, esto hace suponer que el papel del zinc es crucial en los eventos iniciales del establecimiento de la respuesta inmune humoral (55). Esto se ha probado en pacientes con enfermedades autoinmunes establecidas; donde los suplementos de zinc no han mostrado ser una adecuada alternativa terapéutica (56).

En animales privados de zinc, se ha reportado una disminución en el número de células de bazo productoras de anticuerpos frente a antígenos dependientes de células T (eritrocitos de carnero) y antígenos T independientes (dextrán) (57).

También en monos Rhesus privados de zinc durante la gestación se han encontrado niveles de IgM disminuídos (58). Además en algunos otros estudios hay evidencias de que aunque los niveles de anticuerpos sean normales, en sujetos con deficiencia de zinc la afinidad de éstos frente a su antígeno se encuentra alterada (59).

Como se puede observar en estos estudios citados, es mucho mayor el conocimiento que existe del papel del zinc en el desarrollo y ontogénesis de la respuesta inmune celular pero no así en la respuesta inmune humoral tanto primaria como secundaria. De ahí surge la necesidad de realizar nuevos estudios al respecto.

3. OBJETIVO

Investigar el efecto de un inmunomodulador no tóxico como el zinc, en células formadoras de anticuerpos IgM e IgG de ratones en diferentes etapas de desarrollo, a los que se les administró un suplemento del metal, en el agua de bebida, durante los períodos de gestación, lactancia y postdestete (21 y 42 días de edad).

4. MATERIAL Y METODOS.

Animales.

Se utilizaron ratones BALB/c.AnN de 21 y 42 días, estos animales recibieron acetato de zinc (Mallinckrodt No. 8740) en el agua de bebida "ad libitum" y alimento Bluebonnet (bioterio México número 5014) (dieta de roedor para laboratorio con no menos de 0.01% de zinc). El tratamiento se inició una vez puestas las cruces, las crías fueron alimentadas por sus progenitoras hasta transcurrir los 21 días de nacimiento. En el caso de los 42 días se separaron las crías de los padres y se les administró el mismo tratamiento hasta alcanzar dicha edad. Las dosis de zinc estudiadas fueron de 500 y 1000 ppm. En el caso de los controles de cada edad ingirieron agua desionizada en lugar de la solución de zinc.

Diseño experimental.

Se utilizaron ratones de 21 y 42 días de edad, los cuales fueron separados en 6 grupos experimentales. Los grupos y los tratamientos que recibieron se resumen en la tabla 1. A todos los grupos se les evaluó su respuesta de anticuerpos. La respuesta de anticuerpos fué medida como la capacidad de los animales para formar células productoras de anticuerpos antieritrocitos después de una inmunización practicada 5 días antes para IgM y 2 inmunizaciones en el transcurso de 10 días para IgG.

ZINC "IN VIVO" EN ppm			
GRUPO	GESTACION	LACTANCIA	DESTETE
	21 días	21 días	21 días
I	500	500	-----
II	1000	1000	-----
Control	0	0	-----
III	500	500	500
IV	1000	1000	1000
Control	0	0	0

Tabla 1. Grupos de animales y períodos durante los cuales permanecieron en tratamiento. A los 21 y 42 días de edad que corresponden a los períodos de lactancia y destete respectivamente, se inició la inoculación de los animales con GRC.

Inmunización de los animales.

Una vez terminado el tratamiento con zinc de los ratones problema y los controles de 21 y 42 días de edad, se les administró intraperitonealmente 0.25 ml de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 15% para evaluar la respuesta a IgM y se repitió la inyección a los 6 días para IgG. Transcurridos los 5 y 10 días respectivamente después de la inmunización, los animales se sacrificaron por dislocación cervical, se obtuvieron los bazos y se disgregaron en solución salina balanceada (BSS) a fin de separar las células linfoides y poder evaluar mediante la técnica de Cunningham (60) modificación del método original de Jerne (61), el número de CFA/10⁶ células de bazo.

A continuación se describe la técnica que se empleó en el estudio.

Metodología.

Técnica de Cunningham modificación del método de Jerne.

1. El bazo de cada ratón se disgregó en 4 ml de BSS. El tejido disgregado se colocó en un tubo de ensaye y se dejó reposar en hielo durante 5 minutos, lo que favoreció el depósito de fragmentos de tejido.

2. Para obtener las células esplénicas se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min.

3. Las células se lavaron 2 veces con BSS, por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Al final se resuspendieron en 5 ml de BSS.

4. Se tomó una alícuota de la suspensión para preparar una dilución 1:20 en una solución de azul tripano (Flow Laboratories, Inc., No. Cat 16-910-49), se llenó la cámara de Neubauer y se contó al microscopio con aumento de 40X el número de células viables/ml.

5. El número de células fué ajustado en BSS a 5×10^6 células/ml.

6. La suspensión de células de cada bazo, se mezcló con GRC al 8% para IgM y al 4% para IgG y suero de cuyo 1:10 en las siguientes proporciones:

Para IgM

200 μ l de suspensión de células de bazo 5×10^6 cél./ml

100 μ l de una suspensión de GRC al 8%

200 μ l de suero de cuyo 1:10.

Para IgG

200 μ l de suspensión de células de bazo 5×10^6 cél./ml

100 μ l de una suspensión de GRC al 4%

100 μ l de suero de cuyo 1:10

100 μ l de anti- γ -globulina 1:10 (HiClone No. ES-2060).

7. Con la mezcla anterior se llenaron por duplicado (IgM) y cuadruplicado (IgG) las cámaras de Cunningham. Se utilizaron 200 μ l de la mezcla por cámara, lo cual corresponde a 0.4×10^6 cél. esplénicas por cámara.

8. Las cámaras se sellaron con parafina y posteriormente se incubaron durante 60 minutos a 37 grados centígrados.

9. Se contó el número de placas líticas por cámara. Posteriormente se obtuvo el promedio por animal y finalmente se calculó el número de CFA/ 10^6 cél. de bazo.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto del zinc sobre la respuesta humoral IgM a los 21 días y 42 días de edad.

En las gráficas No. 1 y 2 se observa la respuesta IgM de ratones BALB/c sin tratamiento, 500 y 1000 ppm. Dentro de las dosis evaluadas se observa una mejor respuesta de CFA a 1000 ppm en ambas edades.

Se realizó el tratamiento estadístico (ANOVA) de los resultados obtenidos y se encontró que las dosis de 500 y 1000 ppm presentan una $p < 0.05$ respecto a los controles (Cuadro No. I).

edad (d)	grupos	CFA/10 ⁶ cél. esplénicas
21	control	296.24+/-73.41
21	I	417.37+/-66.31*
21	II	553.74+/-57.0*
42	control	306.74+/-20.42
42	III	584.75+/-60.81*
42	IV	777.62+/-17.08*

Cuadro I. En este cuadro se observa la respuesta humoral primaria IgM, expresada como CFA. Los resultados se muestran como la media +/- S. Los resultados se analizaron estadísticamente a través de ANOVA encontrándose que entre las dosis existen diferencias significativas $p < 0.05$.*

5.2. Efecto del zinc sobre la respuesta humoral IgG a los 21 y 42 días de edad.

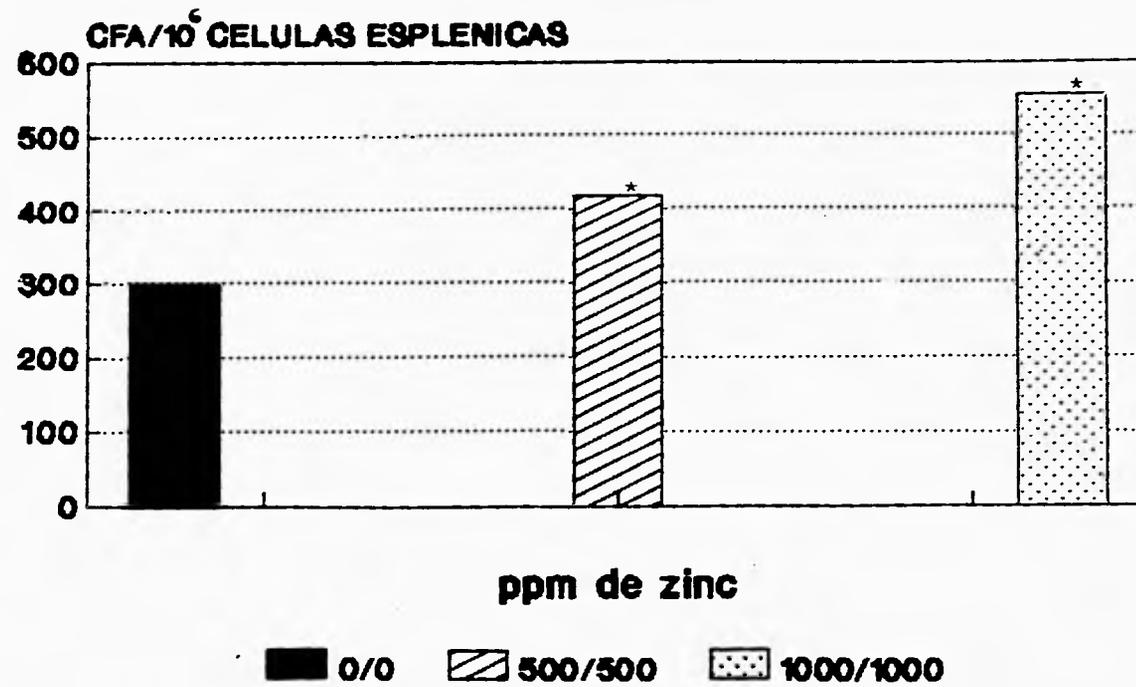
En las gráficas No. 3 y 4 se observa la respuesta IgG de ratones BALB/c sin tratamiento, 500 y 1000 ppm. No se observó diferencias en la respuesta de CFA en las diferentes dosis, pero si en cuanto a la edad.

Se realizó el tratamiento estadístico (ANOVA) de los resultados obtenidos y se encontró que las dosis no presentan diferencias significativas $p > 0.05$ respecto a los controles, pero con una $p < 0.05$ respecto a la edad (Cuadro No. II).

edad (d)	grupos	CFA/10 ⁶ cél. esplénicas
21	control	408.52+/-148.13
21	I	434.5+/-37.78
21	II	441.12+/-43.36
42	control	458.75+/-41.91
42	III	494.87+/-41.49
42	IV	499.0+/-86.05

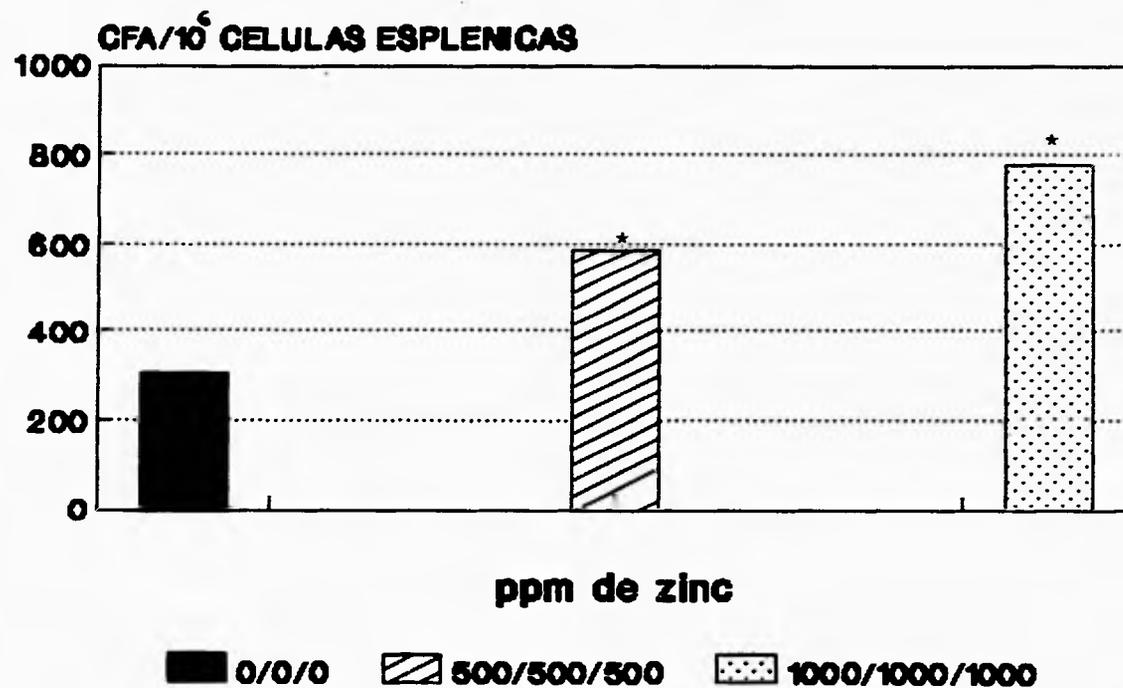
Cuadro II. En este cuadro se observa la respuesta humoral secundaria IgG, expresada como CFA. Los resultados se muestran como la media +/- S. Los resultados se analizaron estadísticamente a través de ANOVA, obteniéndose para las dosis una $p > 0.05$ y para las edades una $p < 0.05$.

RESPUESTA HUMORAL IgM 21 DIAS



GRAFICA No 1 P < 0.05 *

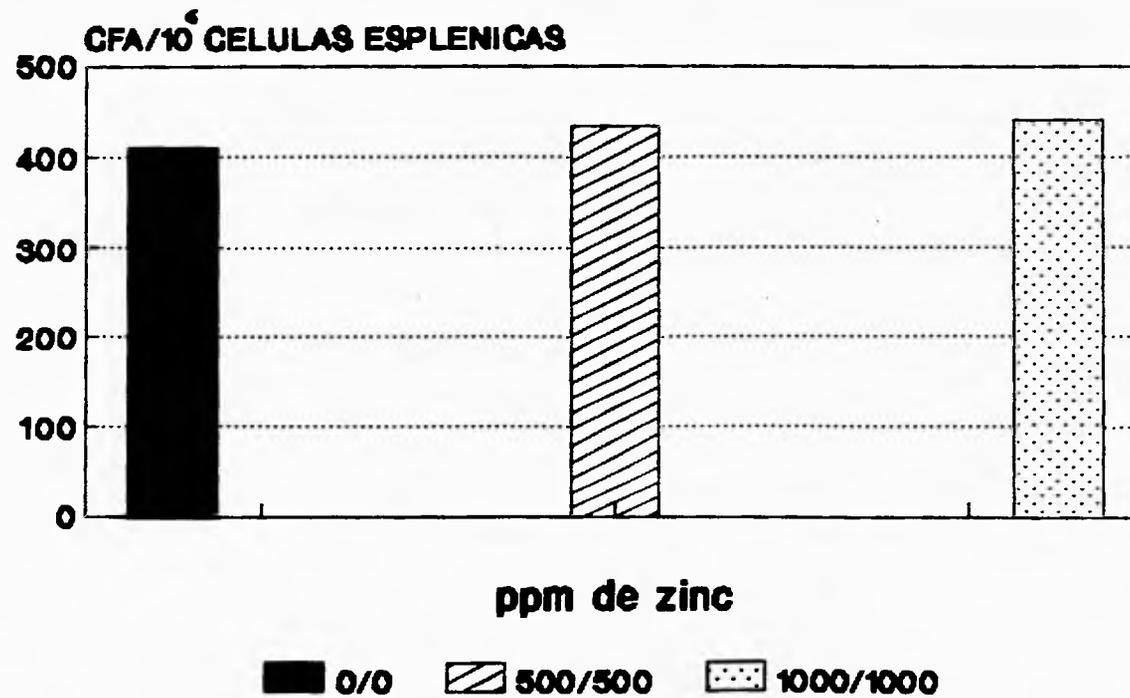
RESPUESTA HUMORAL IgM 42 DIAS



GRAFICA No 2

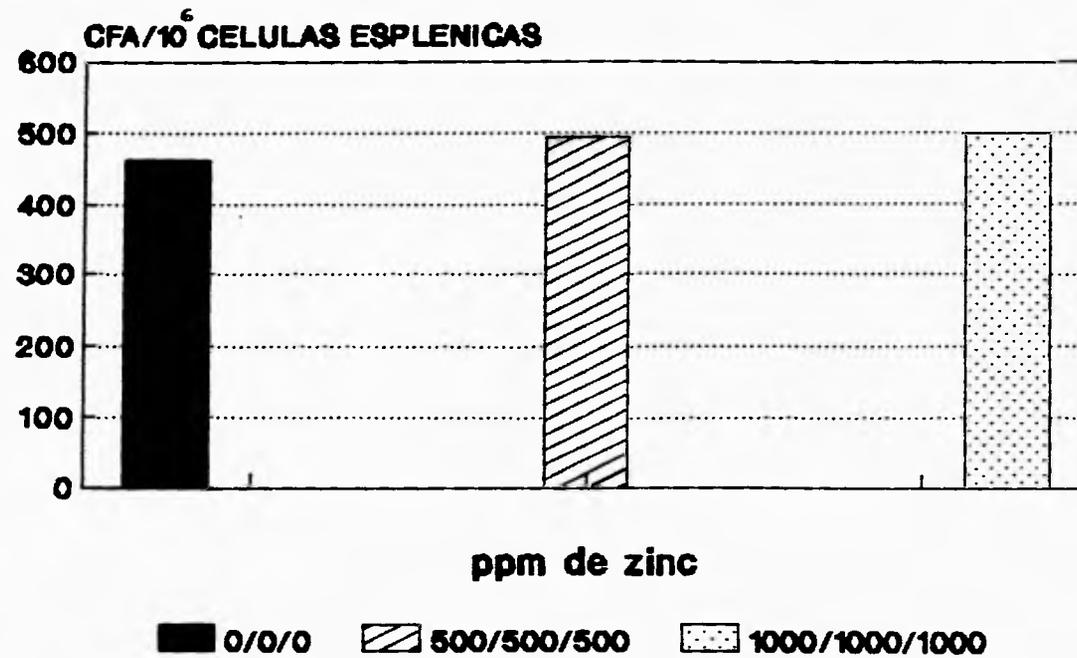
P < 0.05*

RESPUESTA HUMORAL IgG 21 DIAS



GRAFICA No 3 P > 0.05

RESPUESTA HUMORAL IgG 42 DIAS



GRAFICA No 4 P > 0.05

6. DISCUSION

En el presente estudio, se ha evaluado el efecto de la administración de dosis moderadas de zinc, sobre la respuesta inmune humoral primaria y secundaria durante las etapas de gestación, lactancia (21 días de edad) y destete (42 días de edad). Se realizó la evaluación en estas etapas, ya que se sabe que el zinc tiene un papel importante en la ontogenia de la respuesta inmune tanto celular como humoral (11). Ya que se ha visto que la privación de zinc durante la gestación ejerce efectos deletéreos en la respuesta inmune de los ratones y esto puede persistir, a pesar de la suplementación de zinc hasta la tercera generación (7).

Las dosis de zinc utilizadas en el estudio, se determinaron en base a ensayos previos realizados en el laboratorio de investigación en inmunología, de acuerdo a análisis de curvas de dosis-respuesta. Se administró por vía oral por ser la forma más fisiológica de administración en forma de acetato de zinc en el agua de bebida. El resto de la dieta fué estándar para todos los grupos estudiados. De tal forma, que la única variable controlada fué la dosis de zinc que varió de 0 a 500 ppm y 1000 ppm.

Se sabe por reportes de la literatura que la administración de zinc durante la gestación es capaz de estimular la síntesis de DNA y RNA en linfocitos humanos de sangre periférica (62) y de células de bazo murinas (63). Por lo que se ha

demostrado que el zinc tiene efecto mitogénico. Así mismo, en estudios experimentales en animales se ha observado, que, por el contrario, la privación de zinc durante la gestación, causa disminución en la respuesta a mitógenos y en las funciones de las células del sistema fagocítico mononuclear (64). Aún más, es importante la cuidadosa administración de zinc durante la gestación, ya que así como la privación causa alteraciones en la respuesta inmune, el exceso también es inmunotóxico (38).

En nuestro trabajo, la respuesta inmune humoral, se evaluó en base a la estimulación ó cantidad de células esplénicas formadoras de anticuerpos en respuesta a un reto con eritrocitos de carnero, ya que esta forma de evaluación ha sido descrita en diversos estudios previos (6,7). Por ejemplo se sabe que la adición de zinc a cultivos de células formadoras de anticuerpos "in vitro" de ratones envejecidos produce un dramático incremento en la respuesta inmune primaria contra antígenos derivados de eritrocitos de carnero (6). Además se ha estudiado en estas mismas células en cultivo, su capacidad de formación de interleucinas con y sin suplemento de zinc.

El mecanismo por el cual se sabe que el zinc pudiera estimular la producción de células de bazo formadoras de anticuerpos es controvertido y al parecer está en relación a que el zinc aumenta la producción de interleucina 4, la cual facilita la producción de otras linfocinas que se sabe pudieran activar a los linfocitos B y es posible que esta acción el zinc

la ejerza directamente en la regulación de la expresión del genoma para la transcripción y síntesis de varias linfocinas (55).

En nuestro estudio usamos un modelo animal para determinar "in vivo" el efecto del zinc en la producción de células formadoras de anticuerpos de respuesta primaria (IgM) y de respuesta secundaria (IgG).

La cantidad de células de bazo formadoras de anticuerpos se contaron con la técnica de Jerne (61) y se mostraron en las gráficas como el promedio en los dos diferentes grupos de edades estudiados (lactancia y destete) relacionados con tres diferentes dosis de zinc (control, 500 ppm y 1000 ppm).

Se encontró que, en la evaluación de la respuesta humoral primaria, es decir, número de células esplénicas formadoras de anticuerpos IgM, que a los 21 días de edad, hubo un aumento progresivo en el promedio de la cantidad de estas células directamente proporcional con la dosis de zinc utilizada (gráfica 1). Así también, a los 42 días de edad (gráfica 2), se vió un aumento significativo en la cantidad promedio de las células formadoras de anticuerpos IgM en relación directa con la dosis empleada de zinc en la dieta.

Estos datos sugieren, que la suplementación de zinc ejerce un efecto de estimulación de la respuesta inmune primaria, al estimular mayor producción de células de bazo, durante un primer

reto con un antígeno que en este caso fué derivado de los eritrocitos de carnero.

Al evaluar la respuesta inmune secundaria en base a la producción de células esplénicas formadoras de anticuerpos IgG, se dió un segundo reto con eritrocitos de carnero, se observó que a los 21 días de edad no hubo diferencias significativas en la cantidad de CFA en los grupos suplementados con diferentes dosis de zinc. Es decir, no existió correlación entre las dosis de zinc y la producción de células formadoras de anticuerpos IgG, como se puede observar en la gráfica 3. Este mismo fenómeno se observó en ratones de 42 días de edad (gráfica 4).

No obstante, sí hubo una diferencia significativa en el número de CFA para IgG entre las edades de 21 y 42 días, lo cual sugiere que existe una maduración de la respuesta inmune secundaria, pero que ésta es independiente de la dosis de zinc.

Al respecto DePasquale-Jardieu y Fraker, observaron que ratones privados de zinc sólo producían un 43% de CFA-IgG con respecto a controles suplementados con zinc. Pero tampoco encontraron diferencias entre los grupos que recibían suplemento y los que tomaban el zinc adecuado en la dieta (7). Esto sugiere, que probablemente, no se encontró relación entre la respuesta inmune IgG y dosis de zinc, porque todos los grupos recibieron el metal, es decir, no hubo un grupo completamente privado de zinc desde la gestación.

Lo que se hizo evidente en nuestro trabajo, es que el zinc juega un papel crucial en el desarrollo de las células esplénicas IgM, pero quizá una vez estimuladas éstas, ya no haya un estímulo adicional con la suplementación de zinc para la producción de células de memoria IgG, ya que es posible que las modificaciones en el genoma queden ya establecidas desde el primer reto antigénico (55).

7. CONCLUSIONES

1.- El ensayo con diferentes dosis de zinc, muestra que este elemento provoca un estímulo en la respuesta inmune humoral primaria, expresada como la cantidad de células CFA-IgM.

2.- Dicho estímulo en el desarrollo de la respuesta inmune primaria, es proporcional a la dosis de zinc empleada.

3.- La respuesta humoral IgM puede ser estimulada por el zinc tanto a los 21, como a los 42 días de edad.

4.- No existe relación entre la administración de diferentes dosis de zinc en el desarrollo de la respuesta secundaria expresada como la cantidad de CFA-IgG.

5.- El desarrollo de la respuesta inmune humoral IgG es mayor en relación con la edad.

6.- El zinc parece tener un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune humoral IgM.

7.- Se deben continuar los estudios enfocados a tratar de esclarecer el mecanismo por el cual el zinc puede estimular ó modular la respuesta inmune humoral, para evaluar los efectos de la suplementación de zinc, en diferentes etapas de la vida en seres humanos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Chandra RK: Oligoelementos en la nutrición infantil-II. Resumen del 23 seminario de nutrición Nestlé. Nestlé nutrition services 1:1-35, 1993.
- 2.- Grybosky J y Walker AW. Alteraciones de la absorción hereditarias y metabólicas. En: Problemas gastrointestinales en el lactante 2a. edición. Boston, Massachusetts: Editorial panamericana: 584-666,1989.
- 3.- Wakravebs PA, Ganbudge KM, Neldner KH y cols. Zinc metabolism in acrodermatitis enteropathica. J Pediatr 93: 71-78, 1978.
- 4.- Chandra RK y Au B. Single nutrient deficiency and cell-mediated immune responses. I. Zinc. Am Jour Clin Nutr 33: 12-30, 1980.
- 5.- Chandra RK. Impaired immunocompetence associated with iron deficiency. J Pediatr 86:899,1975.
- 6.- Winchurch RA, Togo J y Adler WH. Supplemental zinc restores antibody formation in cultures of AGO spleen cells. Clin Immunology and Immunopathology 49:215-222, 1988.
- 7.- DePasquale-JP y Fraker P. Interference in the development of a secondary immune response in mice by zinc deprivation: Persistence of effects. J Nutr 114: 1762-1769, 1984.
- 8.- Moulder K y Steward Mw: Experimental zinc deficiency: Effects on cellular reponses and the affinity of humoral antibody. Clin Exp Immunol 77:269-274, 1989.
- 9.- Keen Cl, Gershwin ME. Zinc deficiency and immune function. Annu Rev Nutr 10:415-431, 1990.

10.- Beach RS, Gershwin ME y Hurley LS: Nutritional factors and autoimmunity. II. Prolongation of survival in zinc deprived NZB/mice. J Immunol 128: 308-313, 1982.

11.- Beisel WR: Zinc and the immune system. in: Academic Press, ed. Enciclopedia of immunology. Roith 1577-1578, 1992.

12.- Kramer JR, Udomkesmalee E, Dhanamitta S, Sirinhas S y cols: Lymphocyte responsiveness of children supplemented with vitamin A and zinc. Am J Clin Nutr 58: 566-570, 1993.

13.- Park JH, Grangjean CJ, Hartman y cols: Effect of pure zinc deficiency on glucose tolerance and insulin and glucagon levels. Am J Physiol 251: E 273-278, 1986.

14.- Hambidge KM, Kasey CE, Krebs NF: Zinc. In: Trace elements in human health and animal nutrition. Ed. W Mertz, pp. 101-137. New York: Academic 5th ed, 1986.

15.- Smith MA, Moiser-Veillan BP, Nayey DA, Douglas LW y Smith JC: Blood and urinary zinc changes after a glucose challenge in early and late pregnancies. Am J Clin Nutr 48:664-670, 1988.

16.- Beisel WR: Trace Elements in infectious Processes. Medical Clinics of North America 60:831-849, 1976.

17.- Johnson PE, Hunt CD, Milne DB y Mullen LK: Homeostatic control of zinc metabolism in men: zinc excretion and balance in men fed diets low in zinc. Am J Clin Nutr 57: 557-565, 1993.

18.- Sian L, Hambidge MK, Wescott JL, Miller LV y cols: Influence of a meal and incremental doses of zinc on changes in zinc absorption. Am J Clin Nutr 58: 533-536, 1993.

19.- Forbes IJ, Zalewsky PD y Giannakisc A: Role for zinc in a cellular response mediated by protein kinase in human B lymphocytes. Exp Cell Res 195: 224-229, 1991.

20.- Rhodes D y Klug A: Zinc fingers. Sci Am 32-34, 1993.

21.- Keen CL, Lonnerdal B, Glub MS, Olin KL y cols.: Effect of the severity of maternal zinc deficiency on pregnancy outcome and infant zinc status in Rhesus monkeys. *Pediatric Research* 33: 233-241, 1993.

22.- Hambidge KM, Droegemueller W y Facog MD. Changes in plasma and hair concentrations of zinc, copper, chromium and manganese during pregnancy. *Obstetrics and gynecology* 44: 666-672, 1974.

23.- Jameson S. Zinc nutrition and human pregnancy. *Prog Clin Biol Res* 129: 53-69, 1983.

24.- Vruwink KG, Hurley LS, Gershwin ME y Keen CL: Gestational zinc deficiency amplifies the regulation of metallothionein induction in adult mice. *Proc-Soc-Exp-Biol-Med* 188:30-34, 1988.

25.- Uriu-Hare JY, Walter RM y Keen CL: 65 zinc metabolism is altered during diabetic pregnancy in rats. *J Nutr* 122: 1988-1998, 1992.

26.- Keen CL: Maternal factors affecting teratogenic response: a need for assessment. *Teratology* 46: 15-21, 1992.

27.- Beach TS, Gershwin ME y Jured LS: Persistent immunological consequences of gestation zinc deprivation. *Science* 38: 579-590, 1983.

28.- Beach RS, Gershwin ME y Hurley LS: Gestational zinc deprivation in mice: Persistence of immunodeficiency for three generations. *Science* 228: 469-471, 1989.

29.- Kirchessner M y Weigand E: Zinc absorption and excretion in relation to nutrition. In: Sigel H ed. *Metal ions in biological systems*. New York, 319-354, 1983.

30.- Beach RS, Gershwin ME, Makishima RK y Hurley L. Impaired immunologic ontogeny in postnatal zinc deprivation. *J Nutr* 110:805-815, 1980.

31.- Chandra RK.: Antibody formation in first and second generation of spring of nutritionally deprived rats. Science 28:41-42, 1975.

32.- Beach RS, Gershwin ME y Hurley LS: Growth and development in postnatally zinc deprived mice. J Nutr 110: 201-211, 1980.

33.- Sherman AR: Zinc, copper and iron nutriture and immunity. J Nutr 122: 604-609, 1992.

34.- Michel I, Lavigne C y Desrosiers T: Soluble and lipid-bound calcium and zinc during processing of infant milk formulas. Journal of food science 58: 756-760,1993.

35.- Chandra RK: Nutritional regulation of immunity and risk of infection in old age. Immunology 67:141-147, 1989.

36.- Beach RS, Gershwin ME, Hurley LS: Dietary zinc modulation of monkey sarcoma virus oncogenesis. Cancer Res 41:552-559, 1981.

37.- Duchateau J, Delepesse G, Vrijens R y Collet H: Beneficial Effects of oral zinc supplementation on the immune response of old people. Am J Med 70: 1001-1004, 1981.

38.- Fosmire GJ: Zinc toxicity. Am J Clin Nutr 51: 225-227,1990.

39.- Chandra RK: Excessive intake of zinc impairs immune reponses. JAMA 252: 1443-1446, 1984.

40.- Mulhem SA y cols.: Supression of antibody response by excess dietary zinc exposure during certain stages of ontogeny. Pro-Soc-Exp-Biol-Med 180: 453-461,1985.

41.- Golden MH, Jackson AA, Golden BE: Effect of zinc on thymus of recently malnourished children. Lancet ii:1057-1059, 1977.

42.- Golden MH, Golden BE y Jackson AA: Zinc and immunocompetence in protein-energy malnutrition. Lancet 1226, 1978.

43.- Beisel WR: Single nutrients and immunity. Am J Clin Nutr 35:417-468, 1982.

44.- Fraker PJ, Haas SM y Luecke RW. Delayed-type hypersensitivity and restoration of responsivity to dimetrofluorobenzene. J Nutr 112: 309-313, 1982

45.-Sunskind RM: Malnutrition and the immune response (Raven. New York), 1977.

46.-Fraker P y cols.: Interrelation ships between zinc and immune function. Fed prod 45: 1974, 1986.

47.- Chandra RK y cols.: Serum thymic factor activity in deficiencies of calories, zinc, vitamin A and pyridoxine. Clin Exp Immunol 42: 332-335, 1980.

48.- Golden MH, Golden BE y Jackson A: Zinc and immunocompetence in protein-energy malnutrition. Lancet 1226, 1978.

49.- Salimonu LS, Johnson AO, Williams AI, Adeleye GI y Osunkoya BO. Lymphocyte subpopulations and antibody levels in immunized malnourished children. Br J Nutr 48: 7-14,1982.

50.- Haynes DC, Gershwin ME, Golub MS, Cheung ATW y cols: Studies of marginal zinc deprivation in rhesus monkeys. Influence on the immunohematology of infants in the first year. Am J Clin Nutr 42: 252-262, 1985.

51.- Chandra RK: Immunocompetence in undernutrition. J Pediatr 81: 1194-1200, 1972.

52.- Golub MS, Gershwin ME, Hurley LS, Hendricks AG y cols: Studies of marginal zinc deprivation in rhesus monkeys: infant behavior. Am J Clin Nutr 42: 1229-1239, 1985.

53.- Cunningham AJ: Studies of the celular basis of IgM immunological memory. Immunology 16: 621-632, 1969.

54.- Fraker PJ, Hildebrandt KM y Luecke RW: Alteration of antibody-mediated responses to T-cell-dependent and independent antigens by maternal marginal zinc deficiency: restoration of responsivity by nutritional repletion. *J Nutr* 114: 170-179, 1984.

55.- Luecke RW y Fraker PJ: The effect of varying dietary zinc levels on growth and antibody-mediated response in two strains of mice. *J Nutr* 109: 1373-1376, 1979.

56.- Krishana MR y Marion TN: Structural similarity of antibody variable regions from immune and autoimmune anti-DNA antibodies. *J Immunol* 150: 4948-4957, 1993.

57.- Golub MS, Gershwin ME, Hurley LS, Saito WY y cols: Studies of marginal zinc deprivation in Rhesus monkeys. Growth of infants in the first year. *Am J Clin Nutr* 40: 1192-1202, 1984.

58.- Golub MS, Gershwin ME, Hurley LS, Baly DL y cols: Studies of marginal zinc deprivation in Rhesus monkeys. Influence on pregnant dams. *Am J Clin Nutr* 39: 265-280, 1984.

59.- Cook-Mills JM, Fraker PJ: Functional capacity of the residual lymphocytes from zinc-deficient adult mice. *Br J Nutr* 69:835-848, 1993.

60.- Cunningham AJ and Szenber A: Further improvement in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunol* 14: 599, 1965.

61.- Jerne NK y Nordin AA: Plaque formation in agar by single antibody-producing cell. *Science* 140: 405, 1963.

62.- Daeschner CW, Carpentieri U, Goldman AS y Haggard ME: Zinc deficiency and blood lymphocyte function with sickle cell disease. *Scand J Haematol* 35: 185-90, 1985.

63.- Beach RS, Gershwin ME y Hurley LS: Persistent immunological consequences of gestation zinc deprivation. *Am J Clin Nutr* 38: 579-90, 1983.

64.- Haynes DC, Glub MS, Gershwin ME, Cheung AT y cols:
Long-term marginal zinc deprivation in Rhesus monkeys. Effects on
adult females breeders before conception. Am J Clin Nutr 45: 1492-
502, 1987.