

00524
104



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTOS DEL ZINC EN LA GESTACIÓN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA-FARMACÉUTICA-BIÓLOGA

P R E S E N T A :
KRISTEL MARTÍNEZ MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO :

Presidente : MARIA DOLORES LASTRA AZPILICUETA
Vocal: ANA ESTHER AGUILAR CÁRDENAS
Secretario: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE
1er. Suplente: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ
2do. Suplente: JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLIS

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema:

María Dolores Lastra Azpilicueta

Ma. Dolores Lastra

Supervisor Técnico:

Ana Esther Aguilar Cárdenas

Ana Esther
Aguilar C

Sustentante:

Kristel Martínez Martínez



DEDICATORIAS

A mis padres por darme todo su amor, apoyo y confianza para culminar esta etapa y poder enfrentar nuevos retos.

A mi hermano por estar apoyándome en todo este tiempo y por sus maravillosos dibujos.

A todos mis seres queridos por estar conmigo

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química, UNAM

A la Maestra Ma. Dolores Lastra Azpilcueta por darme su apoyo y por asesorarme siempre que lo requerí.

A la Dra. Ana Esther Aguilar Cárdenas por su amistad, asesoramiento y consejos.

Al Maestro Rodolfo Pastelín Palacios por asesorarme.

A todos los integrantes del Laboratorio de Investigación en Inmunología por brindarme su amistad y su apoyo.

Al Laboratorio de Absorción Atómica del Departamento de Química Analítica de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM, en especial a la Q. Nadia Munguía A.

A mis compañeros y amigos por haberlos conocido

A

INDICE

	página
Abreviaturas	i
Relación de tablas y figuras	ii
Resumen	iii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Generalidades del zinc	3
2.2 El zinc en las etapas perinatales	5
2.3 El zinc y el sistema inmunológico	7
2.4 El zinc en la gestación	10
2.5 Efectos de la suplementación con zinc	13
3. Hipótesis del estudio	14
4. Objetivos	15
5. Material y métodos	16
6. Resultados	19
7. Discusión	39
8. Conclusiones	42
Anexo I	43
Anexo II	46
Bibliografía	48

ABREVIATURAS

ARN	Ácido desoxirribonucleico
ADN	Ácido ribonucleico
CD4	Molécula membranal en los linfocitos T cooperadores
CD8	Molécula membranal en los linfocitos T citotóxicos
CD16	Fcy RIII
DAB	3,3'-diaminobencidina
FSH	Hormona foliculo estimulante
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IF	Índice fagocítico
IL-1	Interleucina-1
IL-2,3,4,5,6,12,13	Interleucina-2,3,4,5,6,12,13
IFN-α	Interferón alfa
IFN-γ	Interferón gamma
LH	Hormona luteinizante
NK	Célula citotóxica natural
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PFC	Células formadoras de placas hemolíticas
PHA	Fitohemaglutinina
RPMI	Roswell Park Medical Institute
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
Th1	Linfocito T cooperador, subpoblación tipo 1
Th2	Linfocito T cooperador, subpoblación tipo 2
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Adquirida

RELACION DE TABLAS Y FIGURAS

	página	
Tabla I	Cantidades recomendadas de zinc por National Research Council of United States	3
Tabla II	Indicadores de los <i>status</i> de zinc	4
Tabla III	Grupos de tratamiento con zinc	16
Tabla IV	Peso de las hembras durante los diferentes días de gestación	19
Tabla V	Peso de los machos a los diferentes días de gestación	19
Tabla VI	Número de embriones a los diferentes días de gestación	22
Tabla VII	Porcentaje de embriones viables a los 7, 14 y 21 días de gestación	22
Tabla VIII	Porcentaje de embriones no viables a los 7, 14 y 21 días de gestación	23
Tabla IX	Peso del tejido embrionario a los 7, 14 y 21 días de gestación	23
Tabla X	Concentración de zinc en microgramos por gramo de tejido embrionario a los 7, 14 y 21 días de gestación	28
Tabla XI	Concentración de zinc en el útero de 21 días	29
Tabla XII	Concentración de zinc en la placenta de 21 días	29
Tabla XIII	Índice fagocítico en progenitores hembras a los 7, 14 y 21 días de gestación	36
Tabla XIV	Índice fagocítico en progenitores machos durante la gestación	36
Figura 1	Metabolismo del zinc	4
Figura 2	Consecuencias de la deficiencia de zinc materno	11
Figura 3	Modelo del metabolismo del zinc durante la gestación	12
Figura 4	Peso de los progenitores hembras	20
Figura 5	Peso de los progenitores machos	21
Figura 6	Efecto del zinc sobre el índice reproductivo	24
Figura 7	Porcentaje de embriones viables a los 7, 14 y 21 días de gestación	25
Figura 8	Porcentaje de embriones no viables a los 7, 14 y 21 días de gestación	26
Figura 9	Peso del tejido embrionario a los 7, 14 y 21 días del periodo de gestación	27
Figura 10	Fotografía correspondiente al embrión de 7 días de gestación	30
Figura 11	Fotografía correspondiente al embrión de 14 días de gestación	31

Figura 12	Fotografía correspondiente al feto de 21 días de gestación	32
Figura 13	Concentración de zinc en microgramos por gramo de tejido embrionario	33
Figura 14	Concentración de zinc en microgramos por gramo de tejido uterino de 21 días	34
Figura 15	Concentración de zinc en microgramos por gramo de tejido placentario de 21 días de gestación	35
Figura 16	Índice fagocítico en progenitores hembras a los 7,14 y 21 de gestación	37
Figura 17	Índice fagocítico en progenitores machos a los diferentes días del periodo de gestación	38

RESUMEN

En la última década el estudio de los elementos traza ha cobrado gran importancia, debido a que son esenciales para el desarrollo y mantenimiento del organismo. Se ha reconocido la influencia de factores nutricionales sobre el sistema inmunitario, esto es, porque se ha asociado a la incidencia de varias enfermedades infecciosas y la existencia de atrofia de órganos linfoides en niños con desnutrición atribuible a una deficiencia de zinc.

El zinc es un elemento cuyas características lo hacen sumamente versátil en múltiples procesos bioquímicos, además el zinc juega un papel primordial en una gran variedad de sistemas metabólicos, actúa como cofactor de enzimas relacionadas con la proliferación celular como ADN y ARN polimerasas, etcétera.

El presente trabajo forma parte de una línea de investigación acerca de los efectos del zinc sobre el sistema inmunológico. Se desarrolló un diseño experimental en ratones BALB/c, para determinar el efecto de la concentración de zinc en las etapas de gestación y su influencia en el índice fagocítico. Los animales recibieron acetato de zinc, en una concentración de 500 mg/L en el agua de beber, desde el momento de la cruce y durante la gestación. El grupo testigo no recibió zinc en el agua de bebida y el grupo I recibió dosis de 500 mg/L a los 7, 14 y 21 días del periodo de gestación. Los controles, hembras no gestantes y machos sin cruzar, no recibieron Zn durante los mismos periodos.

Se observó un incremento del índice fagocítico (IF) en el grupo de animales a los que se les administró zinc en el agua de bebida (grupo I, Zn+) con respecto de aquellos que no se les administró este elemento (grupo testigo, Zn-). También cabe señalar que el IF fue mayor en las hembras que en los machos, esto es para ambos grupos experimentales (grupo I y grupo testigo).

La concentración de zinc embrionario, se evaluó por absorción atómica y fue significativamente mayor en el grupo I con respecto al grupo testigo. Se evaluó la concentración de zinc en útero de 21 días en hembras no gestantes y en la placenta correspondiente a los 21 días de gestación (grupo I y grupo testigo).

Se observó un incremento significativo en el número de embriones en animales que fueron suplementados con zinc (grupo I, Zn+) con respecto a aquellos que no fueron suplementados con este elemento (grupo testigo, Zn-).

Estos resultados sugieren que la suplementación oral con zinc, en periodos y dosis específicas, pueden tener un efecto benéfico sobre algunas respuestas inmunológicas tanto en la gestación como en las etapas perinatales.

1. INTRODUCCIÓN

Alrededor de los años treinta los primeros estudios realizados en animales documentan que el zinc es esencial para el desarrollo de éstos. Prasad propone que la deficiencia de zinc produce un retardo en el crecimiento.⁴⁸

El zinc es un nutrimento indispensable para el organismo de los humanos y juega un papel importante en una serie de procesos metabólicos que no son totalmente claros, es un cofactor importante de más de 200 enzimas, participa como ión estructural en membranas biológicas y en la síntesis de proteínas. Es un elemento traza fundamental para el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular.^{9,41,55}

En la actualidad la deficiencia de zinc se considera un problema de salud pública importante, pues aunque el Zn está presente en diversos alimentos como son: carnes rojas, pescados, pollo e hígado, en países subdesarrollados la ingesta de estos alimentos es muy limitada. Los estudios realizados sugieren que la deficiencia moderada de zinc se presenta asociada a la ingestión de dietas basadas en alimentos de origen vegetal, las cuales contienen cantidades importantes de inhibidores de la absorción de zinc, tales como, fitatos y fibras, que forman complejos insolubles con el zinc. Este tipo de dietas se consume habitualmente en las zonas rurales y en la población marginal en el país.^{10,26,46}

El zinc juega un papel central y único en el sistema inmune y su deficiencia incrementa la susceptibilidad a varios patógenos, los niveles normales de zinc son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de funciones del sistema inmune. La deficiencia de zinc afecta el desarrollo de la inmunidad adquirida, ciertas funciones de linfocitos T y B y la producción de citocinas tipo Th1.^{6,11,15,30,37}

Los estudios realizados en modelos experimentales de deficiencia severa de zinc han demostrado alteraciones notables en el sistema inmune, incluyendo un retraso en el crecimiento.^{5,7,8}

El zinc juega un papel importante en la reproducción en hombres y mujeres, es necesario para la síntesis y secreción de la hormona luteinizante (LH) y la foliculo estimulante (FSH), diferenciación gonadal, crecimiento testicular, formación y maduración de espermatozoides y fertilización. La deficiencia de zinc contribuye a una disfunción reproductiva como es la infertilidad y el hipogonadismo.^{9,46}

Existen sectores de la población que pueden presentar deficiencia de zinc, tales como: recién nacidos, niños en edad preescolar, mujeres gestantes y ancianos.

Durante la gestación se debe tener una buena alimentación y existe la necesidad de administrar a la madre suplementos nutricionales que favorecen el desarrollo y crecimiento del feto, incluyendo la salud materna.

Los estudios realizados en mujeres deficientes en zinc indican que durante el embarazo es necesario suplementar a las madres para evitar que existan complicaciones durante el parto, como es la desproporción céfalo-pélvica, riesgo de aborto, ruptura de membranas placentarias, etcétera. ^{9,10,22,24,43}

Por lo que respecta a los recién nacidos y niños en edad preescolar, la suplementación con zinc disminuye la tendencia a presentar enfermedades infecciosas como, son la diarrea y las enfermedades respiratorias. ^{22,32,42}

Este trabajo estudió algunos de los efectos del zinc en la gestación en los progenitores de ambos grupos experimentales (grupo testigo y I). Se obtuvieron los embriones correspondientes a los 7, 14 y 21 días del periodo de gestación, útero y placenta, posteriormente se les realizó la técnica de Absorción Atómica para determinar la concentración de Zn en microgramos por gramo de tejido y se realizó la técnica de eritrofagocitosis.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades sobre el zinc

El zinc es un elemento metálico blanco azulado con múltiples aplicaciones industriales, es uno de los elementos de transición del sistema periódico; su número atómico es 30. Los minerales de zinc se conocen desde hace mucho tiempo, pero este no fue reconocido como elemento hasta 1746, cuando el químico alemán Andreas Sigismund Marggraf aisló el metal calentando calamina y carbón de leña. Es cristalino, insoluble en agua caliente y fría, y soluble en alcohol, en los ácidos y en los álcalis. Tiene un punto de fusión de 420°C, un punto de ebullición de 907°C y una densidad relativa de 7.14. Su masa atómica es de 65.38. Ocupa el lugar 24 en abundancia entre los elementos de la corteza terrestre.

EL zinc posee una serie de propiedades químicas que lo hacen único y muy útil en varios sistemas biológicos, juega un papel importante en el organismo, como cofactor de diversas enzimas, se asocia al papel de las metaloenzimas, se le puede encontrar formando diversas proteínas de transcripción. El zinc es necesario para mantener la integridad de las histonas, proteínas íntimamente involucradas con el ADN y puede desempeñar un papel fundamental en el crecimiento y replicación celular.^{4,46,47,53,55}

La tabla I muestra las recomendaciones propuestas por el *National Research Council of United States*, 1989.^{46,47}

Cantidades recomendadas en la dieta por National Research Council of United States	
Niños menores de 1 año	5 mg/día
Niños de 1 a 10 años	10 mg/día
Varones mayores de 10 años	15 mg/día
Mujeres mayores de 10 años	12 mg/día
Mujeres embarazadas	15 mg/día
Mujeres lactantes de 1er. semestre	19 mg/día
Mujeres lactantes de 2o. semestre	16 mg/día

Tabla I. Cantidades recomendadas de zinc por National Research Council of United States

El zinc juega un papel central y único en el sistema inmune. Diversos estudios demuestran que su deficiencia aumenta la susceptibilidad a una gran variedad de patógenos y efectos específicos o no específicos del sistema inmune. Hay evidencias clínicas y experimentales de la existencia de involución tímica, esto es porque la reducción en el tamaño del órgano y su celularidad se observan en la corteza tímica, estos cambios no se encuentran en animales alimentados con Zn.^{37,48}

2.1.1 Metabolismo del zinc en el organismo

El zinc se encuentra en los músculos, en los huesos, en la próstata, en el hígado, en la retina, en la piel y en el cabello. En la circulación, puede encontrarse en el plasma unido a la albúmina y a la α_2 -macroglobulina, también se localiza en los eritrocitos, los leucocitos y en la anhidrasa carbónica.

Indicadores del status de zinc

Concentraciones de zinc en plasma
Concentraciones de zinc en suero
Metalotioneína en plasma
Metalotioneína en eritrocitos
Concentraciones de zinc en eritrocitos
Concentraciones de zinc en leucocitos
Concentraciones de zinc en neutrófilos.
Actividad de 5' nucleotidasa
Actividad de fosfatasa alcalina

Tabla II. Indicadores de los status de zinc⁴⁶

La ingesta diaria de zinc elemental corresponde a 15 mg/día, el Zn se absorbe a nivel del yeyuno, este pasa al interior de los enterocitos y se retiene al unirse a una proteína ligante de metales pesados rica en cisteína (metalotioneína) y otros transportadores. El Zn que sale de las células epiteliales se incorpora a la circulación porta, ya en la circulación se une a la albúmina que constituye el mayor transportador de Zn, también puede unirse a la α_2 -macroglobulina. El zinc no se almacena fácilmente y se pierde por el organismo constantemente.

4,53

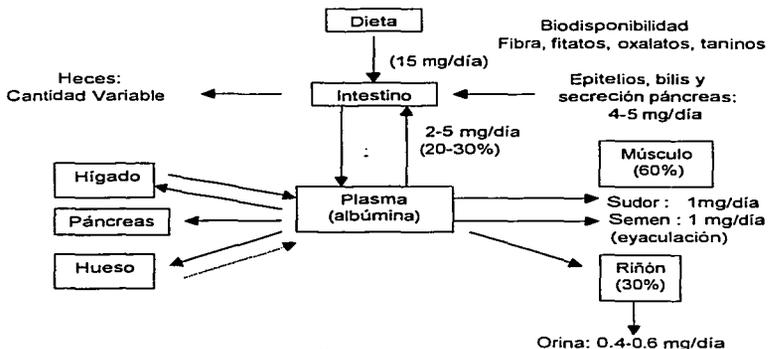


Figura 1. Metabolismo del zinc⁵⁵

Las funciones fisiológicas en las que participa el Zn, son: la síntesis de las proteínas y de los ácidos nucleicos, juega un papel relevante en el desarrollo de las funciones de los linfocitos T contribuyendo así a la inmunidad mediada por células y tiene una importante interacción con la vitamina A.^{5,47,48,55}

Aunque la deficiencia de zinc severa se considera actualmente rara, la deficiencia moderada es común en los países subdesarrollados, diversas manifestaciones clínicas se han atribuido a la deficiencia de zinc, desde un ligero retardo en el crecimiento hasta el enanismo, además se informa acerca de pérdida de apetito, letargia, hipogonadismo y lesiones dérmicas.^{10,55}

2.2 El zinc en las etapas perinatales

Algunos nutrimentos necesarios para los seres humanos son requeridos en cantidades pequeñas, miligramos o microgramos, denominándoseles así micronutrimentos, entre los cuales se encuentra el zinc.⁵⁵

Es necesario suplementar con zinc y otros micronutrimentos a los grupos de la población que son más vulnerables, tales como las mujeres gestantes y los niños en edad preescolar, que es cuando los requerimientos de Zn son más altos y la leche materna contribuye muy poco.^{2,3,10,34,44}

2.2.1 Durante la infancia

La suplementación con zinc, en niños, puede ser benéfica en algunas situaciones particulares como una baja ingesta de alimentos de origen animal e ingesta alta en cereales y leguminosas que puede provocar bajas concentraciones de zinc plasmático o diarrea persistente.^{2,14,25}

Algunas sales de zinc como son los carbonatos y óxidos son prácticamente insolubles afectando así su biodisponibilidad, por lo que es necesario realizar estudios más amplios acerca de la solubilidad y la aceptación de las diversas sales de Zn empleadas en los suplementos alimenticios durante la lactancia y también porque algunas sales pueden provocar náuseas en altas dosis.²

En un estudio realizado por Michel *et al*, se demuestra que aunque las cantidades de Ca y Zn sean mayores en fórmulas lácteas que en la leche materna, el porcentaje de los elementos solubles disminuye durante el proceso de elaboración.³⁴

Con la finalidad de evaluar si la deficiencia de zinc podría desempeñar un papel etiológico importante en este fenómeno. Rosado *et al*, realizaron un estudio de suplementación con 20 mg de metionina de zinc, por un año, en 219 niños de entre 12 y 36 meses de edad que vivían en una comunidad rural del Estado de México, no se encontró un cambio significativo en ninguno de los indicadores antropométricos (talla, peso).^{41,42}

En México, en algunas poblaciones rurales, se ha encontrado que la deficiencia de diversos micronutrientes también afecta el crecimiento de los niños y existe un incremento en la morbilidad provocada por enfermedades infecciosas. Los estudios realizados por Rosado *et al*, informan que al suplementar con zinc a niños de 18 y 36 meses de edad disminuyen los episodios diarreicos, pero sin mejorar el crecimiento.^{41,42}

Estos resultados sugieren que los niños en edad preescolar no satisfacen sus requerimientos de zinc a través de la comida y que la suplementación es particularmente útil durante esta etapa del desarrollo.

2.2.2 Durante la lactancia

Durante los primeros meses después del nacimiento, la leche materna es la única fuente de zinc en el recién nacido. Las concentraciones de zinc en la leche materna van disminuyendo al ir avanzando la lactancia. En los primeros 3 meses de la lactancia la concentración de zinc es de 1.6 mg/L y disminuye con el tiempo postparto (0.5 mg/L a los 12 meses).^{54,55}

La leche materna como único alimento no cubre la demanda de zinc, a este respecto se reportan, en EUA y Francia incrementos en la velocidad de crecimiento en niños de 6 y 24 meses, que fueron suplementados con Zn (5.8 mg/L). Se ha estimado que los alimentos complementarios proporcionan un 84-89% de Zn requerido en infantes de 6 a 24 meses, que se encuentran en un periodo de transición de la alimentación con leche a alimentos sólidos.^{2,55}

Fue así que la Academia Americana de Pediatría hizo en 1976 recomendaciones acerca de la cantidad de oligoelementos que deberían contener las fórmulas lácteas (3.7 y 12 mg/L), considerando en esta sugerencia la biodisponibilidad de los minerales.⁵⁵

2.2.3 Durante la gestación

Varios estudios informan que durante la etapa perinatal la concentración plasmática de zinc disminuye a medida que progresa el embarazo. A pesar de la dificultad para identificar la deficiencia de zinc en la mujer gestante, algunos investigadores se han dado a la tarea de estudiar si la deficiencia de este nutrimento se asocia a alguna patología en problemas con el embarazo, o en los neonatos.^{52,55}

La deficiencia moderada de zinc en roedores, durante la gestación, puede resultar en un retardo en el crecimiento intrauterino y alteraciones en el tiempo gestacional, aunque hay estudios que informan acerca de malformaciones en las crías.^{1,6,54} Algunos datos sugieren que la deficiencia de Zn en los humanos trae consigo consecuencias similares, aunque los resultados son inconsistentes.¹⁰

La cantidad de zinc absorbido que se requiere para reemplazar la pérdida de Zn endógeno, se estima en un 2.5 mg Zn/día, esta cantidad se incrementa a 3.2 mg Zn/día al final de embarazo, esto es, para apoyar la ganancia de tejido materno, del fluido amniótico y el crecimiento fetal.⁵⁵

El zinc es un nutriente esencial para el crecimiento, el feto requiere del 60% del elemento ingerido durante el tercer trimestre del embarazo, cuando el peso fetal se incrementa al máximo (aproximadamente 2800 g- 3100g).

2.3 El zinc y el sistema inmunológico

EL zinc juega un papel único y central en el sistema inmune, diversos estudios demuestran que la deficiencia de Zn incrementa la susceptibilidad a una variedad de patógenos.^{46,47,48}

Durante varias décadas se ha estudiado el mecanismo inmunológico con el cual el Zn modula la susceptibilidad a infecciones. Está claro que el Zn afecta aspectos múltiples del sistema inmune, desde las barreras de la piel hasta la regulación genética de los linfocitos.⁴⁸

El Zn es crucial para el desarrollo y funcionamiento de las células mediadoras de la inmunidad no específica como son neutrófilos y células NK. La deficiencia de zinc afecta también el desarrollo de la inmunidad adquirida por influir tanto en la diferenciación como en ciertas funciones de los linfocitos T, producción de citocinas Th1 y linfocitos B.^{12,35,39}

El macrófago que es un célula primordial de muchas funciones inmunológicas, se ve afectada al disminuir su capacidad de fagocitosis, la muerte intracelular y la producción de citocinas³⁶. La deficiencia de Zn reduce la actividad de la timulina, la producción y la actividad biológica de múltiples citocinas como son: IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-12, IFN- α , IFN- γ y TNF- α . La deficiencia de zinc puede producir un desequilibrio entre células Th1 y células Th2.^{36,46,47}

Al existir *status* adecuados de zinc, estos contribuyen a la preservación de la relación CD₄:CD₈, que es crucial es personas que presentan infección por VIH y están en el periodo de transición hacia SIDA.^{46,47}

2.3.1 Efecto del zinc sobre las barreras y la inmunidad natural

Los mecanismos innatos incluyen barreras mecánicas, tales como la piel, y componentes celulares (neutrófilos y células NK). La influencia del Zn en barreras inmunes ha recibido poca atención aunque las características de la deficiencia de zinc incluyen lesiones en la piel, lesiones gastrointestinales y alteraciones en las funciones pulmonares.⁴⁸

a) Células NK

Los estudios en humanos y animales describen un decremento en la actividad de las células NK en estados de deficiencia del zinc. El elemento también influye sobre la expresión de la molécula CD16.⁴⁸

La exposición a Zn endógeno estimula la producción de IFN- γ de las células NK de sangre periférica. Aunque la exposición a altas concentraciones del elemento *in vitro* inhibe su actividad citotóxica.⁴⁸

b) Neutrófilos

La función de los leucocitos polimorfonucleares se ve alterada en animales y pacientes con acrodermatitis enteropática y otros tipos de deficiencia de zinc. En muchos casos, los números absolutos de PMN no se ve afectado, pero su actividad quimiotáctica se encuentra dañada, este daño puede revertirse al adicionar Zn *in vitro*. Los efectos sobre la deficiencia de zinc sobre las funciones microbicidas como la producción de radicales de oxígeno, extravasación y fagocitosis, no han sido evaluados en su totalidad.⁴⁸

2.3.2 Efectos de zinc sobre la inmunidad específica o adquirida

Las investigaciones realizadas por Fraker *et al*, en animales adultos sometidos a una dieta deficiente de zinc por dos semanas se encuentra una reducción en el número de linfocitos T y B, tanto en sangre periférica como en tejido del bazo, reduciéndose en un 50%.^{48, 56}

Los estudios realizados por Beach *et al*, demuestran que la deficiencia de Zn en ratones se asocia con respuestas inmunes dañadas, particularmente aquellas mediadas por linfocitos T y esto influye durante el curso de infecciones, neoplasias y enfermedades autoinmunes. Se ha observado un comportamiento similar en humanos, sin embargo el papel del Zn en la ontogenia de la inmunidad es poco conocido.^{6,7,8}

Algunos datos basados en ensayos que miden la producción de anticuerpos *in vitro* (PFC) sugieren que el efecto primario de la deficiencia de Zn es la delección de los linfocitos, sin pérdida de la funcionalidad en las células sobrevivientes.^{1,48}

a) Linfocitos T

Estudios en animales con deficiencia de Zn muestran una reducción sustancial en el tamaño del timo, órgano principal para el desarrollo de linfocitos T. En ratones se observa que a las dos semanas de nacidos hay una involución tímica, después de cuatro semanas el timo tiene solamente el 25% del tamaño original, y a las seis semanas se encuentra una pequeña cantidad de linfocitos.³⁸

En los estudios en animales deficientes de Zn, se encontró una disminución progresiva de linfocitos T en bazo, nódulos linfáticos y sangre periférica. En los niños con deficiencia de Zn y acrodermatitis enteropática o con nutrición parenteral se han encontrado datos de la disminución de linfocitos T particularmente en la sangre y tejidos linfoides periféricos. Se ve una disminución en la proporción de células CD4⁺:CD8⁺. Recientes estudios en humanos, muestran que el porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD73⁺, precursores de los linfocitos T citotóxicos, se encuentran disminuidos al existir una deficiencia de Zn.⁴⁸

Los estudios *in vitro* reportan que el Zn es requerido para la proliferación de linfocitos T en respuesta a IL-1, PHA, concanavalina A e IL-2. También se ha informado que el zinc incrementa la transcripción y expresión de la molécula ICAM-1, en la superficie de células linfoides, pero no en fibroblastos.⁴⁸

b) Timulina

Es un nonapéptido, secretado por las células epiteliales tímicas. La timulina se une a los receptores de alta afinidad de linfocitos T y promueve su maduración, su citotoxicidad y la producción de IL-2. El zinc se une a la timulina a través de una asparagina y dos serinas. La actividad de la timulina depende de la concentración de zinc plasmático.⁴⁸

c) Linfocitos B

En la médula ósea, la deficiencia de Zn afecta el desarrollo de los linfocitos B, en un experimento realizado por Fraker *et al*, cuando se alimentaron ratones con una dieta deficiente en zinc durante 30 días se redujeron los linfocitos B y sus precursores un 75%. La pérdida fue predominante en linfocitos pre-B y linfocitos B inmaduros, los cuáles declinaron alrededor de un 59% y 25% respectivamente, mientras los linfocitos B maduros se afectaron menos.^{1,48,58}

El zinc *in vitro*, es un activador policlonal de linfocitos B humanos en sangre periférica, bazo y ganglios linfáticos. Sin embargo, estos efectos pueden ser secundarios a la activación de linfocitos T cooperadores.^{1,50}

d) Monocitos y macrófagos

Se han observado efectos sobre la función de los monocitos y macrófagos durante la deficiencia de zinc. Hambidge informa que en humanos con acrodermatitis enteropática, la respuesta quimiotáctica de los monocitos se encuentra suprimida y se restaura al administrar Zn *in vitro*. Los monocitos de ratones deficientes en el elemento tienen dañada la capacidad de fagocitar parásitos intracelulares, lo cual también se corrige al adicionar Zn. Sin embargo, algunos estudios reportan que la capacidad fagocítica y citotóxica se encuentra incrementada.⁵⁰

Existen pocos datos que demuestran la intervención del zinc sobre los macrófagos para favorecer la producción de radicales de oxígeno que terminen con parásitos intracelulares. Chavdil *et al* reporta que a altas concentraciones de Zn *in vitro* se inhibe la activación del macrófago, su movilidad, la fagocitosis y el consumo de oxígeno.⁵⁰

Lastra *et al* informan que la administración oral de zinc a ratones BALB/c tanto en el periodo de gestación como la lactancia produjo un incremento significativo en el metabolismo de los macrófagos peritoneales y en la fagocitosis, también se observó el aumento en la producción de TNF alfa por macrófagos peritoneales.²⁷

e) Citocinas

Las citocinas son mensajeros claves de las células inmunológicas y regulan múltiples actividades del sistema inmune. Esto se lleva a cabo a través de receptores correspondientes a las células blanco.

La producción y actividad biológica de múltiples citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IFN- α , IFN- γ , TNF- α) que influyen en el desarrollo y funcionamiento de linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, células NK, se ven afectadas al existir una deficiencia de Zn^{27,28,29,30,31}. Existen informes de que algunas citocinas, tales como: IL-1, IL-2, IL-4 e IFN- γ se ven disminuidas al existir una deficiencia de zinc.^{23,38,45,50,51}

En algunos estudios se ha encontrado la disminución del receptor para IL-2, la IL-3 tiene un sitio de unión para el zinc que es importante para su actividad y con el IFN- γ participa en la dimerización de la citocina lo cual también es importante para su función.⁵⁰

Las células T cooperadoras se pueden clasificar como Th1 o Th2, de acuerdo a sus funciones, inmunidad mediada por células (Th1) e inmunidad mediada por anticuerpos (Th2). Estas poblaciones están bien caracterizadas considerando como productos de células Th1 a IL-2, IFN- γ y TNF- α y como productos de células Th2 a IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. En relación a los neonatos se ha encontrado una respuesta inmune deficiente, tal vez al predominio de la respuesta Th2 siendo más susceptibles a infecciones.^{23,35,38,48,50}

2. 4 El zinc en la gestación

El periodo de gestación trae consigo una serie de ajustes fisiológicos que afectan el metabolismo de los nutrimentos, estos ajustes varían de una mujer a otra, son complejos y cambian conforme va evolucionando la gestación. El cuerpo lúteo y la placenta secretan hormonas que influyen sobre el metabolismo.^{17,19}

Durante las décadas pasadas, muchos investigadores evaluaron la relación entre la nutrición de zinc materno y la gestación.^{50,51}

Algunas hormonas involucradas en la reproducción y desarrollo son sensibles a los *status* de zinc, la deficiencia de Zn puede afectar muchas etapas de la gestación y el crecimiento del recién nacido. Existen estudios que informan de malformaciones esqueléticas, abortos espontáneos, complicaciones durante el parto, etcétera.^{23,38,49,50}

El primer descubrimiento de la deficiencia de zinc en humanos fue en los años sesentas, y los síntomas incluían un retardo en el crecimiento, hipogonadismo, anemia, hepatoesplenomegalia y geofagia. En varias especies animales, se establece que la deficiencia de zinc fetal puede incrementar la incidencia de malformaciones en el sistema nervioso central.¹⁶

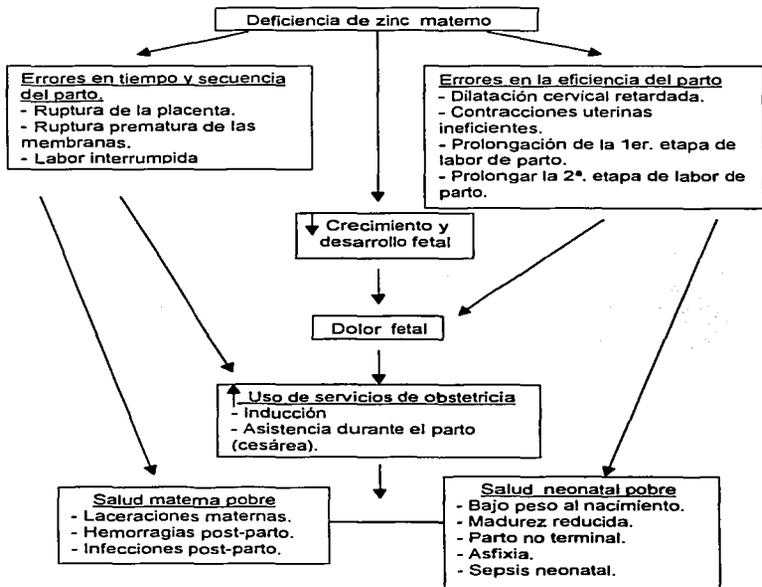


Figura 2. Consecuencias de la deficiencia de zinc materno¹⁰

Varios estudios informan que durante la etapa prenatal la concentración plasmática del zinc se distribuye a medida que progresa el embarazo con una disminución de la concentración del elemento, la explicación más plausible a este decremento es la hemodilución que por la expansión del plasma, ocurre en estas mujeres.^{18,19,20,41,55}

La deficiencia severa de zinc materno se ha asociado con aborto espontáneo y malformaciones congénitas, mientras que las formas más moderadas de deficiencia de zinc han sido asociadas con bajo peso al nacimiento (LBW), retraso del crecimiento intrauterino y parto prematuro. Se ha relacionado también con complicaciones de la labor de parto, la ruptura prematura de membranas (PROM), y la necesidad de recurrir a algún procedimiento quirúrgico.^{9,10,19,22,51}

Con base al peso total de los tejidos ganado durante el embarazo, se requiere que a la madre se le administre una concentración de zinc aproximadamente de 100 mg. Estimándose que un 57% del zinc se deposita en el feto y otro 24% se encuentra en el músculo uterino. La necesidad adicional de zinc durante el embarazo puede deberse a un incremento en el consumo de zinc o por ajustes en la homeostasis. Los ajustes homeostáticos pueden ser la principal causa por la que se puede encontrar una cantidad adicional de zinc.^{13,14}

Los estudios en animales sugieren que los cambios en la absorción de zinc intestinal puede deberse a los ajustes homeostáticos primarios en el metabolismo del zinc durante la gestación. Otro mecanismo potencial para regular el metabolismo del zinc incluye la disminución de la excreción endógena gastrointestinal, la conservación renal y la liberación del zinc del tejido materno. La concentración de zinc en orina se ve incrementado durante la gestación, aunque este disminuye durante la lactancia. Las demandas de zinc necesarias para un desarrollo fetal, pueden ser compensadas por la liberación de este micronutriente proveniente del tejido materno.^{18,21,49}

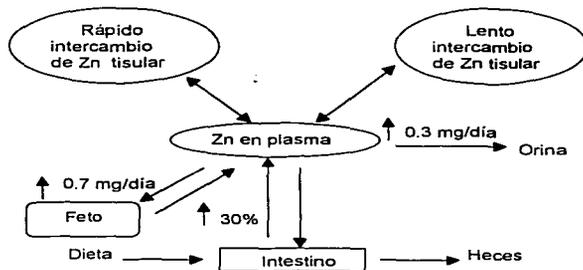


Figura 3. Modelo del metabolismo del zinc durante la gestación¹⁸

Se muestra en la figura 3 que la absorción del zinc se incrementa aproximadamente en un 30% durante la gestación. De 1 mg/día que se consume, 0.7 mg de zinc absorbido es transferido al feto. La excreción urinaria de zinc se incrementa.

En un estudio realizado en 1995 Goldenberg *et al* , encontraron un incremento en el peso al nacer y en la circunferencia cefálica en los niños en mujeres de origen africano en EUA que recibieron 25 mg de Zn al día.¹⁶

2.4 Efectos de la suplementación con zinc

El zinc ha sido considerado como un micronutriente no tóxico, siempre en dosis adecuadas, la suplementación con zinc debe realizarse empleando la cantidad mínima efectiva de Zn.¹¹

Las investigaciones realizadas por Sazawal y Penny en Bangladesh, la India, Indonesia, Pakistán y Perú han examinado los efectos terapéuticos del zinc sobre las diarreas agudas y persistentes, demostrando que la suplementación con Zn reduce los episodios diarreicos. Black sugiere que la suplementación con zinc puede prevenir infecciones respiratorias agudas y neumonía.⁵⁶

Se ha discutido el uso de suplementos de zinc en mujeres gestantes. Jameson y por su parte Swanson y King han informado que las concentraciones de zinc en las mujeres puede relacionarse con el peso de los bebés e indirectamente con la posibilidad de partos prematuros.⁵⁶

En un estudio realizado por Rosado *et al* , en niños en edad preescolar de una población rural en México, observaron que la suplementación con zinc en un periodo de doce meses, disminuye de manera significativa la morbilidad causada por enfermedades gastrointestinales.^{41,42}

Varios estudios previos realizados en el Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química, indican que la suplementación con zinc durante las etapas perinatales favorecen el incremento de algunas funciones inmunológicas. La administración oral de zinc a ratones BALB/c durante la gestación y lactancia produjo un incremento significativo en el metabolismo de los macrófagos peritoneales y en la fagocitosis; respecto a los linfocitos B se observó un incremento en la síntesis de IgM. En los linfocitos T se observó que el Zn tiene un efecto mitogénico. Se pudo observar una respuesta proliferativa máxima a concentraciones de 0.1mM de zinc y a dosis mayores resulta tóxica para las células.^{27,28,29,30,31}

3. Hipótesis del estudio

La suplementación con zinc en ratones durante la gestación, incrementará la concentración de zinc embrionario y la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales.

4. Objetivos

Objetivo general

Evaluar los efectos de la suplementación con zinc en ratones BALB/c en etapas perinatales

Objetivos particulares

- **Determinar la concentración de zinc embrionario a los 7, 14 y 21 días de gestación, en la progenie de ratones suplementados en forma oral con una concentración de 500 mg/L de Zn.**
- **Evaluar el efecto de la suplementación oral con Zn sobre el índice reproductivo.**
- **Estandarizar la técnica de eritrofagocitosis en hembras gestantes.**
- **Evaluar el efecto de la suplementación oral con zinc sobre el índice fagocítico, en las diferentes etapas de gestación.**

5. Material y métodos

5.1 Animales

Progenitores

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, hembras y machos de 22g (aproximadamente 6 semanas de edad) los cuales se alojaron por parejas en cajas de plástico con cubiertas de acero inoxidable y fondo con aserrín. Las botellas de agua tuvieron tapones de polietileno y tubos bebederos de acero inoxidable. Los animales se alimentaron *ad libitum* con alimento comercial Lab diet 5015 (PMI Foods Inc, St Louis MO, USA), con una concentración de 74 µg/g de alimento (74 ppm)

5.2 Administración del Zn

Con el propósito de estudiar los efectos de la suplementación con zinc a los 7, 14 y 21 días de gestación, los animales recibieron *ad libitum* agua de beber con 500 mg/L de acetato de zinc (Mallinckrodt, Kentucky, USA) y se dividieron en dos grupos experimentales, Tabla III.

El suplemento de zinc se les administró a los progenitores desde el día de la cruce y durante los 21 días que corresponden al periodo de gestación del modelo experimental.

5.3 Grupos de tratamiento

Los animales del grupo testigo no recibieron Zn en el agua de bebida durante el periodo de gestación. El grupo I recibió las dosis de zinc durante los 7, 14 y 21 días de gestación. Los controles respectivos se mantuvieron en las mismas condiciones pero sin recibir Zn, los controles son hembras no gestantes y machos sin cruzar.

GRUPO	CONCENTRACIÓN DE ZINC (ppm)		
	PERIODO DE GESTACIÓN		
	7 días	14 días	21 días
testigo, Zn-	0	0	0
Control	0	0	0
Grupo I, Zn+	500	500	500
Control	0	0	0

Tabla III. Grupos de tratamiento con zinc. El grupo testigo no recibió Zn durante el periodo de gestación. El grupo I recibió dosis de 500 mg/L de Zn. Los controles correspondientes no recibieron zinc, ni se cruzaron.

5.4 Métodos

5.4.1 Evaluación de la concentración de zinc embrionario

Con el objetivo de evaluar los efectos de la suplementación oral con zinc sobre el tejido embrionario y suero, se empleó la técnica de absorción atómica.

5.4.1.1 Obtención de embriones

Después de la anestesia, la hembra se sujeta en una tabla de disección y se abre toda la cavidad peritoneal, se localiza el útero y se procede a la obtención de los embriones, una vez que el embrión o feto están libres del saco vitelino y placenta, estos se pesan (balanza analítica Ohaus, Switzerland). (ver ANEXO I)

5.4.1.1.1 Digestión embrionaria

Se mantuvo el horno a temperatura constante de 100°C por 24 horas (Thermolyne Corporation Dubuque, Iowa USA). Las muestras se depositan en los vasos de 10 mL a peso constante (Pyrex, México). Se dejaron las muestras a 100°C por 24 horas, se pesaron y se registró como peso del embrión seco (balanza analítica Ohaus, Switzerland).

A cada vaso en agitación constante (parrilla con agitador Corning Stirrer/Hotplate) , se le adicionó 1 mL de ácido nítrico (JT Baker, México) y 2 mL de peróxido de hidrógeno (E Merck, Darmstadt Germany), se aforó a un volumen de 6 mL con agua desionizada , se dejó a temperatura ambiente por un día y se filtro (Papel filtro Whatman, England). Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Absorción Atómica del Departamento de Química Analítica de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM. (ver ANEXO I)

5.4.1.2 Obtención de los sueros

Se obtuvo la muestra de sangre de los animales de experimentación por punción del seno retroorbital, esta se colectó en tubos para microcentrifuga (Costar, Cambridge MA, USA). El suero se obtiene después de la centrifugación a 1000 G durante 10 min (centrifuga SOLT-BAT, México).

5.4.2 Evaluación del índice fagocítico durante la etapa de gestación

Se evaluó la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales mediante la técnica de eritrofagocitosis en las hembras de las etapas de gestación. (ver ANEXO I)

5.4.2.1 Obtención de los macrófagos

En condiciones de esterilidad se extrajeron los macrófagos del peritoneo

después de inyectar 5 mL de medio RPMI 1640 (Gibco Laboratories, NY USA) y masaje del área peritoneal por 5 minutos.

La suspensión celular se lavó dos veces por centrifugación a 250 G, 4°C durante 10 minutos. Se contó el número de macrófagos verificando una viabilidad mayor al 95% por exclusión con el colorante azul tripano (Flow Laboratories Inc, McLean VA USA) y se ajustó la concentración de la suspensión en 10^6 células/mL en medio RPMI 1640 suplementado.

El medio RPMI 1640 suplementado contenía en la concentración final lo siguiente: suero fetal bovino al 10% (Sigma Chem Co, St Louis Mo USA), L-glutamina 2 mM (Hyclone Laboratories Inc, USA), aminoácidos no esenciales al 0.5% (Gibco Laboratories, NY USA), piruvato de sodio al 0.5% (Gibco Laboratories, NY USA) y penicilina/estreptomicina 200 U/L y 100 μ g/mL (Hyclone Laboratories Inc, USA) respectivamente.

5.4.2.1.1 Técnica de eritrofagocitosis

Se utilizaron placas de poliestireno con tiras de 8 pozos (Costar, Cambridge MA, USA). Por cada animal de experimentación se ocuparon 6 pozos, colocando en cada pozo 100 μ L de la suspensión que contiene 10^6 células. Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Se lavaron las placas 2 ó 3 veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.2. A cada placa se le colocó 50 μ L de medio RPMI suplementado.

Se preparó una suspensión de eritrocitos de carnero al 1% sin opsonizar y otra suspensión de eritrocitos de carnero opsonizados al 1% en de PBS. Estos últimos se prepararon haciendo reaccionar los eritrocitos de carnero con la hemolisina, en una concentración subaglutinante (1:64), por incubación en baño maría a 37°C durante 10 minutos, ajustando la suspensión al 1%. (Ver ANEXO II)

Se le añadió a 2 pozos 30 μ L de PBS, a otros 2 pozos 30 μ L de suspensión de eritrocitos de carnero sin opsonizar y por último a 2 pozos 30 μ L de suspensión de eritrocitos de carnero opsonizados, a la placa que contenía las células adheridas en 50 μ L de medio RPMI 1640. Se incubó la placa a 37°C por 90 min en presencia de 5% de CO₂, se le dio un choque hipotónico con una solución de PBS/H₂O (3:7), y se lavó 2 veces con PBS. Se agregaron 100 μ L de una solución SDS (Sigma Chem, USA) al 0.3% en PBS, y se agitó la placa durante 10 min.

Se preparó el sustrato que contenía 2 mg de DAB (Sigma Chem, St Louis, USA), 20 μ L de peróxido de hidrógeno al 33% (E Merck, Darmstadt, Germany), en 5 mL de PBS. A cada pozo se le agregó 150 μ L del sustrato, la reacción colorimétrica se produce por la capacidad de la pseudoperoxidasa de la hemoglobina al actuar sobre H₂O₂, en presencia de DAB. Las placas se dejaron en la oscuridad por 45 minutos, posteriormente se midió la absorbancia en el lector de microplacas (BECKMAN, Biomek 1000) a una longitud de onda de 490 nm con filtro de referencia de 660 nm.

6. Resultados

6.1 Efectos de la suplementación oral con zinc sobre el peso de los progenitores.

Con el objeto de evaluar los efectos de la suplementación oral con zinc sobre el peso de los progenitores fue necesario pesarlos durante los 7, 14 y 21 días correspondientes a la gestación

1) Peso de los progenitores hembras

La figura 4 muestra el peso de las hembras a las 7, 14 y 21 días de gestación, tanto para el grupo testigo como para el grupo I.

En aquellos animales que fueron suplementados con 500 mg/L de zinc (grupo I, Zn+) hay un aumento en peso con respecto de aquellos que no recibieron el suplemento en forma oral (grupo testigo, Zn-), y con respecto a sus controles. En la figura 4 también puede observarse que al ir transcurriendo la etapa de gestación las hembras incrementan su masa corporal.

Grupos de Tratamiento	Peso de las hembras (g)			
	Días de gestación			
	0d	7d	14d	21d
Control (hembra no gestante)	22.00	22.10	24.20	27.40
Grupo testigo, Zn-	22.14	23.60	26.20	31.00
Grupo I, Zn+	22.09	25.80	30.10	38.20

Tabla IV. Peso de las hembras durante los diferentes días de gestación

2) Peso de los progenitores machos

La figura 5 muestra el peso de los machos correspondientes a los 7, 14 y 21 días de gestación, del grupo testigo y grupo I. Los animales que fueron suplementados con zinc (grupo I, Zn+) muestran un aumento en peso con respecto de aquellos que no fueron suplementados (grupo testigo, Zn-) y con respecto a sus controles.

Grupos de Tratamiento	Peso de los machos (g)			
	Días de gestación			
	0d	7d	14d	21d
Control (animal sin cruzar)	23.20	25.18	26.20	27.05
Grupo testigo, Zn-	22.90	26.10	27.20	28.00
Grupo I, Zn+	23.50	27.50	28.00	30.10

Tabla V. Peso de los machos a los diferentes días de gestación

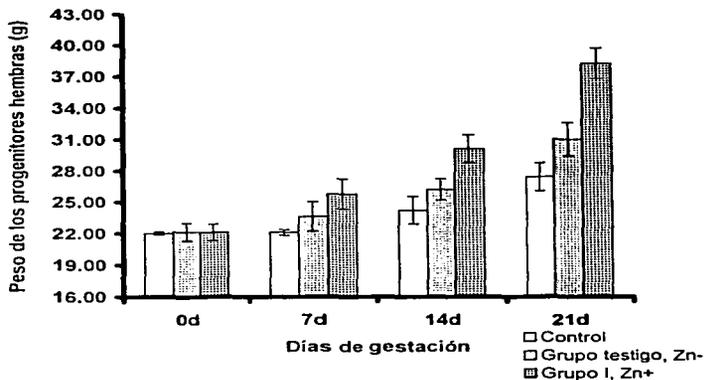


Figura 4. Peso de los progenitores hembras . El peso de las hembras que fueron suplementadas con 500 mg/L de Zn (grupo I,Zn+) muestra un incremento significativamente mayor respecto a los animales a los que no se les administró el elemento en forma oral (grupo testigo,Zn-) y sus controles.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

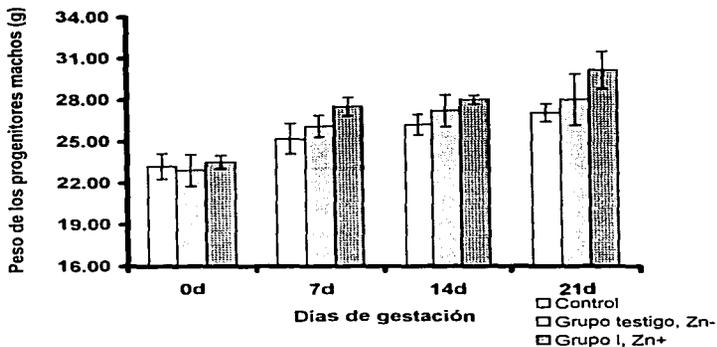


Figura 5. Peso de los progenitores machos. El peso de los machos que fueron suplementados con Zn (grupo I,Zn+) aumentó con respecto a sus controles y al grupo de animales que no fueron suplementados.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.2 Efecto de la suplementación con zinc sobre el índice reproductivo

Para evaluar el efecto del Zn sobre el índice reproductivo en la gestación, es necesario registrar el número de embriones correspondientes a ambos grupos (grupo testigo y grupo I).

En la figura 6 se puede observar como incrementa el número de embriones en los animales que fueron suplementados con Zn con respecto de aquellos que no lo fueron .

La tabla VI muestra el número de embriones obtenidos en hembras suplementadas y los animales que no recibieron el suplemento.

Días de gestación	Número de embriones	
	Grupos de tratamiento	
	Grupo testigo,Zn-	Grupo I,Zn+
7 días	8	11
14 días	9	9
21 días	6	10

Tabla VI. Número de embriones a los diferentes de días de gestación

a) Porcentaje de embriones viables y no viables

Con el objetivo de conocer el porcentaje de viabilidad embrionaria, fue necesario relacionar el número total de embriones obtenidos con respecto de aquellos embriones que fueron viables. En las figuras 7 y 8 se pueden observar los porcentajes de embriones viables y no viables, respectivamente.

La tabla VII muestra el porcentaje de embriones viables obtenidos a los 7, 14 y 21 días de gestación.

Días de gestación	Porcentaje de embriones viables	
	Grupos de tratamiento	
	Grupo testigo,Zn-	Grupo I,Zn+
7 días	92.17 %	100.00 %
14 días	92.36 %	97.78 %
21 días	79.32 %	94.00 %

Tabla VII. Porcentaje de embriones viables a los 7,14 y 21 días de gestación

La tabla VIII muestra el porcentaje de embriones no viables obtenidos a los 7, 14 y 21 días del periodo de gestación.

	Porcentaje de embriones no viables	
	Grupos de tratamiento	
Días de gestación	Grupo testigo,Zn-	Grupo I,Zn+
7 días	7.820 %	0.000 %
14 días	7.636 %	2.222 %
21 días	20.680 %	6.000 %

Tabla VIII. Porcentaje de embriones no viables a los 7, 14 y 21 días de gestación

a) Peso de cada embrión a los 7, 14 y 21 días del periodo de gestación

Una vez que se obtuvieron los embriones fue necesario pesar cada embrión correspondiente a los 7, 14 y 21 días de edad, con el fin de evaluar la influencia de zinc en el incremento de tejido embrionario.

En la figura 9 se observa un aumento en el peso del tejido embrionario a los 7, 14 días y 21 días de gestación en los animales, cuyas madres fueron suplementadas con Zn.

Grupos de Tratamiento	Peso del tejido embrionario (mg)		
	Días de gestación		
	7 días	14 días	21 días
Grupo testigo,Zn-	92.118	743.368	7871.712
Grupo I,Zn+	202.580	870.780	8564.522

Tabla IX. Peso del tejido embrionario a los 7, 14 y 21 días del periodo de gestación

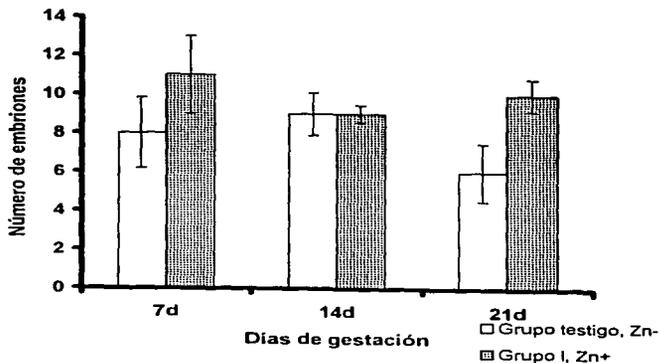


Figura 6. Efecto del zinc en el índice reproductivo. El número de embriones se incrementa en aquellas hembras que fueron suplementadas con Zn (grupo I, Zn+), con respecto a las que no fueron suplementadas en forma oral con el elemento (grupo testigo, Zn-). ($p < 0.05$)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

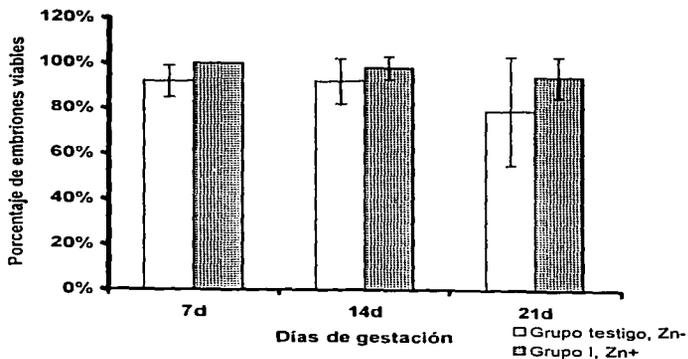


Figura 7. Porcentaje de embriones viables a los 7, 14 y 21 días de gestación. El porcentaje de embriones viables se ve incrementado cuando las madres fueron suplementadas con 500 mg/L de zinc con respecto a aquellas que no recibieron este elemento. ($p < 0.05$)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

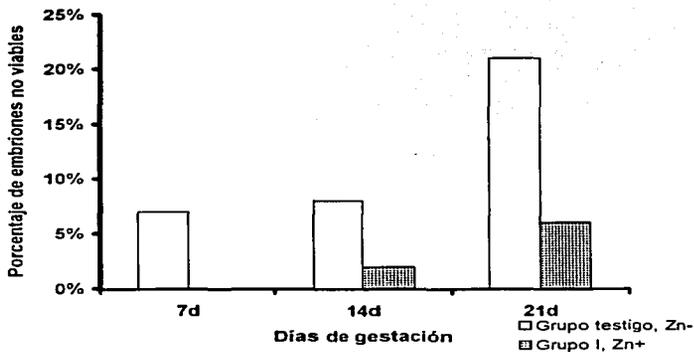


Figura 8. Porcentaje de embriones no viables a los 7, 14 y 21 días de gestación. El porcentaje de embriones no viables aumentó en el grupo que no fue suplementado con zinc con respecto al grupo que si recibió el elemento en el agua de bebida.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

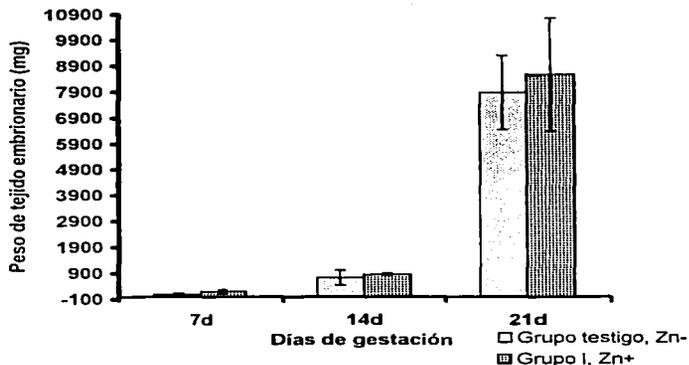


Figura 9. Peso del tejido embrionario a los 7, 14 y 21 días del periodo de gestación. El peso del tejido embrionario aumenta con el tiempo, sin embargo en la última etapa los pesos son similares. Existe un incremento en el peso del embrión cuando las madres fueron suplementadas con 500 mg/L de zinc, respecto a los embriones de madres que no recibieron este elemento. ($p < 0.05$)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.3 Concentración de zinc en el tejido embrionario

Con el objetivo de conocer la concentración de zinc en el tejido embrionario, se realizó la digestión embrionaria y determinar la concentración de Zn en ppm (partes por millón) por la técnica de absorción atómica. También fue de utilidad conocer la concentración de zinc en el útero y la placenta.

Se obtuvo la concentración de Zn en $\mu\text{g/g}$ de tejido embrionario al conocer el peso seco de cada embrión, esto es, la cantidad de Zn en ppm encontrada por absorción atómica se multiplica por el volumen final y se divide entre el peso seco de cada embrión.

a) Obtener los embriones correspondientes a los diferentes días de gestación

El procedimiento para extraer los embriones correspondientes a los 7, 14 y 21 días de gestación, implica algunas dificultades técnicas de manipulación. Las figuras 10, 11 y 12 muestran los embriones obtenidos durante el desarrollo experimental de 7, 14 y 21 días respectivamente.

b) Concentración de Zn en el tejido embrionario

La figura 13 muestra que la concentración de zinc embrionario en $\mu\text{g/g}$ es mayor en el grupo de animales que recibieron la suplementación de Zn en forma oral, a diferencia de los animales que no recibieron el suplemento. Es mayor la concentración de Zn a los 7 días, este comportamiento se aprecia en animales que no fueron suplementados y en aquellos que si lo fueron.

Días de gestación	Zn $\mu\text{g/g}$ de tejido embrionario	
	Grupos de tratamiento	
	Grupo testigo, Zn-	Grupo I, Zn +
7 días	442.270	1183.08
14 días	163.356	186.753
21 días	92.053	99.108

Tabla X. Concentración de zinc en microgramos por gramo de tejido embrionario a los 7, 14 y 21 días de gestación

c) Concentración de zinc en el útero

La figura 14 muestra la cantidad de Zn obtenida en el útero a los 21 días de hembras no gestantes (controles) tanto para el grupo testigo y I.

La tabla XI muestra la concentración de zinc en $\mu\text{g/g}$ de tejido uterino a los 21 días en hembras testigo.

	Zn $\mu\text{g/g}$ de tejido uterino	
	Grupos de tratamiento	
Órgano	Grupo testigo, Zn-	Grupo I, Zn+
Útero	65.993	90.363

Tabla XI. Concentración de zinc en el útero de 21 días

d) Concentración de zinc en la placenta

La figura 15 muestra la cantidad de zinc obtenida en la placenta de 21 días tanto para el grupo testigo y I.

La tabla XII muestra la concentración de zinc en $\mu\text{g/g}$ de tejido placentario de 21 días de gestación.

	Zn $\mu\text{g/g}$ de placenta	
	Grupos de tratamiento	
Órgano	Grupo testigo, Zn-	Grupo I, Zn+
Placenta	77.603	123.561

Tabla XII. Concentración de zinc en la placenta de 21 días



Figura 10. Fotografía correspondiente al embrión de 7 días de gestación. Puede observarse el cono ectoplacental y el huevo cilíndrico a través del microscopio, el embrión aún no se encuentra bien definido, esto puede provocar que se confunda con el tejido del útero.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

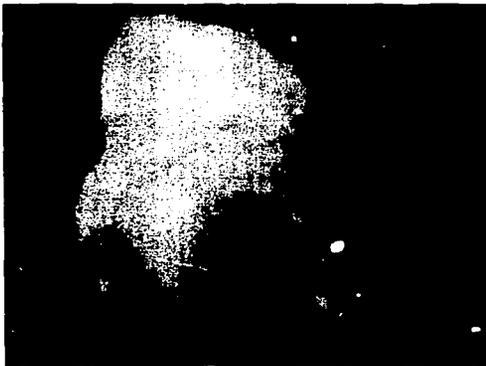


Figura 11. Fotografía correspondiente al embrión de 14 días de gestación. En el embrión de 14 días puede observarse lo que en un futuro serán las extremidades superiores e inferiores y se encuentran definidos los rasgos de la cara.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Figura 12. Fotografía correspondiente al feto de 21 días de gestación. A los 21 días los órganos y tejidos del feto ya se encuentran completamente definidos, también puede observarse como se encuentra unido el feto a la placenta por medio del cordón umbilical.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

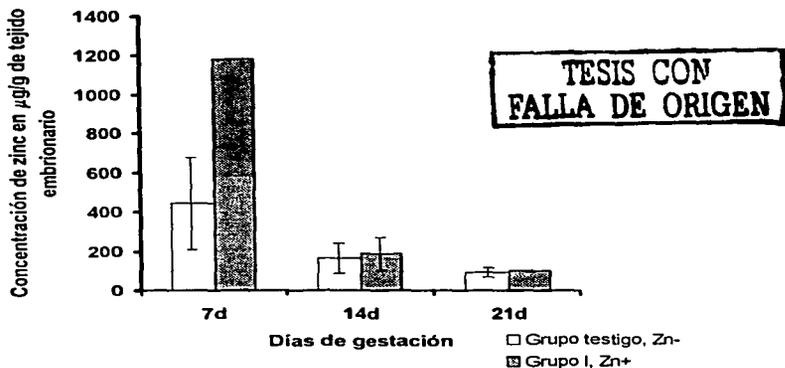


Figura 13. Concentración de zinc en microgramos por gramo de tejido embrionario. La gráfica muestra las concentraciones de Zn en el tejido embrionario a los 7, 14 y 21 días del periodo de gestación. Encontrando un incremento de zinc en el tejido de los embriones cuyas madres fueron suplementadas con 500 mg/L de Zn (grupo I, Zn+), a diferencia de aquellas que no fueron suplementadas (grupo testigo, Zn-). ($p < 0.05$)

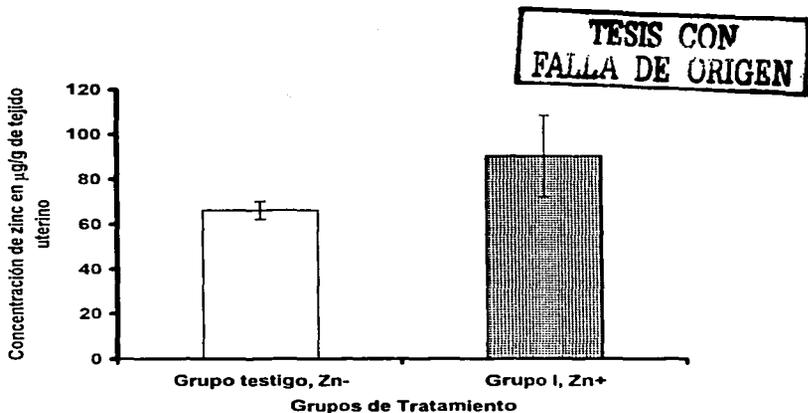


Figura 14. Concentración de zinc en microgramos por gramo de tejido uterino de 21 días. La concentración de zinc es mayor en el grupo de hembras que se les administró Zn en el agua de bebida (controles, grupo I), que en aquellas que no fueron suplementadas (controles, grupo testigo).

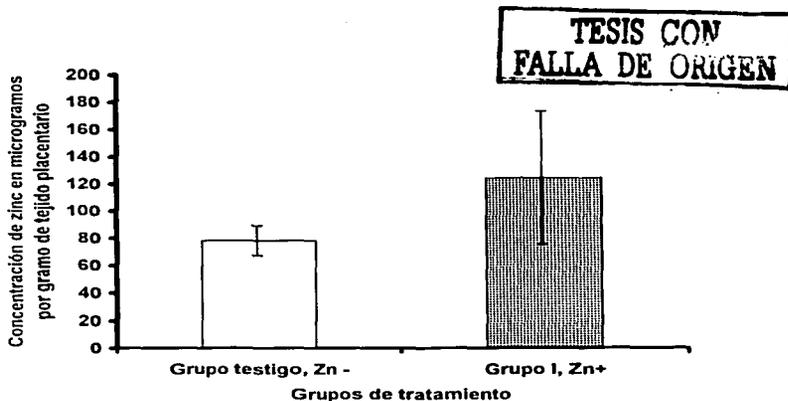


Figura 15. Concentración de zinc en microgramos por gramo de tejido placentario de 21 días de gestación. La concentración de Zn es mayor en el grupo de hembras que se les administró Zn en el agua de bebida (controles, grupo I), que en aquellas que no fueron suplementadas (controles, grupo testigo).

6.4 Efecto de la suplementación con zinc *in vivo* sobre el índice fagocítico durante la etapa de gestación.

Con efecto de conocer la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales durante la etapa de gestación se obtuvieron los macrófagos peritoneales de los progenitores, tanto hembras gestantes y machos.

a) Determinación de la capacidad fagocítica en los progenitores hembras

Los resultados se expresan como Índice fagocítico (IF), el cálculo se realizó mediante la siguiente relación:

$$IF = \frac{\text{Absorbancia de macrófagos con eritrocitos de carnero opsonizados}}{\text{Absorbancia de macrófagos con eritrocitos de carnero sin opsonizar}}$$

En la figura 16 se muestra la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales en hembras gestantes de 7, 14 y 21 días, en la cual se observa que el grupo de hembras que fueron suplementadas con Zn muestran un incremento de la capacidad fagocítica con respecto de las hembras que no fueron suplementadas.

Grupos de Tratamiento	Índice Fagocítico (IF)		
	Días de gestación		
	7d	14d	21d
Control	7.72	9.54	18.48
Grupo testigo Zn-	8.22	9.68	23.13
Grupo I, Zn+	8.95	9.91	24.21

Tabla XIII. Índice fagocítico en progenitores hembras a los 7,14 y 21 días de gestación

b) Determinación de la capacidad fagocítica en progenitores machos.

En la figura 17 se observa la capacidad fagocítica de los machos que fueron suplementados con Zn (grupo I) se ve incrementado con respecto de aquellos que no lo fueron (grupo testigo).

Grupos de Tratamiento	Índice Fagocítico (IF)		
	Periodo de gestación		
	7d	14d	21d
Control	7.99	8.12	8.07
Grupo testigo, Zn-	8.16	8.26	8.62
Grupo I, Zn+	10.84	10.88	11.01

Tabla XIV. Índice fagocítico en progenitores machos durante la gestación

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

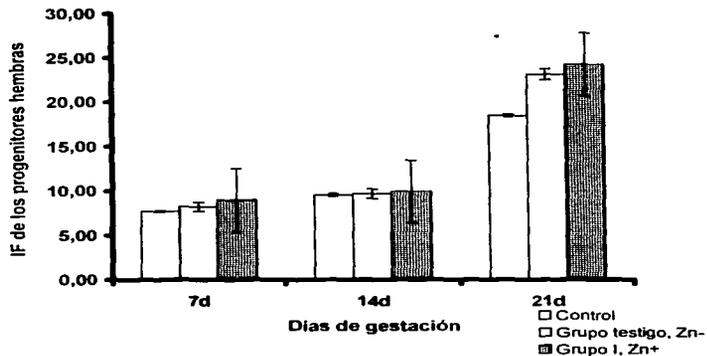


Figura 16. Índice fagocítico en progenitores hembras a los 7, 14 y 21 días de gestación. Se observa en la gráfica que el índice fagocítico es mayor en el grupo de animales suplementados con 500 mg/L de Zn, con respecto de aquellos que no recibieron el suplemento y sus controles.

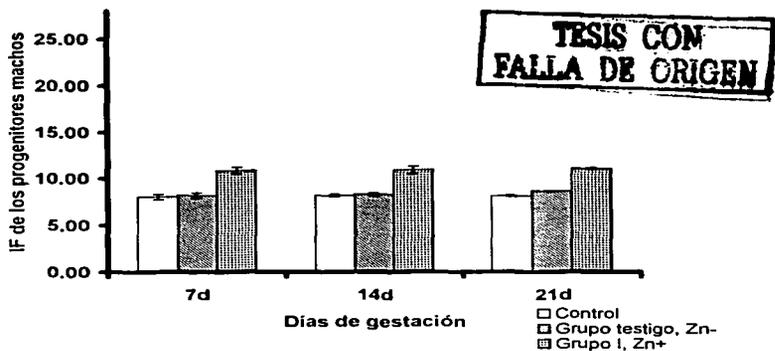


Figura 17. Índice fagocítico en progenitores machos a los diferentes días del periodo de gestación. El índice fagocítico es muy parecido tanto para el grupo control como para el grupo que no fue suplementado (grupo testigo), aunque la capacidad fagocítica esta por debajo de aquellos animales que fueron suplementados con Zn.

7. Discusión

Es de gran importancia conocer las concentraciones de zinc en las etapas de gestación, porque es un elemento que juega un papel primordial en la respuesta inmunológica. La deficiencia marginal de zinc esta presente en niños y adultos que ingieren en su dieta alimentos con alto contenido de fitatos, oxalatos y taninos que impiden una adecuada absorción de este nutrimento ^{46,47,53,55}. Los estudios realizados, en humanos, por Tamura y colaboradores mencionan que cuando existe una deficiencia de zinc hay malformaciones esqueléticas, abortos espontáneos y complicaciones durante el parto ^{50,51}. También se incrementa la susceptibilidad a una variedad de patógenos, esto es porque el zinc afecta aspectos múltiples del sistema inmune, desde las barreras de la piel hasta la regulación genética de los linfocitos. Black sugiere que la suplementación con zinc puede prevenir infecciones respiratorias. Rosado y colaboradores sugieren de la suplementación con zinc disminuye los episodios diarreicos.⁴²

Es también importante reconocer la influencia de los niveles de zinc, tanto en la gestación como en la repercusión en un parámetro inmunológico como es el IF, el cuál ha sido estudiado previamente en ratones durante las etapas perinatales en ratones BALB/c.

En nuestro estudio se observó que el índice fagocítico aumentó significativamente en los animales que recibieron Zn en el agua de bebida, tanto en hembras como en machos, comparándolos con su control y con el grupo de animales que no recibieron el suplemento. Beach, Fraker, Salgueiro, entre otros investigadores, mencionan que el zinc es un elemento esencial en la respuesta inmune, provocando un incremento notable como en este caso, en la capacidad fagocítica del macrófago ^{6,8,15,46,47}. Los resultados anteriores permiten complementar los estudios realizados previamente por Lastra y colaboradores en las etapas de gestación, lactancia y destete.³⁰

Una de las observaciones que se hicieron en estos experimentos fue el número de embriones, tanto en hembras suplementadas como en aquellas que no recibieron este elemento. La cantidad de embriones es mayor en las hembras que fueron suplementadas con Zn. Esto nos hace considerar que el zinc esta interviniendo en el proceso reproductivo, provocando que exista esta diferencia. Aunque el mecanismo por el cual intervienen el Zn en la reproducción aún no es totalmente claro.

En lo que respecta al porcentaje de viabilidad embrionaria se observa que el mayor porcentaje de viabilidad se presentó en el grupo I, Zn+, respecto del grupo testigo, Zn-. La viabilidad embrionaria había sido observada anteriormente en las investigaciones realizadas por Beach donde se muestra que el número de crías viables por hembra es significativamente más bajo en las hembras deficientes en zinc, al compararlas con las hembras testigo.⁷

Los datos obtenidos nos sugieren que el zinc está interviniendo en el desarrollo del embrión, es decir, favorece un óptimo desarrollo fetal. El número de embriones contabilizados son embriones viables, únicamente.

El peso del tejido embrionario en las diferentes etapas de la gestación, va en aumento a medida que avanza el tiempo, sin embargo al final, los pesos son similares; aunque cabe señalar que el grupo de hembras que fue suplementado, presenta mayor cantidad de tejido embrionario respecto al grupo que no recibió el suplemento; esto se puede observar a los 21 días de gestación. En las investigaciones realizadas por Caulfield, entre otros, se relaciona la deficiencia de Zn con un bajo peso del recién nacido¹⁰, también Tamura menciona que el peso del recién nacido aumenta, en animales a cuyas madres fueron se les administró Zn^{50,51}. Lo anterior nos hace suponer que el feto requiere del Zn en la última etapa de su desarrollo que es cuando aumenta su peso.

La concentración de zinc en microgramos por gramo de tejido embrionario aumenta en el grupo testigo Zn-, esto puede atribuirse a un mecanismo fisiológico, es decir, los ajustes homeostáticos pueden ser la causa principal por la cual hay una cantidad de zinc adicional^{18,19}. En lo que respecta al grupo I, Zn+ la concentración de zinc embrionario es mayor respecto al grupo testigo, Zn-, ya que las madres absorben el zinc y lo proporcionan al embrión, en el cual debe de estar involucrado un mecanismo fisiológico.

En los estudios realizados por King y colaboradores, se menciona que un 57% del zinc consumido se deposita en el feto y otro 24% se encuentra en músculo uterino, es por eso que es importante conocer la concentración de zinc en el tejido uterino¹⁸. Las concentraciones de zinc uterino en hembras tratadas es mayor que en aquellas hembras que no recibieron Zn, el útero es el órgano en el cual se lleva a cabo el desarrollo embrionario y fetal.

En lo que respecta al tejido placentario, la concentración de Zn se incrementa en las hembras tratadas con respecto de aquellas hembras que no recibieron zinc, esto se debe a que la placenta pasa sustancias nutritivas necesarias, para el desarrollo del embrión o feto, de la circulación materna a la fetal.¹⁹

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la suplementación oral con zinc favorece el crecimiento y desarrollo embrionario al igual que el incremento de capacidad fagocítica en las hembras gestantes de la cepa BALB/c. Sin embargo es necesario realizar estudios posteriores para establecer que otros efectos en la gestación pueden verse favorecidos con la administración de Zn y así poder establecer suplementos orales con zinc en dosis y períodos específicos que puedan tener un efecto benéfico en la gestación y en las etapas perinatales.

8. Conclusiones

- El índice fagocítico se incrementó en aquellos animales que recibieron 500 mg/L de zinc, tanto en hembras como en machos.
- En este trabajo se demuestra que la suplementación con 500 mg/L de zinc provocó un incremento en el índice reproductivo durante el periodo de gestación y el porcentaje de viabilidad embrionaria se incrementó en aquellas hembras que recibieron Zn.
- Los embriones que tienen un mayor peso de tejido embrionario son aquellos cuyos progenitores fueron suplementados con 500 mg/L de Zn. La concentración de zinc embrionario aumento en aquellos embriones, cuyos progenitores recibieron Zn en el agua de bebida.
- La concentración de zinc tanto en útero como en placenta aumentó en aquellos animales pertenecientes al grupo I, Zn⁺ con respecto del grupo testigo, Zn⁻.

ANEXO I

Obtención de embriones

Se anestesia al animal de experimentación



Se sujeta por la piel de la nuca



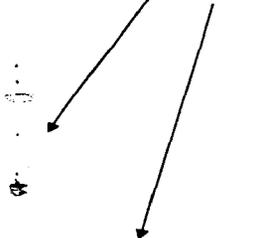
Obtención de sangre vía retroorbital



Se separa el suero del paquete celular



Se centrifuga a 1000 G, 10 min



Se guarda el suero a -70°C

Se guardan las muestras a -70°C



Se obtienen los embriones libres del tejido de la madre



Se sujeta la hembra a la tabla de disección



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DIGESTIÓN EMBRIONARIA

Se enciende el horno a -100°C



Se introducen los vasos al horno y se dejan 24 horas



Se pesan los vasos (peso constante)

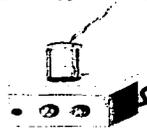
Se colocan las muestras en cada vaso



Se pesan los vasos y se introducen en el horno a 100°C , 24 horas

Se realiza la digestión embrionaria con 1 mL de HNO_3 y 2 mL de H_2O_2

Pesar cada vaso y registrar el peso



Llevar las muestras al Laboratorio de Absorción Atómica del Departamento de Química Analítica de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM



Se afora a 6 mL con agua desionizada y se deja reposar. Posteriormente se filtra

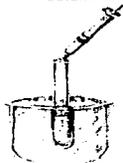
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ERITROFAGOCITOSIS

Se obtienen los macrófagos con RPMI 1640, del área peritoneal



Se coloca en baño de hielo la suspensión celular



Se centrifuga a 250 G, 10 min

Se incuba la placa a 37°C en presencia de 5% de CO₂, 24 horas

Se adiciona a cada pozo 100 µL de la suspensión celular

Se ajusta la concentración a 10⁶ cel/mL en medio RPMI 1640

Se lava la placa con PBS y se adiciona 50 µL de medio RPMI suplementado a cada pozo

A 2 pozos se le adicionaron 30 µL de PBS, a otros 2 pozos 30 µL de SRBC sin opsonizar y a otros 2 pozos 30 µL de SRBC opsonizados

Adicionar a cada pozo 100 µL de una solución de SDS a 0.3% y se agita 10 minutos

Se da un choque hipotónico con PBS/ H₂O

Se incuba la placa 90 min a 37°C en presencia de 5% de CO₂

Se añade a cada pozo 150 µL de sustrato

Se deja la placa en la oscuridad 45 min.

Se mide la absorbancia en el lector de microplacas a una longitud de onda de 490 nm y un filtro de 660 nm



ANEXO II

Reactivos empleados en la técnica de eritrofagocitosis

Amortiguador salino de fosfatos (PBS) 0.15 M pH 7.2

- NaCl (R.A., Química Barsa, Lote 84-345)
- KCl (R.A., Química Dinámica, Lote No. B15-6)
- Na_2HPO_4 (J.T. Baker, México, Lote 301904)
- KH_2PO_4 (Técnica Química, México)
- Agua desionizada

NaCl	8.000g
KCl	0.200g
Na_2HPO_4	0.993g
KH_2PO_4	0.300g
H_2O desionizada c.b.p.	1000mL

Pesar los reactivos, se disuelven y se realiza el aforo en un frasco limpio. Medir el pH

Azul tripano 1:10

- Azul tripano (Flow Company McLean, No. cat 16-910-49)
- Solución salina isotónica

La dilución se realiza 1:10, es decir, 1mL de azul tripano y 9 mL de solución salina isotónica.

PBS / H_2O (3:7)

- Amortiguador de fosfatos salino 0.15 M y pH 7.2
- Agua desionizada

La dilución es de 3:7, se miden 3 mL de PBS y 7 mL de agua desionizada, se depositan en un tubo de ensaye y se mezclan perfectamente.

SDS / PBS 0.3%

- Dodecil sulfato de sodio (sigma Chem, USA, No. cat L-4509)
- Amortiguador salino de fosfatos

Se pesan 0.03 g de SDS y se depositan en un tubo de ensaye y se disuelve en 10mL de PBS. Se mezcla perfectamente evitando la formación de espuma.

Sustrato

- Amortiguador salino de fosfatos 0.15 M y pH 7.2
- Peróxido de hidrógeno (E Merck D-6100, Darmstadt, F.R. Germany)
- 3,3'-diaminobencidina (Sigma Chem, St Louis USA, No. cat D5637)

Peróxido de hidrógeno	20 µL
3,3'-diaminobencidina	2 mg
PBS	5mL

Se mezclan todos los reactivos hasta que la diaminobencidina se haya solubilizado. Preparar 10 minutos antes de su uso.

Suspensión de eritrocitos de carnero al 1% opsonizados y sin opsonizar

- 1.- Se toma una pequeña alicuota de los eritrocitos de carnero (aproximadamente 4 mL)
- 2.- Se centrifuga la sangre a 1000 G durante 10 minutos, pasado este tiempo con ayuda de una pipeta pasteur se retira todo el sobrenadante y se homogeniza el paquete de glóbulos rojos.
- 3.- Al paquete de glóbulos rojos se le adiciona 5mL de PBS y se centrifuga a 1000 G durante 10 minutos, se retira el sobrenadante y se vuelve a resuspender en 5 mL de PBS y se vuelve a centrifugar, con el fin de lavar los eritrocitos .Este proceso se repite hasta que el sobrenadante sea más claro.
- 4.- Se retira el sobrenadante quedando solo el paquete de glóbulos rojos. Se mide 0.1 mL del paquete de eritrocitos y se depositan en un tubo de ensaye, se adiciona 10 mL de PBS y se resuspende perfectamente (eritrocitos de carnero al 1% sin opsonizar)
- 5.- Se prepara la dilución de la hemolisina (anticuerpo anti-eritrocito de carnero) de la siguiente manera: se miden 100µl de hemolisina y se depositan en un tubo que contiene 6.2 mL de PBS y se mezcla. Se miden 5 mL y se depositan en otro tubo de ensaye el cual ya tiene previamente 50µl de eritrocitos de camero previamente lavados. Se mezcla y se incuba a 37°C por 10 minutos.
- 6.- Después de que transcurrió este lapso de tiempo, se centrifuga a 1000 G por 10 minutos, se decanta y el paquete de eritrocitos se resuspende en 5mL de PBS y se vuelve a centrifugar . Finalmente se decanta el sobrenadante y se resuspende en 5 mL de PBS (eritrocitos de carnero al 1% opsonizados)

Nota: Es necesario que la suspensión de eritrocitos se realice el mismo día que se vaya a utilizar.

REFERENCIAS

1. Aguilar AE: efectos del zinc en la producción de la Interleucina 1 y el Factor de necrosis tumoral por macrófagos de ratones BALB/c, **Tesis de Doctorado, ENCB, IPN, 2000**
2. Allen Lindsay: Zinc and micronutrient supplements for children, **Am J Clin Nutr, 69(suppl): 495s-498s, 1998**
3. Allen L, Rosado J, Casterline J, Martínez M, López P, Muñoz E, Black A: Vitamin B-12 deficiency and malabsorption are highly prevalent in rural Mexican communities, **Am J Clin Nutr, 62: 1013-1019, 1995**
4. Andrews G, Geiser J: Expression of the mouse metallothionein-I and -II genes provides a reproductive advantage during maternal dietary zinc deficiency, **J Nutr, 129: 1643-1648, 1999**
5. Arck P, Ferrick D, Steele-Norwood D, Egan P, Croitoru K, Carding S, Dieltz J, Clark D: Murine T cell determination of pregnancy outcome, **Cell Immunol, 196: 71-79, 1999**
6. Beach R, Gershwin M, Hurley L: Gestational zinc deprivation in mice: persistence of immunodeficiency for three generations, **Science, 218: 469-471, 1982**
7. Beach R, Gershwin M, Hurley L: Reversibility of development retardation following murine fetal zinc deprivation, **J Nutr, 112: 1169-1181, 1982**
8. Beach R, Gershwin M, Makishima R, Hurley L: Impaired immunologic ontogeny in postnatal zinc deprivation, **J Nutr, 110: 805-815, 1980**
9. Brandão-Neto J, Stefan V, Mendoca B, Bloise W, Castro A: The essential role of zinc growth, **Nutr Res, 15: 335-358, 1995**
10. Caulfield L, Zavaleta N, Shankar A, Meriaidi M: Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival, **Am J Clin Nutr, 68(suppl): 499s-508s, 1998**
11. Chandra RK: Nutrition and the immune system: an introduction, **Am J Clin Nutr, 66: 460s-463s, 1997**
12. Christian P, West K: Interactions between zinc and vitamin A: an update, **Am J Clin Nutr, 68(suppl): 435s-441s, 1998**
13. Egan C, Smith F, Houk R, Serfass R: Zinc adsorption in women: comparison of intrinsic and extrinsic stable-isotope labels, **Am J Clin Nutr, 53: 547-553, 1991**
14. Fragoso G, Lastra MD, Aguilar AE; Pastelin R, Rosas G, Meneses G, Sciuotto E, Lamoyi E: Effect oral zinc supplementation upon *Taenia crassiceps* murine cysticercosis, **J Parasitol, 87(5): 1034-1039, 2000**
15. Fraker P.J, King LE, Laakko T, Vollmer TL: The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status, **J Nutr, 130: 1399s-1406s, 2000**
16. Goldenberg R, Tamura T, Negggers Y, Copper R, Johnston K, DuBard M, Hauth J: The effect of zinc supplementation on pregnancy outcome, **JAMA, 274: 463-468, 1995**
17. Hunt I, Murphy N, Cleaver A, Faraji B, Swendseid M, Browdy B, Coulson A, Clark V, Settlege R, Smith J: Zinc supplementation during pregnancy in low-outcome teenagers of Mexican descent effects on selected blood constituents and on progress and outcome of pregnancy, **Am J Clin Nutr, 42: 815-828, 1985**

18. King J: Determinants of maternal zinc status during pregnancy, **Am J Clin Nutr**,**71(suppl)**: 1334s-1343s,**2000**
19. King J: Physiology of pregnancy and nutrient metabolism, **Am J Clin Nutr**,**71(suppl)**: 1218s-1225s,**2000**
20. King J: Effect of reproduction on the bioavailability of calcium, zinc and selenium, **J Nutr**,**131**: 1355s-1358s,**2001**
21. King J, Shames D, Woodhouse L: Zinc homeostasis in humans, **J Nutr**,**130**: 1360-1366,**2000**
22. Korje J, Ladipo O: Nutrition and obstructed labor, **Am J Clin Nutr**,**72(suppl)**: 291s-297s,**2000**
23. Kotiranta-Ainamo K, Apajasalo M, Pohjavuori M, Rautonen N, Rautonen J: Mononuclear cell subpopulations in preterm and full-term neonates: independent effects of gestational age, neonatal infection, maternal pre-eclampsia, maternal betamethason therapy, and mode of delivery, **Clin Exp Immunol**,**115**: 309-314,**1999**
24. Krebs NF: Zinc supplementation during lactation, **Am J Clin Nutr**,**68(suppl)**: 509s-512s,**1998**
25. Krebs NF: Bioavailability of dietary supplements and impact of physiologic state: infants, children and adolescents, **J Nutr**,**131**: 1351s-1354s,**2001**
26. Ladipo O: Nutrition in pregnancy: mineral and vitamin supplements, **Am J Clin Nutr**,**72(suppl)**: 280s-290s,**2000**
27. Lastra MD, Aguilar AE, Pastelin R, Herrera M, Orihuela VD: Increment of immune response in mice perinatal stages after zinc supplementation, **Arch Med Research**,**28**: 67-72,**1996**
28. Lastra MD, Aguilar AE, Pastelin R, Monroy B: Zn effects on phagocytic responses during certain stages of ontogeny in mice, In: Colley Ph, Carbello J, Domingo JL, Etienne JC (Eds) **Metal Ions and Biology and medicine, John libbey, Eurotext, Paris**,**4**: 387-389,**1996**
29. Lastra MD, Heras M, Saldivar L, Valiente L, Pastelin R, Aguilar AE: Effects of zinc supplementation on the thymic index, In: Colley Ph, Carbello J, Domingo JL, Etienne JC (Eds) **Metal Ions and Biology and medicine, John libbey, Eurotext, Paris**,**5**: 418-422,**1998**
30. Lastra MD, Pastelin R, Camacho A, Monroy B, Aguilar AE: Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response, **J Trace Elem Med**,**15**: 5-10,**2001**
31. Lastra MD, Aguilar AE, Humanez K, Hernández R, Pastelin R: Zinc effects over IL-12 gene expression and IL-12 protein secretion in mice macrophages, In: Colley Ph, Carbello J, Domingo JL, Etienne JC (Eds) **Metal Ions and Biology and medicine, John libbey, Eurotext, Paris**,**7**: 492-494,**2002**
32. Lowe N, Woodhouse L, Wee J, King J: Short-term zinc kinetics in pregnant rats fed marginal zinc diets, **J Nutr**,**129**: 1020-1025,**1999**
33. Martínez E, Solé J, Arola LI, Mas A: Changes in plasma copper and zinc during rat development, **Biol Neonate**,**64**: 47-52,**1993**
34. Michel I, Lavigne C, Desroisiers T: Soluble and lipid-bound calcium and zinc during processing of infant milk formulas, **Journal of Food Science**,**58**: 756-760,**1993**

35. Miller M: Immune-inflammatory response in the human neonate, **Am J Pediatr Hematology/Oncology**,**3**: 199-203,**1981**
36. Pastelin R, Aguilar AE, Cabañas M, Lastra MD: Zinc role on macrophages interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha secretion during mice perinatal stages, **Metal Ions and Biology and medicine, John Libbey, Eurotext, Paris**,**6**: 747-750,**2000**
37. Prasad AS: Zinc and immunity, **Mol Cell Biochem**,**188**: 63-69,**1998**
38. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E: Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions, **Cell Immunol**,**196**: 122-130,**1999**
39. Ridge JP, Fuchs E, Matzinger P: Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells, **Science**,**271**: 1723-1726,**1996**
40. Rink L, Kirchner H: Zinc-altered immune function and cytokine production, **J Nutr**,**130**: 1407s-1411s,**2000**
41. Rosado J: Deficiencia de zinc y sus implicaciones funcionales, **Salud Pública Mex**,**40**: 181-188,**1998**
42. Rosado J, López P, Muñoz E, Martínez H, Allen L: Zinc supplementation reduced morbidity, but neither zinc nor iron supplementation affected growth or body composition of Mexican preschoolers, **Am J Clin Nutr**,**65**: 13-19,**1997**
43. Rush, David: Nutrition and maternal mortality in the developing world, **Am J Clin Nutr**,**72(suppl)**: 212s-240s,**2000**
44. Ruz M, Castillo C, Lana X, Codoceo J, Rebolledo A, Atalah E: 14-mo zinc-supplementation trial in apparently healthy Chilean preschool children, **Am J Clin Nutr**,**66**: 1406-1413,**1997**
45. Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T: Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia, **Clin Exp Immunol**,**117**: 550-555,**1999**
46. Salgueiro M, Zubillaga M, Lysioneck A, Sarabia M, Caro R, De Paoli T, Hager A, Weill R, Boccio J: Zinc as an essential micronutrient: a review, **Nutr Res**,**20**: 737-755,**2000**
47. Salgueiro M, Zubillaga M, Lysioneck A, Cremaschi G, Golman C, Caro R, de Paoli T, Hager A, Weill R, Boccio J: Zinc status and immune system relationship, **Biol Trace Elem Res**,**76**: 193-205,**2000**
48. Shankar A, Prasad A: Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection, **Am J Clin Nutr**,**68(suppl)**: 447s-463s,**1998**
49. Sian L, Krebs NF, Westcott JE, Fengliang L, Tong L, Miller L, Sonko B, Hambridge: Zinc homeostasis during lactation in a population with a low zinc intake, **Am J Clin Nutr**,**75**: 99-103,**2002**
50. Tamura T, Goldenberg R, Freeberg L, Cliver S, Cutter G, Hoffman H: maternal serum folate and zinc concentrations and their relationships to pregnancy outcome, **Am J Clin Nutr**,**56**: 365-370,**1992**
51. Tamura T, Goldenberg R, Johnston K, Du Bard M: Maternal plasma zinc concentrations and pregnancy outcome, **Am J Clin Nutr**,**71**: 109-113,**2000**

52. Tuttle S, Aggett P, Campbell D, MacGillivray I: Zinc and copper nutrition in human pregnancy: a longitudinal study in normal primigravidae and in primigravidae at risk of delivering a growth retarded baby, **Am J Clin Nutr**,**41**: 1032-1041,1985
53. Valle BL,Falchuck K: The biochemical basis of zinc physiology, **Physiol Rev**,**73**: 79-117,1993
54. Van Raaji J, Schonk C, Vermaat-Miedema S, Peek M, Hautvast J: Energy cost of lactation, an energy balances of well-nourished Dutch lactating women: reappraisal of the extra energy requirements of lactation, **Am J Clin Nutr**,**53**: 612-619,1991
55. Vega L: Papel del zinc en la nutrición, **Rev Mex Pediat**,**62**: 157-164,1995
56. Walsh CT, Sandtead HH, Prasad AS, Newberne PM, Fraker P. Zinc health effects and research priorities for the 1990s, **Environ Health Perspect**,**102**: 5-46,1994