



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ZINC
EN LA CONCENTRACIÓN DEL ELEMENTO EN SUERO Y
TEJIDOS DE RATONES BALB/c

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA-FARMACÉUTICA-BIÓLOGA

P R E S E N T A:

AIDEE ANDREA SORIANO ÁVILA



MÉXICO, DF.

2007



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: Profa. María Dolores Lastra Azpilicueta

Vocal: Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre

Secretario: Profa. Maria Elena Castilla Madrigal

1er Suplente: Prof. José de Jesús García Valdez

2do Suplente: Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

Asesor del tema:

Profa. María Dolores Lastra Azpilicueta



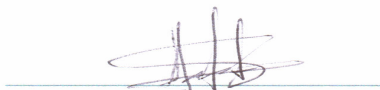
Supervisor Técnico:

Profa. Ana Esther Aguilar Cárdenas



Sustentante:

Aidee Andrea Soriano Ávila



AGRADECIMIENTOS:

A Dios por su amor y fortaleza que día a día me brindó y lo que falta por enseñarme.

A mi mamá por brindarme la oportunidad de vivir y ser quien soy.

A la Profra Ma Dolores Lastra por su asesoramiento y consejos para la realización de este proyecto.

A la Dra Ana Esther Aguilar por su paciencia, comprensión, guía y estímulo ante las adversidades en el desarrollo de este trabajo.

*A Miguel Ángel porque creíste en mí, siempre recibí tu apoyo y amor incondicional.
Te amo.*

ÍNDICE

Resumen.....	v
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 Los elementos traza.....	2
2.2 El zinc como micronutriente y su biodisponibilidad.....	3
2.3 El zinc y el sistema inmune.....	5
2.4 El zinc en la gestación.....	8
2.5 La suplementación de zinc en el embarazo.....	12
2.6 El timo y el bazo en la gestación.....	13
2.7 Cuantificación del zinc en tejidos celulares mediante absorción atómica con flama.....	15
2.8 El zinc y otras investigaciones realizadas en el laboratorio de Investigación de Inmunología de la Facultad de Química.....	16
3. Justificación del estudio e hipótesis.....	18
4. Objetivos.....	19
5. Material y estrategia experimental.....	20
7. Resultados.....	23
8. Discusión y Conclusiones.....	34
9. Bibliografía.....	39

RESUMEN

El zinc es un elemento traza esencial para el organismo ya que esta involucrado en una gran variedad de funciones celulares además de su amplia participación en el sistema inmune; diversos estudios han comprobado la importancia de este elemento en la disminución de enfermedades crónicas, procesos inflamatorios y en efectos reversibles en el crecimiento. Sin embargo la deficiencia de este micronutriente incrementa la susceptibilidad a diversos agentes infecciosos: virus, bacterias y parásitos. El uso de suplementos enriquecidos con zinc se ha sugerido para mejorar diferentes funciones en el organismo, principalmente en la respuesta inmune. Una dieta deficiente de zinc es común en países en desarrollo, donde la población consume cereales y leguminosas que a pesar de que contienen zinc, su biodisponibilidad es deficiente.

De acuerdo a estudios realizados en el Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química, los requerimientos de zinc son elevados durante la preñez y la lactancia, debido a que este micronutriente tiende a disminuir durante estas etapas. En el cuerpo humano se hace necesario cuantificar los niveles de zinc en células o tejidos, principalmente aquellos que juegan un papel importante en el sistema inmune. En la etapa de gestación los requerimientos nutricionales de la madre son elevados así, los niveles de zinc en suero se modifican durante este periodo, de tal manera, en diferentes proyectos se cuantificó la concentración del elemento en diferentes tejidos celulares en un modelo murino.

Considerando los resultados obtenidos en los proyectos realizados en el Laboratorio de Investigación en Inmunología, en este protocolo se trabajó con ratones hembras BALB/c en gestación divididos en 3 grupos experimentales: I, II y III correspondientes a la 1°, 2° y 3° semanas de gestación, los cuales fueron suplementados con zinc considerando además sus respectivos controles. En cada grupo se emplearon 30 animales y se obtuvieron muestras de suero y células para la cuantificación de zinc mediante absorción atómica con flama. Así mismo se registró el peso del bazo y el timo de la madre para

obtener el índice esplénico y tímico respectivamente. La compilación de los datos permitió relacionarla con lo reportado en la bibliografía y así mismo obtener información bajo las condiciones experimentales en el Laboratorio.

Los resultados conseguidos confirmaron la importancia del zinc como suplemento en la dieta y su efecto en diversas células o tejidos que mantienen una importante participación con el sistema inmune en etapas perinatales y durante el embarazo.

INTRODUCCIÓN

El zinc es un micronutriente que además de sus múltiples funciones en el crecimiento y desarrollo es indispensable en el mantenimiento de una respuesta inmune óptima. La deficiencia de zinc en animales experimentales en gestación limita el crecimiento fetal y si esta deficiencia es severa, causa anomalías teratogénicas. La suplementación con zinc disminuye la severidad de los procesos infecciosos, las diarreas, la neumonía, infecciones respiratorias bajas agudas, enfermedades respiratorias, mejoramiento en la atrofia del crecimiento, etc. En la gestación puede disminuir el trabajo de parto prolongado, retardo en el crecimiento intrauterino, teratogénesis y muerte embrionaria o fetal, por lo que pequeñas cantidades de zinc son necesarias para prevenir estas alteraciones.

Lo más trascendental de la deficiencia de zinc en el embarazo es el hecho de que algunas inmunodeficiencias pueden persistir en subsecuentes generaciones, lo cual se ha demostrado en ratones.

En el presente protocolo se analizó el comportamiento de la concentración de zinc en diferentes tejidos murinos, en aquellos animales suplementados con

zinc se observó un aumento en la concentración de este elemento en el hígado, el bazo, el timo, así como en el suero.

Por otro lado, durante la etapa gestacional, se cuantificó la concentración de zinc en el suero y en células de bazo (esplenocitos). En el transcurso de la gestación se observó un aumento en los niveles de zinc en el suero y en los esplenocitos de aquellos animales que recibieron suplemento con respecto al grupo sin suplemento de zinc. De tal manera, la cuantificación de zinc en los esplenocitos y en el suero del grupo que recibió suplemento se advirtió la misma tendencia a incrementar durante la gestación.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el aumento de la concentración de zinc en el suero y los esplenocitos en el grupo con suplemento de zinc incrementa la capacidad funcional de las células que participan en el sistema inmune durante la gestación, lo cual ofrece ventajas en aquellas personas deficientes de zinc durante la gestación.

En la misma etapa se calculó el índice tímico y esplenico en el timo y el bazo respectivamente. Ambos parámetros son indicadores del *status* inmunológico en un organismo. El índice tímico disminuía conforme transcurrían las semanas de gestación y el índice esplénico se observó un aumento en la segunda semana de gestación para los dos grupos de tratamiento. Sin embargo, en la última semana de gestación el índice tímico y el índice esplénico se observó una disminución negativa debido a un aumento en el peso de la madre. Sin embargo no existe suficiente información bibliográfica con respecto al papel de estos órganos y su relación en la etapa gestacional; no obstante, se deduce que juegan un papel importante al mediar la respuesta del sistema inmune de la madre hacia el producto durante la gestación.

La suplementación de zinc durante este periodo puede resultar eficiente para aquellos grupos con deficiencia de este micronutriente, al favorecer las capacidades funcionales de las células que participan en el sistema inmune. En cuanto al papel que juegan el timo y el bazo en la gestación es necesario realizar diversos protocolos y conocer la función que desempeña el zinc.

ANTECEDENTES

2.1 Los elementos traza

Los elementos traza o micro nutrientes son alimentos ingeridos en pequeña cantidad que participan en el metabolismo así, el conocimiento de la concentración corporal es de gran importancia. Una adecuada nutrición mineral y en particular de elementos traza se considera como uno de los pilares básicos sobre el que se apoya un estado de salud favorable. Los micronutrientes se encuentran en concentraciones inferiores al 0.01% de la masa corporal. De los 15 elementos traza que se consideran esenciales en la nutrición de los mamíferos, solo 9 de los mismos tienen realmente importancia en la clínica humana: cromo (Cr), cobre (Cu), flúor (F), hierro (Fe), yodo (I), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), selenio (Se) y zinc (Zn). ^{(1)Gonzalez 1996}

La deficiencia de elementos traza en humanos puede ser debido a una inadecuada ingesta del micronutriente en la dieta o una disminución o daño en la absorción aún en presencia de una alimentación balanceada. Los requerimientos dietéticos de los micronutrientes durante el desarrollo son pequeños, sin embargo las consecuencias de un desequilibrio en la ingesta de los mismos se manifiesta en el transcurso del crecimiento. ^{(2)Ashworth 2001 (3)Rink 2001}

En el presente trabajo de investigación nos avocaremos al estudio sólo de uno de los micronutrientes esenciales como lo es el zinc, ya que participa de manera importante en el crecimiento y desarrollo intrauterino y posnatal, por lo que, su estudio durante el embarazo merece especial atención.

2.2 El zinc como micronutriente y su biodisponibilidad

El zinc está presente en los seres vivos como Zn^{2+} (zinc divalente), unido a las proteínas celulares tiene una alta afinidad por los electrones, permitiendo interacciones con algunos aminoácidos especialmente aquellos que contienen átomos de sulfuro y nitrógeno (la cisteína e histidina), permitiendo al zinc

atravesar regiones con y entre los polipéptidos y modificar la estructura y función de proteínas terciarias. ⁽⁴⁾Shankar 1998

El zinc es cofactor de más de 300 enzimas siendo importante en la integridad y la modulación de la actividad de las mismas. Por estas razones la proliferación celular es estrictamente zinc-dependiente y sin la presencia del zinc en los sistemas celulares de mayor proliferación tales como el sistema inmune, la piel y el sistema reproductor se observan múltiples disfunciones. ⁽³⁾ ⁽⁵⁾Rink 2001, 2000
⁽⁶⁾Salgueiro 2000 ⁽⁷⁾Dardenne 2002

El cuerpo humano contiene de 2 a 4 gramos de zinc, sin embargo, el zinc se considera un elemento traza debido a que su concentración en el suero humano es de solamente 12-16 μ M con rangos de 10.1 – 16.8 μ M en mujeres y 10.6 – 17.9 μ M en hombres, siendo significativamente superior la concentración de zinc que en otros tejidos como lo es el músculo y el hígado donde es 50 veces mayor que en el suero. Así mismo, el zinc es transportado en el suero unido a la albúmina (60%) y en menor cantidad por la α_2 macroglobulina (30%) y la transferrina. ⁽⁸⁾Helge 2003 ⁽³⁾Rink 2001 ⁽⁹⁾Brown 1998

El intestino delgado desarrolla un papel importante en el metabolismo del zinc y por lo tanto en el mantenimiento de la homeostasis en todo el cuerpo, de acuerdo a teorías recientes se dice que la modulación de la absorción del zinc exógeno y la conservación intestinal del zinc endógeno son los 2 principales mecanismos reguladores en la homeóstasis del zinc corporal. ⁽¹⁰⁾Hambidge 1998

Sin embargo la biodisponibilidad del zinc depende de la composición de la dieta. Los alimentos derivados de productos animales son generalmente las mejores fuentes de zinc tanto en contenido como en biodisponibilidad, no obstante, en ciudades en desarrollo la dieta esta basada predominantemente de vegetales con alto contenido de fitatos, los cuales inhiben la absorción del zinc. ⁽¹¹⁾Allen 1998

El zinc es quelado por el fitato y el fosfato, resultando en una pobre reabsorción de alimentos vegetarianos en comparación con las carnes, además la reabsorción se reduce por el aumento de los niveles de otros cationes bivalentes, como el Cu, Mg, Ca, Ni, Cd y Fe, otros factores importantes en la biodisponibilidad del zinc son el estado de salud, la edad, la cantidad y tipo de fibra consumida, principalmente en ciudades menos desarrolladas. ⁽¹²⁾Gibson 1998
⁽¹³⁾Sandström 2001 ⁽⁵⁾Rink 2000

Cabe precisar que los requerimientos basales son la cantidad necesaria para prevenir signos clínicamente detectables de daño funcional, mientras que los requerimientos normales son la cantidad necesaria para mantener almacenamientos en tejidos o una capacidad de reserva. ⁽¹²⁾Gibson 1998

El cuerpo humano no cuenta con reservas naturales de zinc, por lo que la disponibilidad del elemento debe obtenerse diariamente de alimentos o suplementos con cantidades determinadas de zinc. ⁽¹⁴⁾Fischer 2004

La distribución del zinc en el cuerpo humano se resume en la siguiente tabla:

Contenido de zinc en el cuerpo humano.

Contenido de zinc		
Tejido	µg/g peso seco	%Zn total en el cuerpo
Músculo	51	57.0
Hueso	100	29.0
Piel	32	6.0
Hígado	58	5.0
Cerebro	11	1.5
Riñones	55	0.7
Corazón	23	0.4
Pelo	150	0.1
Plasma	1	0.1

(Mills, 1989; Favier & Favier, 1990)

2.3 El zinc y el sistema inmune

El zinc es crucial para la función y desarrollo normal de las células que participan en la inmunidad no específica como los neutrófilos y las células NK.

Por otra parte la deficiencia de zinc también afecta el desarrollo de la inmunidad adquirida en algunas funciones de los linfocitos T, como son la activación de la producción de citocinas del tipo Th1 y en el desarrollo de linfocitos B y la producción de anticuerpos, particularmente la inmunoglobulina G. (15)Prasad 1998 (16)Bahl 1998 (17)Erickson 2001 (18)Field 2002

La relación del zinc con el sistema inmune ha sido abordado en innumerables estudios y trabajos de investigación, sin embargo, cabe destacar la participación en la 7° Conferencia de la Sociedad Internacional de Investigación de Elementos Traza en Humanos, por parte del investigador Pr Ananda Prasad quien abordó el tema del efecto del zinc en humanos como un antioxidante, señalando que la suplementación con zinc protege a las células contra el estrés oxidativo al disminuir la expresión de los genes de las citocinas tóxicas: TNF-alfa y IL-1 beta. De su exposición en la citada conferencia concluye que el zinc ya sea sólo o en conjunción con otros parámetros podría ser beneficioso en diversas enfermedades crónicas en donde el estrés oxidativo se sabe juega un papel importante. (19)Prasad 2004

Una ligera deficiencia de zinc crea un desequilibrio en las funciones de los linfocitos Th1 y Th2 en humanos, lo cual puede afectar tanto la respuesta y la regulación del sistema inmune. (20)Prasad 1998 (21) Fragoso 20001

A continuación se resumen las consecuencias de una deficiencia de zinc en el sistema inmune.

Consecuencias de la deficiencia de zinc en el sistema inmune.

Efectos sobre la inmunidad específica	Efectos sobre la inmunidad innata
Incremento en la involución del timo	Disminución en la actividad de las células NK
*Disminución en la cantidad de timocitos en el timo	
*Disminución de los niveles de timulina en el suero	
Células T	Disminución en las funciones del macrófago
*Disminución en el número de células en la circulación	*Fagocitosis
*Hipersensibilidad tardía dañada	*Eliminación intracelular
*Disminución en la respuesta proliferativa a fitohemaglutinina	

*Disminución de la actividad citotóxica de las células T
 *Disminución en la actividad de las células T cooperadoras

Células B

*Disminución en la producción de anticuerpos

Disminución en las funciones del neutrófilo

*Quimiotaxis

*Estallido respiratorio

Wellinghausen N. (2001)

En modelos experimentales con animales deficientes de zinc se han observado alteraciones en el sistema inmune, por ejemplo: en el tejido linfoide y en el timo la falta de zinc provoca atrofia la cual se traduce en una reducción en el número de esplenocitos y en la respuesta de linfocitos T dependientes y linfocitos T independientes a antígenos. (22)Fraker 2004 (15)Prasad 1998 (14)Fischer 2004.

(8)Helge 2003

Como consecuencias clínicas de la deficiencia de zinc, disminuye la resistencia a enfermedades infecciosas favoreciendo a diversos agentes infecciosos: los virus, las bacterias, los parásitos, etc. (23) Wellinghausen 2001

La deficiencia de zinc afecta el sistema epidermal, gastrointestinal, el sistema nervioso, esquelético, reproductivo e inmune, por lo que se ha llegado a centrar la atención en suplementos de zinc para la prevención y mejoramiento de una gran variedad de desórdenes. (24)Prasad 2003

La suplementación con zinc se considera justificable durante periodos relativamente cortos donde existe una vulnerabilidad especial a disminuir los niveles de zinc, tal es el caso durante el embarazo y en las etapas tempranas de la infancia. (11)Allen 1998

La Organización Mundial de Salud recomienda el consumo de zinc en la dieta de acuerdo a la edad, como se observa en la siguiente tabla.

Consumo de zinc diario		Cantidad (mg/d)
Bebes y niños	0 - < 12 meses	5
	1 - < 4 años	7
	4 - < 7 años	10
	7 - <10 años	11
	10 - <13 años	12
Adolescentes y adultos	Hombres	15

Mujeres	12
Mujeres embarazadas	15
Jóvenes	22

Rink 2000

La suplementación con zinc en humanos ha demostrado revertir todos los defectos presentes en la deficiencia de zinc favoreciendo el desarrollo y función normal del sistema inmune. ⁽⁷⁾Dardenne 2002 Sin embargo, el excesivo consumo de zinc ocasiona efectos adversos: náusea, vómito, diarrea y daño en las funciones inmunes. Una prolongada administración de Zn se sabe que interfiere con la absorción del cobre, el hierro y el calcio. ⁽²⁵⁾Bhaskaram 2001, ⁽¹¹⁾Allen 1998

2.4 El zinc en la gestación

La alimentación maternal durante el embarazo se considera de gran importancia por dos razones: a) el incremento de los requerimientos nutricionales de la madre, b) la demanda de nutrientes para el desarrollo del feto. Sin embargo, un desequilibrio entre la baja ingesta y los requerimientos necesarios en el embarazo afecta la evolución del mismo a través de alteraciones en el metabolismo materno y del producto. ⁽²⁶⁾Caulfield 1998 ⁽²⁷⁾Allen 2005 ⁽²⁸⁾Tamura 2000 ⁽²⁹⁾Eidelman 2002 ⁽³⁰⁾Pathak 2004

Un micronutriente indispensable para la madre y el producto es el zinc, al estar relacionado con el crecimiento y desarrollo fetal, al respecto el primer estudio que evaluó los niveles de zinc en la madre durante la gestación fue realizado por Jameson en 1976, él observó que el 60% de las mujeres al dar a luz hijos con anomalías congénitas mostraban bajos niveles de zinc en suero durante el primer trimestre del embarazo, además encontró que aquellas mujeres que alumbraron antes o después de la fecha de término, también revelaban bajos niveles de zinc sérico. ⁽³¹⁾King 2000 ⁽³⁰⁾Pathak 2004

Los requerimientos de zinc durante el embarazo humano son altos; la mayor cantidad de zinc es depositada en el feto (57%) y en el músculo uterino (24%), lo cual se refleja en el aumento en la ingesta de zinc, los estudios muestran que las mujeres embarazadas consumen en promedio 10 mg Zn/día. ⁽³¹⁾King 2000, ⁽³²⁾Lastra 2004

A pesar de que en la mayoría de las investigaciones en mujeres embarazadas se ha encontrado una disminución en la concentración sérica de zinc, con una caída del 10% al 60% en relación a los valores medidos previos a este término; dicha reducción puede ser resultado de diversos factores entre los que se incluyen: la hemodilución fisiológica del embarazo, la disminución en la concentración de albúmina sérica, cambios hormonales en la gestación, la ingesta insuficiente y la suplementación con hierro y/o calcio entre otros. ⁽³³⁾Luna

2001 (34)Shah 2001 (31)King 2000 (28)Tamura 2000 En la siguiente tabla se mencionan otros factores que ocasionan deficiencia de zinc durante el embarazo.

Condiciones que pueden inducir una deficiencia de zinc durante el embarazo

Causas que pueden limitar la absorción de zinc

El consumo elevado de alimentos inhibidores de la absorción de zinc: fibras, calcio, fitato

El incremento de suplementos de hierro

Las enfermedades gastrointestinales que limitan la absorción de zinc:

Causas que podrían interferir en el transporte del zinc hacia la placenta

El consumo de cigarros

El consumo de alcohol

Infecciones agudas en la madre

Ejercicios prolongados

Terapias con determinados medicamentos

Rink 2000

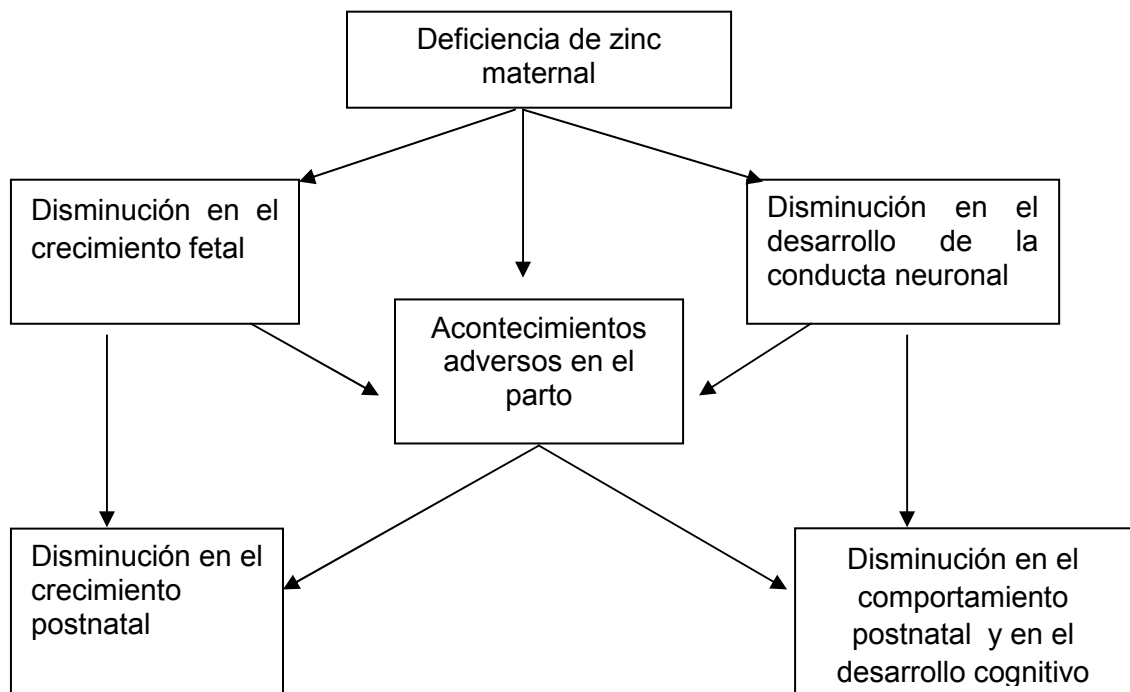
Existe la hipótesis de que los mecanismos por los cuales la deficiencia de zinc causa defectos en el desarrollo embrionario se generan por una síntesis anormal de ácidos nucleicos y proteínas que dañan el crecimiento celular como son: la polimerización anormal de la tubulina con resultado en la reducción en la motilidad y en el desarrollo celular, así como defectos cromosomales, excesiva muerte celular y excesiva peroxidación lipídica de las membranas celulares, ello se refleja en los efectos teratogénicos. ⁽³¹⁾ King 2000

Osada *et al*, observaron que durante el desarrollo normal fetal, la concentración de zinc en el suero arterial del cordón umbilical es baja, mientras que en mujeres con complicaciones en el embarazo se observa un aumento en dicha concentración, lo cual resulta en una posible reducción del consumo de este micronutriente en el feto. Sin embargo en otros estudios se observó que el contenido de zinc en el cordón umbilical fue bajo en un embarazo normal.

⁽³⁵⁾Osada 2002 ⁽³⁶⁾Srivastava 2002.

Hou SF *et al* calcularon la concentración de varios elementos en el estómago de fetos durante el desarrollo prenatal. En el caso del zinc, se observó una tendencia a disminuir la concentración del elemento traza con la edad del feto, indicando la sensibilidad de este micronutriente a sufrir una deficiencia a menos que la madre ingiera suplementos para evitar daños en el producto.⁽³⁷⁾Hou 2003

A través del siguiente cuadro se ejemplifican las principales causas de una deficiencia de zinc en el embarazo.



Interrelación de la deficiencia materna de zinc y el crecimiento y desarrollo en pre y postnatal (26) Caulfield 1998

De acuerdo a diversas investigaciones realizadas en modelos experimentales con animales, se llegó a la conclusión de que la deficiencia de zinc ocasionada por una disminución en la ingesta de alimento, ocasiona retardo en el crecimiento fetal y malformaciones como consecuencia de la transferencia de zinc a la placenta y de ahí al consumo del feto, esto ocurre principalmente en el último periodo de la gestación cuando la demanda fetal por el zinc es alta.

(38)Wellinghausen 2001 (39) Castillo 2003 (31)King 2000 (28)Tamura 2000 Por otro lado se ha visto infertilidad, trabajo de parto prolongado, retardo del crecimiento intrauterino, teratogenesis y muerte embrionaria o fetal por deficiencias severas. (36)Srivastava 2002 (33) Luna 2001 (32) Lastra 2004 (31) King 2000

Beach *et al*, reportaron en su trabajo con ratones parcialmente deficientes de zinc, una disminución en la respuesta a mitogenos y un daño en el desarrollo de las inmunoglobulinas, los cuales persisten hasta la segunda y tercera generación de las crías. (40)Beach 1982. Considerando estos resultados, algunas inmunodeficiencias pueden continuar por generaciones. (38)Wellinghausen 2001 El siguiente cuadro resume las consecuencias inmunológicas.

Consecuencias inmunológicas de la deficiencia de zinc gestacional en el neonato

Secuelas para la primera generación de crías (ratones y monos rhesus)	Secuelas para las siguientes generaciones (ratones)
---	---

Organos linfoides:

- Disminución en el tamaño del timo y el bazo.

Linfocitos B:

- Hipogamaglobulinemia:
Deficiencia persistente de IgM
Deficiencia transitoria de IgA e IgG₂
Agrupación alterada de anticuerpos

Linfocitos B:

- Los niveles de IgM disminuidos

Linfocitos T:

- Alteración en la respuesta proliferativa
-

Linfocitos T:

- Alteración en la respuesta proliferativa

Disminución en la función del neutrófilo:

- Quimiotaxis
- Fagocitosis

Wellinghausen N 2001

La deficiencia de zinc durante el embarazo no afecta solamente a la madre, también existen consecuencias inmunológicas para el feto, una de las señales más tempranas e importante clínicamente son los bajos niveles de inmunoglobulinas o anticuerpos (Ig) naturales incluyendo un defecto persistente

en IgM y una disminución transitoria de los niveles de IgA e IgG₂ en los neonatos. ⁽³⁸⁾Wellinghausen 2001 (40) Beach 1982

2.5 La suplementación de zinc en el embarazo. (Meta-análisis)

La información obtenida del meta-análisis de varios estudios epidemiológicos investigando la suplementación de zinc durante la gestación fue relevante. En algunas investigaciones se apreció un bajo nivel de zinc en suero y se asoció con anormalidades en la labor de parto tal como un prolongado trabajo de parto, hemorragia atónica post parto, (Prema 1980) y así como hipertensión inducida por el embarazo (Jameson 1976), labor de parto pretérmino (Jones 1981) y embarazos post término (Simmer 1985). Sin embargo algunos investigadores no han podido comprobar dicha asociación entre ambos eventos.

Los principales criterios que se emplearon para la revisión de este meta-análisis, fueron las características de las participantes, el tipo de dosis, el protocolo de la metodología, los resultados obtenidos, etc.

Después de aplicar los criterios señalados, únicamente 7 artículos fueron seleccionados, de entre los cuales se llegaron a las siguientes conclusiones:

a) En el grupo con suplemento de zinc se observó una reducción en la inducción del trabajo de parto y nacimientos pretérmino, reportándose que no hubo otras diferencias notables entre los grupos de mujeres quienes no tenían suplemento de zinc o placebo durante el embarazo, es decir: hipertensión en el embarazo, parto post término, ruptura de membrana preparto, bajo peso al nacer, hemorragia *post partum* o mortalidad perinatal. Por otro lado no hubo evidencias de efectos adversos en la madre o el producto asociado con la suplementación de zinc, tales como la sepsis maternal o neonatal.

b) Existen escasas evidencias para evaluar completamente el efecto de la suplementación con zinc durante el embarazo, debido a que cada tipo de población de mujeres reclutadas en los diversos experimentos con características particulares a sus diversas nacionalidades, tipo de alimentación, niveles socioeconómicos, hizo difícil estandarizar la cantidad de ingesta óptima de zinc principalmente durante la gestación. ⁽⁴¹⁾ Mahomed 2004

Por otro lado, se ha sugerido que los niveles de zinc en suero podría no reflejar la verdad del status del zinc corporal, por lo tanto, la concentración de zinc en los leucocitos podría ser empleada para evaluar los niveles de éste elemento traza, ya que también se ha observado su disminución durante la gestación.

Aunque la concentración de zinc en el suero se emplea como un indicador de los niveles de zinc, es difícil cuantificarlo, debido a que disminuye en procesos infecciosos, ejercicios prolongados y el tipo de alimentos ingeridos, llevando a conclusiones erróneas acerca de los niveles de zinc maternal. ⁽³¹⁾ King 2000

2.6 El timo y el bazo en la gestación

En el momento de la concepción el aparato reproductor femenino se expone al líquido seminal el cual es un líquido complejo formado por diferentes aloantígenos del espermatozoide así como otro tipo de componentes que juegan un papel importante en este proceso. No obstante, el sistema inmune femenino permite la retención del espermatozoide en el tracto reproductor femenino por unos días favoreciendo la fecundación del huevo, ya que es capaz de reconocer y responder apropiadamente a los agentes extraños como el líquido seminal. ⁽⁴²⁾ Hedge 2001

El principal cambio que ocurre después de la fecundación es la infiltración de células del sistema inmune como son los macrófagos y linfocitos dentro del útero, lo cual indica que el sistema inmune de la madre detecta la presencia de antígenos extraños en el tracto reproductivo. Los linfocitos sensibilizados migran hacia los órganos linfoides secundarios como el bazo donde se observa un incremento de su tamaño a mitad de la gestación y en el caso del timo una disminución de su tamaño y celularidad ocasionando una involución del mismo. ⁽⁴²⁾Hedge 2001

El timo es el órgano linfóide primario donde se genera la gran diversidad de linfocitos T y se refiere que tiene un papel en la regulación de la inmunidad durante la gestación. ⁽⁴²⁾Clarke 1994 ⁽⁴⁴⁾Li 2003 Con respecto al bazo es el órgano

linfoide donde se lleva a cabo eficientemente la fagocitosis de eritrocitos y recirculación del hierro, la captura y destrucción de patógenos y la inducción de la respuesta inmune adaptativa. ⁽⁴⁵⁾Mebius 2005

En el transcurso de la gestación el timo del ratón pierde cerca de 75% de su peso así como el número de timocitos disminuye, sin embargo, después del embarazo el timo regresa a su estado original. ⁽⁴⁶⁾Pepper 1961 ⁽⁴⁷⁾Clarke 1994 Por otro lado el bazo experimenta una serie de cambios observándose un incremento máximo en el peso del bazo a los 10 días de gestación en el ratón. Sin embargo, en el día 15 de la gestación al llevarse a cabo la apoptosis de linfocitos, el resultado es la disminución en el peso del bazo. ⁽⁴²⁾Hedge 2001

La pérdida de peso del timo se ha atribuido tanto a la muerte celular y la migración de pequeños linfocitos de la corteza, dichos cambios puede deberse a eventos neuroendocrinos e inmunes. La hipótesis que se propone es que la madre trata de suprimir la respuesta inmune ocasionando el proceso de apoptosis o anergia en el timo. ⁽⁴⁸⁾Kendall 2000 ⁽⁴³⁾Clarke 1994 ⁽⁴²⁾Hedge 2001

Los mecanismos inmunoregulatorios involucrados en el incremento de tamaño del bazo durante la gestación no han sido explicados, ya que la mayoría de los estudios se han dirigido en los cambios inmunológicos en el útero y en el timo. ⁽⁴⁵⁾Mebius 2005 ⁽⁴²⁾Hedge 2001

2.7 Cuantificación del zinc en tejidos celulares mediante absorción atómica con flama

El principal método analítico comúnmente usado para analizar el contenido mineral y de elementos traza en alimentos básicos es la espectroscopia mediante absorción atómica con flama. ⁽¹²⁾Gibson 1998

La espectroscopia por absorción atómica es un proceso analítico mediante el cual se estudia la absorción de la energía radiante de elementos transformados

a su estado atómico. La energía radiante absorbida es en forma de una línea angosta de absorción, generalmente en la región espectral visible y ultravioleta.

Esta metodología es muy sensible, varios elementos pueden ser determinados en partes por millón. La facilidad y la velocidad a la cual se pueden hacer determinaciones exactas y precisas utilizando esta técnica, han hecho que la absorción atómica sea uno de los métodos más extendidos para la determinación de metales. ⁽⁴⁹⁾Beaty 1980

El equipo es fácil de usar y de bajo costo. Un equipo de absorción atómica está compuesto básicamente de una fuente de energía radiante, una celda de muestra, un monocromador y un detector.

La concentración de zinc en suero al ser un indicador de los niveles de zinc en la población, deben ser tomados en consideración aquellos problemas técnicos que pudieran interferir con la interpretación de los resultados, tales como la recolección de la muestra, el almacenamiento de la misma y la estandarización de la prueba.

En el presente trabajo sé estandarizaron las condiciones que podrían alterar la concentración de zinc en suero y en diferentes tejidos.

2.8 El zinc y otras investigaciones realizadas en el laboratorio de Investigación de Inmunología de la Facultad de Química.

En el Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, se han realizado diversos protocolos de investigación referente al zinc y su relación con el sistema inmune en ratones, los trabajos se han enfocado tanto en la inmunidad celular como en la inmunidad humoral, empleando como material biológico ratones singénicos BALB/c. ^(50, 51, 52,32) Lastra 1997, 2001, 2004,2004

En los primeros protocolos, se trató de definir la dosis adecuada de zinc que no

ocasionara efectos tóxicos en los animales, las concentraciones empleadas fueron de 500 y 1000 mg/L de zinc, siendo la primera concentración la que brindó resultados favorables, no reportando toxicidad en los murinos. ⁽⁵⁰⁾Lastra 1997

Por otro lado se cuantificó la concentración de zinc en diversos tejidos y células en ratones a las 6 y 9 semanas de vida (considerando el tiempo de gestación), con suplemento de zinc y sin suplemento de zinc.

En la presente tabla se recapitulan los resultados obtenidos:

Tabla I

Concentración de zinc en diferentes tejidos celulares.				
	6 semanas Zn-	6 semanas Zn+ *	9 semanas Zn-	9 semanas Zn+*
Suero	2.2 µmol/L	3.5 µmol/L	2.1 µmol/L	4.2 µmol/L
Macrófago	0.179 µg**	nd ⁺	0.131 µg**	nd ⁺
Timo	12.4 µg/mL **	11.8 µg/mL ***	7.1 µg/mL ***	10.3 µg/mL ***
Hígado	15.8 µg/mL ***	17.5 µg/mL ***	13.7 µg/mL ***	20.6 µg/mL ***
Bazo	12.3 µmol/L	14.4 µmol/L	11.2 µmol/L	12.8 µmol/L
Agua de beber	no cuantificable			
Alimento Diet	74 µg/g			

*Zn + (500 mg/L), **10⁷ células, *** g de tejido, ⁺ no determinado

Concentración de zinc en suero:

De acuerdo a los resultados obtenidos, la concentración de zinc aumenta en aquellos animales suplementados con zinc tanto a las 6 semanas y 9 semanas de edad. La concentración de zinc en suero de ratones de 6 semanas de edad incrementaba conforme la suplementación de zinc era mayor con respecto a su control. De la misma manera se observa lo mismo en ratones de 9 semanas de edad, siendo más alta la concentración de zinc en animales que recibieron una dosis de 1000 mg/L de zinc. ⁽⁵⁰⁾ Lastra 1997

Concentración de zinc en órganos:

En el timo de animales de 6 semanas de edad suplementados con 500 mg/L de zinc y 1000 mg/L de zinc se observó una ligera disminución del elemento con respecto al control. En el caso de los animales de 9 semanas de edad el incremento en la concentración de zinc en el timo conforme aumenta la dosis, fue notable. ⁽⁵⁰⁾ Lastra 1997 Con relación al hígado, los animales de 6 semanas de edad se observó un incremento de la concentración de este elemento en el hígado conforme aumentaba la dosis. La misma tendencia se repitió en los animales de 9 semanas de edad, siendo significativamente alta la concentración de zinc en el hígado. ⁽⁵¹⁾Lastra 2001

En el bazo, los ratones de 6 semanas de edad al recibir suplemento de zinc de 500 mg/L, se registró un incremento de la concentración del elemento con respecto al control. En ratones de 9 semanas de edad se presentó la misma tendencia. Sin embargo, la concentración de zinc en los controles fue ligeramente baja en animales de 9 semanas de edad con respecto al grupo control de 6 semanas de edad. ⁽⁵⁰⁾ Lastra 1997

En los animales suplementados con zinc se observó un incremento en los niveles de zinc en los diferentes tejidos en comparación de los animales no suplementados con el elemento. Sin embargo en el caso del timo, a las 6 semanas de edad la concentración del elemento es menor en los suplementados con el elemento.

En la etapa gestacional, el tejido embrionario, placentario y uterino se cuantificó la concentración de zinc en el transcurso de la gestación. Se calculó la concentración de zinc en los diversos tejidos a los 7, 14 y 21 días de gestación suplementados con 500 mg/L de zinc con sus respectivos controles. A los 7 días de gestación se registró un incremento en la cantidad de zinc en el tejido embrionario con respecto a su control sin embargo, a los 14 días y 21 días el incremento fue mínimo. La concentración de zinc en tejido uterino de 21 días de gestación fue mayor en aquellas hembras que fueron suplementadas con zinc que aquellas que no recibieron el suplemento, indicando que existe un mayor almacenamiento de zinc en este tejido cuando recibe suplemento de zinc. De la misma manera, se observó en el tejido placentario a los 21 días de

gestación. (32)Lastra2004

JUSTIFICACION DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS

Las deficiencias nutricionales durante la gestación son comunes principalmente en secciones vulnerables de la población. Por consiguiente, una adecuada nutrición en especial de los micronutrientes esenciales se manifiesta en un estado de salud favorable, el zinc no es la excepción al participar en diversos procesos biológicos como en el sistema inmune.

Los requerimientos de zinc durante el embarazo humano son altos así, la administración de suplementos de zinc en esta etapa disminuiría las alteraciones en el crecimiento fetal y malformaciones, así como el trabajo de parto prolongado, teratogenesis y muerte embrionaria o fetal.

Hipótesis del estudio

La suplementación con zinc a ratones en etapas perinatales y en la gestación incrementará la concentración de este micronutriente en diferentes células y en el suero.

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Conocer la concentración de zinc en diferentes materiales biológicos (suero y tejidos celulares) en un modelo murino de la cepa BALB/c con suplemento de zinc en etapas perinatales y la gestación mediante absorción atómica con flama.

4.1.1 Objetivos particulares

Establecer las condiciones experimentales para la digestión de muestras en diferentes células y órganos murinos en etapas perinatales y la gestación.

Evaluar la concentración de zinc en suero y células de bazo (esplenocitos) de ratones hembras en gestación (1^a, 2^a, y 3^a semanas)

Evaluar la concentración de zinc en diversos tejidos o células en etapas perinatales y la gestación (esplenocitos)

Observar los cambios en el índice esplénico y tímico de ratones hembras en gestación (1^a, 2^a y 3^a semanas)

MATERIAL Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

5.1 Animales

Los animales utilizados fueron ratones de la cepa BALB/c, hembras y machos de 42 días de vida, los cuales se alojaron en cajas de plásticos con cubiertas de acero inoxidable y fondo de aserrín. Las botellas de agua contaban con tapones de polietileno y tubos bebederos de acero inoxidable. Los ratones recibieron alimento comercial: Lab Diet 5015 (PMI Foods Inc, St Louis MO, USA)

5.2 Grupos de tratamiento

En cajas de plástico se colocaron una hembra y un macho de 42 días de vida (registrando la fecha de inicio de la gestación una vez preñada la hembra). Las parejas se dividieron en dos grupos de estudio, (Zn+) con suplemento de zinc y el (Zn-) sin suplemento de zinc con su respectivo Grupo Control de acuerdo a las semanas de gestación (1°, 2° y 3° semana).

Los ratones del Grupo I recibieron *ad libitum* agua de beber con 500 mg/L de acetato de zinc (Mallinckrodt, Kentucky, USA) desde el momento del apareamiento hasta cumplir el tiempo de gestación señalado en cada grupo de estudio. Los ratones del Grupo II ingirieron agua de beber destilada y el Grupo Control tomó agua de beber de la llave.

Semanas de gestación	Grupos de tratamiento		
	Control	Zn-	Zn+
0 semana	0 mg/L	0 mg/L	500 mg/L
1° semana	0 mg/L	0 mg/L	500 mg/L
2° semana	0 mg/L	0 mg/L	500 mg/L
3° semana	0 mg/L	0 mg/L	500 mg/L

Una vez que los animales cumplieron la edad gestacional se procedió a la

obtención de las muestras para la cuantificación de zinc en suero, la obtención de esplenocitos y finalmente el timo y el bazo.

5.3 Estrategia experimental

5.3.1 Obtención de las muestras para cuantificación de zinc mediante absorción atómica con flama

5.3.1.1 Obtención de los sueros

Mediante punción en el seno retroorbital del ratón se extrajo una muestra de sangre y se centrifugó a 2.5g durante 10 minutos separando el suero cuidadosamente de los eritrocitos. Los sueros fueron congelados a -70°C hasta el momento del análisis.

5.3.1.2 Obtención de los esplenocitos

Se extrajeron los esplenocitos después de inyectar 3mL de SSI en el bazo. La suspensión celular se lavó por centrifugación a 8g durante 5 minutos e inmediatamente se adicionó 1mL de solución hemolizante para lisar los eritrocitos manteniendo 1 minuto la solución en presencia de la suspensión celular. Posteriormente se lavó por centrifugación 8g durante 5 minutos Se contó el número de esplenocitos manteniendo una viabilidad mayor al 95% por exclusión con el colorante azul tripano y se ajustó el número de células a 10^9 células/mL.

5.3.2 Para absorción atómica

Una vez descongeladas las muestras fueron homogeneizadas para su posterior digestión. La concentración de zinc se midió por espectrofotometría de absorción atómica flama usando las condiciones adecuadas para este elemento.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- I) Mantener la estufa (Thermolyne Sybron Corporation Dubuque, Iowa. USA) prendida durante 24h
- II) Introducir los vasos de precipitados (Pirex, México) por 24h.
- III) Después pesar cada vaso de precipitado para tenerlos a peso constante.
- IV) Introducir las muestras en los vasos e incorporarlos nuevamente a la estufa por 24h
- V) Sacar los vasos y pesarlos nuevamente para obtener el peso seco de la muestra.
- VI) Realizar la digestión de las muestras, colocando 1 mL de HNO₃ (J.T Baker, México) y 2 mL de H₂O₂ (E. Merck, Daimstadt Germany), manteniendo en agitación constante en una parrilla (parrilla con agitador Corning Stirrer/Hotplate) hasta que la solución sea transparente.
- VII) Posteriormente se afora cada muestra con 6 mL de agua destilada y desionizada.
- VIII) Filtrar cada muestra empleando papel filtro (Whatman, England) y finalmente llevar las muestras al Laboratorio de Absorción Atómica de la Facultad de Química, UNAM.

5.3.3 Obtención del bazo y el timo.

Al final de la obtención de muestras de sangre, se procedió a sacrificar los animales. Se obtiene el timo y el bazo abriendo la cavidad torácica y la cavidad peritoneal respectivamente, procurando extraer el órgano intacto y finalmente se procede a pesar cada uno de ellos. Se obtiene el índice esplénico de la relación entre el peso del órgano (el bazo) y el peso del animal. Lo mismo se realiza para el índice tímico pero con el timo.

5.4 Estudio estadístico

Los resultados se recogieron y almacenaron para realizar el análisis estadístico ANOVA con el programa GraphPad versión 4 considerando el valor $p < 0.05$ como significativo.

RESULTADOS

Concentración del zinc en suero de ratones hembras en gestación: 1°, 2° y 3° semana.

En la siguiente tabla se resume los resultados obtenidos de la concentración del elemento a las diferentes semanas de gestación.

Semanas de gestación	Zn µg/L		
	Grupos de tratamiento		
	Control	Zn-	Zn+
0 semana	970 \pm 201	970 \pm 201	970 \pm 201
1° semana	494 \pm 209	816 \pm 559	668 \pm 97
2° semana	372 \pm 229	812 \pm 425	774 \pm 262
3° semana	376 \pm 185	820 \pm 287	1100 \pm 150

En el caso de las hembras suplementadas con zinc, en un principio se observa la disminución de la concentración de zinc, sin embargo en la última semana de gestación es evidente un incremento, siendo 13% superior con respecto a las 0 semanas de gestación. (Gráfica 1)

Durante el periodo de gestación en los animales sin suplemento de zinc se observó una ligera disminución en los niveles del elemento con respecto a las 0 semanas de gestación. No obstante la concentración se mantuvo constante. (Gráfica 2)

Concentración de zinc en esplenocitos de ratones hembras en gestación: 1°, 2° y 3° semana.

En los animales que recibieron suplemento de zinc durante la gestación se observó una disminución de la concentración de zinc significativa en la primera semana, sin embargo la misma incrementó gradualmente hasta la última semana siendo 19% mayor que a las 0 semanas de gestación. (Gráfica 1)

En el caso de los animales no suplementados con zinc se observó un incremento en la primera semana pero, disminuyó significativamente en la última semana de gestación. (Gráfica 2)

Semanas de gestación	Zn $\mu\text{g}/10^9$ células		
	Grupos de tratamiento		
	Control	Zn-	Zn+
0 semana	29.22 \pm 12.41	29.22 \pm 12.41	29.22 \pm 12.41
1° semana	24.88 \pm 6.049	36.65 \pm 7.35	12.06 \pm 4.02
2° semana	37.36 \pm 26.71	34.05 \pm 5.14	28.63 \pm 18.94
3° semana	19.91 \pm 3.78	7.14 \pm 4.64	34.93 \pm 10.78

Concentración de zinc en el tejido embrionario de ratones hembras en gestación: 1°, 2° y 3° semana.

La concentración de zinc en tejido embrionario es mayor en el grupo de animales que recibieron suplemento de zinc con respecto de los animales que no recibieron suplemento, principalmente en la primera semana de gestación. (Gráfica 4)

Semanas de gestación	Zn $\mu\text{g}/\text{g}$ de tejido embrionario	
	Grupos de tratamiento	
	Zn-	Zn+
1° semana	442.270 \pm 234	1183.08
2° semana	163.356 \pm 78	186.753 \pm 84
3° semana	92.053 \pm 24	99.108 \pm 4

Índice esplénico durante la gestación

En el grupo con suplemento de zinc se observa un ligero incremento del índice esplénico en la primera y segunda semana de gestación. Sin embargo en la tercera semana el índice esplénico disminuye. (Gráfica 5)

Comparando los resultados con las hembras que no recibieron suplemento de zinc, se observa un incremento notable en la primera semana de gestación, aunque conforme avanza el periodo de gestación el índice esplénico disminuye, siendo similar al grupo que recibió suplemento de zinc. (Gráfica 6)

En el Grupo Control no se observan cambios significativos durante las semanas equivalentes de gestación. (Gráfica 7)

Semanas de gestación	índice esplénico		
	Grupos de tratamiento		
	Control	Zn-	Zn+
0 semana	0.00625±0.0010	0.00625±0.0010	0.00625±0.0010
1° semana	0.00559±0.0005	0.00836±0.0030	0.00714±0.0009
2° semana	0.00536±0.0005	0.00616±0.0007	0.00737±0.0038
3° semana	0.00613±0.0011	0.00410±0.0010	0.00408±0.0012

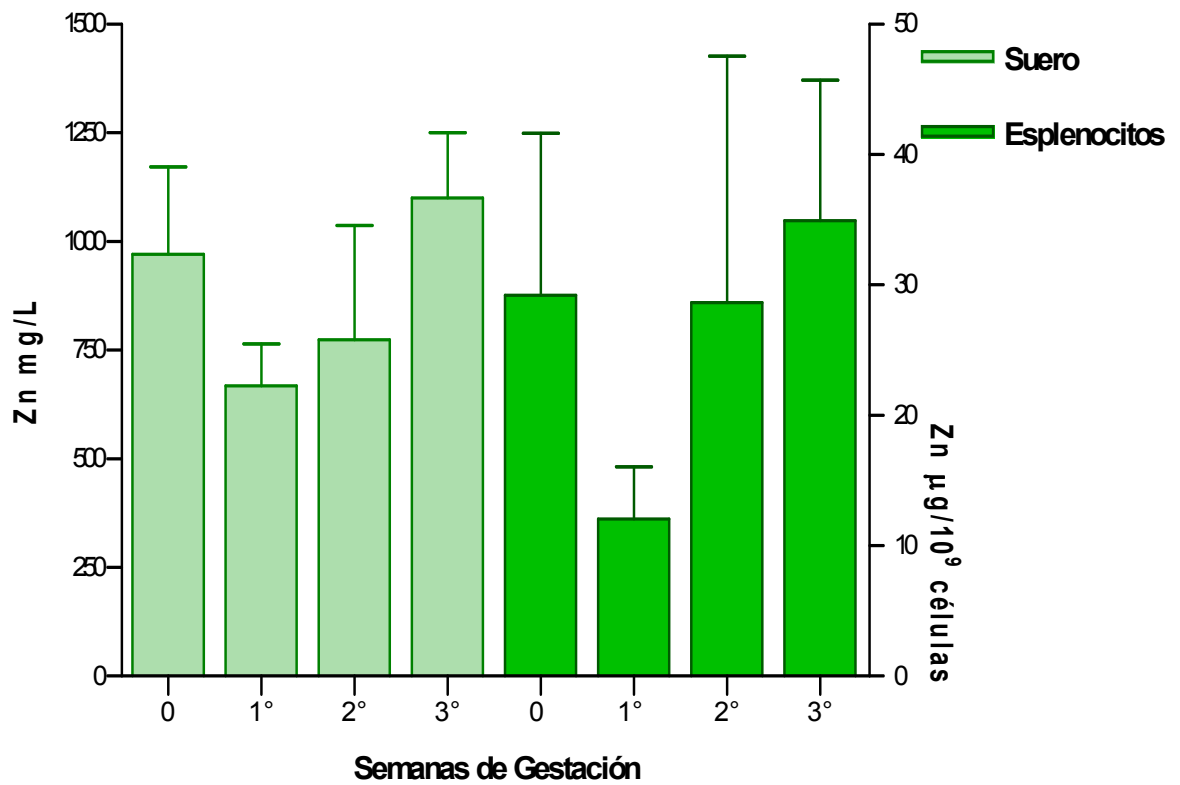
Índice tímico en la gestación

En el grupo con suplemento se observa un decremento en el índice tímico. (Gráfica 5) En el grupo sin suplemento de zinc la disminución del índice tímico es significativa, siendo similar en la última semana de gestación al grupo que recibió suplemento de zinc. (Gráfica 6)

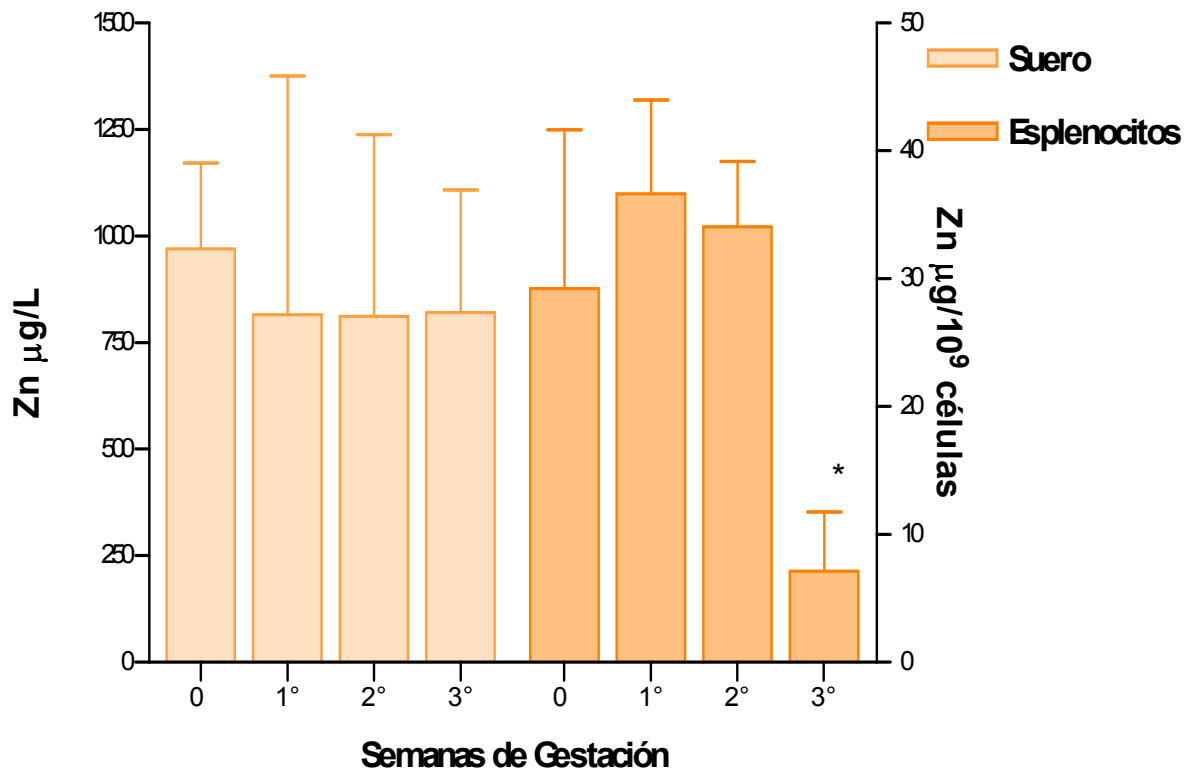
Con respecto al grupo control se observa una disminución gradual conforme a las semanas equivalentes de gestación, aunque no tan evidente como los grupos anteriores. (Gráfica 7)

Semanas de gestación	índice tímico		
	Grupos de tratamiento		
	Control	Zn-	Zn+
0 semana	0.00448±0.0002	0.00448±0.0002	0.00448±0.0002
1° semana	0.00447±0.0004	0.00211±0.0005	0.00254±0.0003
2° semana	0.00332±0.0003	0.00200±0.0004	0.00164±0.0002
3° semana	0.00293±0.0007	0.00129±0.0002	0.00134±0.0002

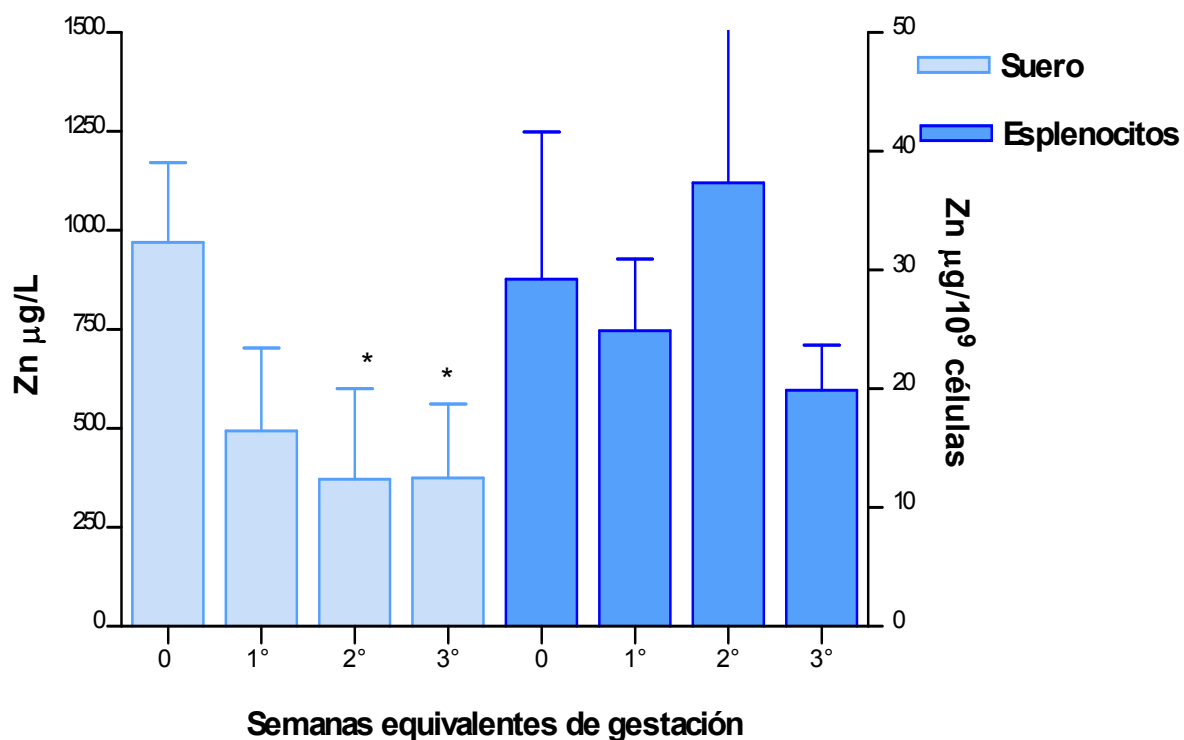
--	--	--	--



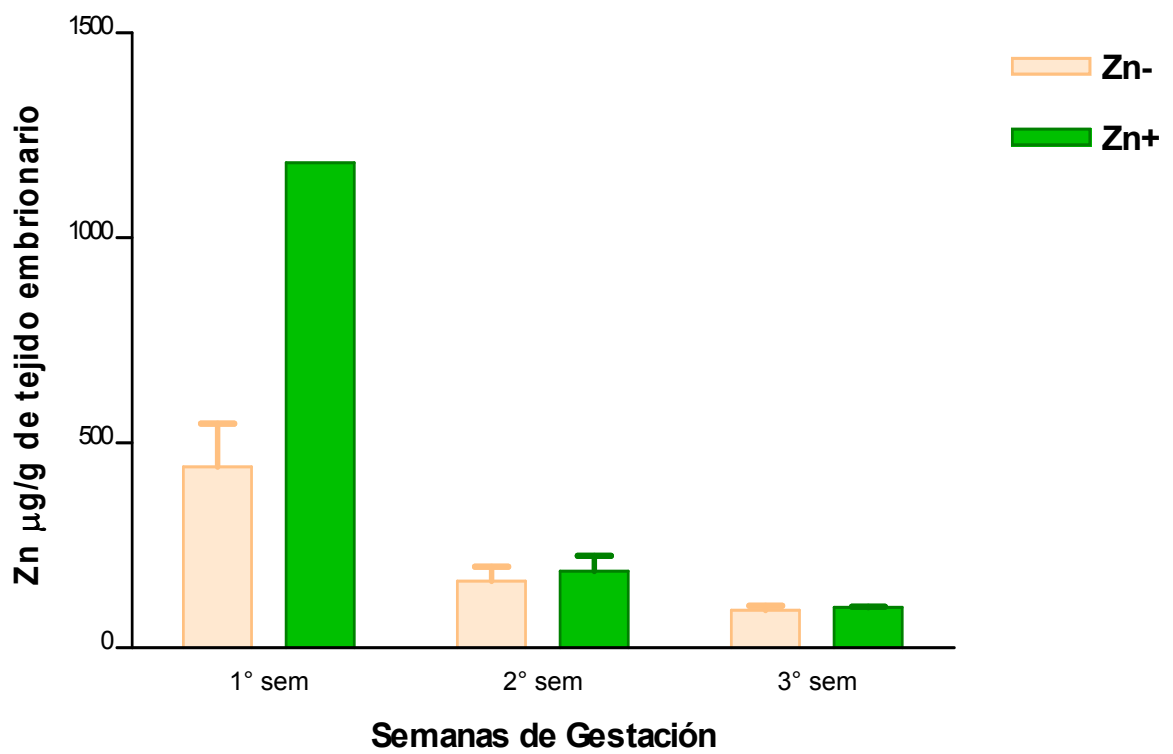
Gráfica 1 Concentración de zinc en suero y esplenocitos de ratones hembras gestantes con suplemento. Se observó una disminución de los niveles de zinc en la primera semana de gestación, sin embargo en las siguientes semanas aumento paulatinamente.



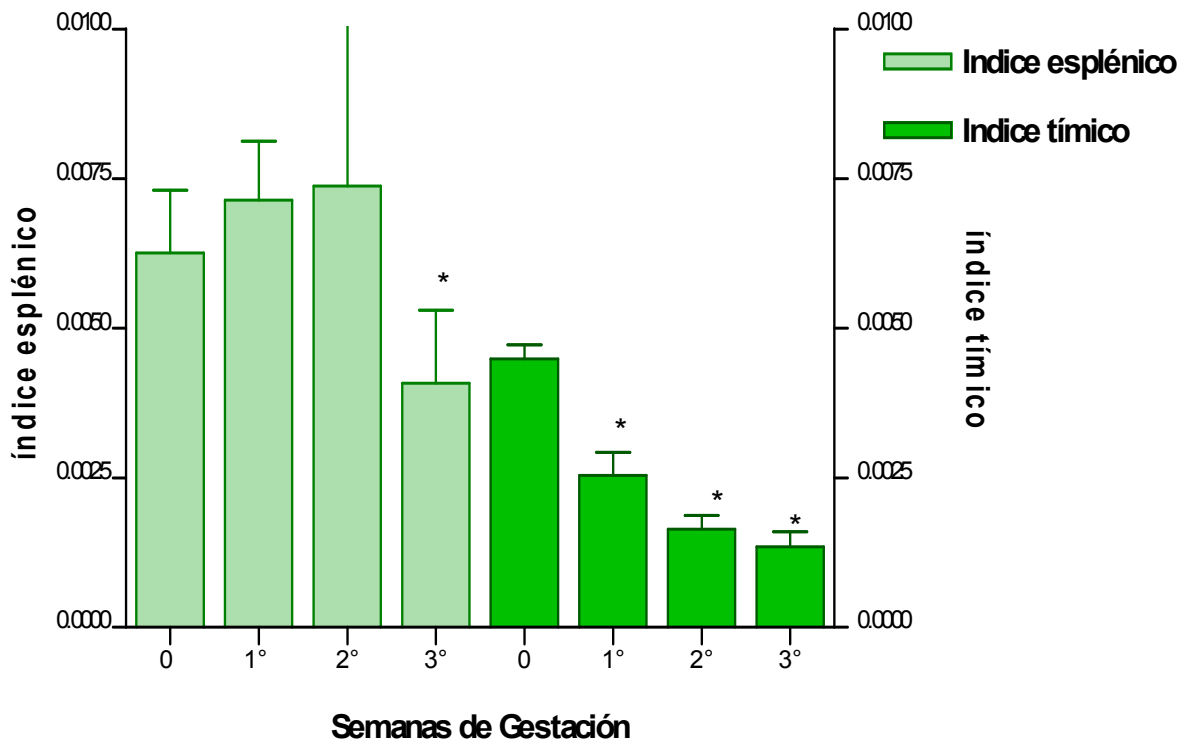
Gráfica 2 Concentración de zinc en suero y esplenocitos de ratones hembras gestantes que no recibieron suplemento de zinc. Solamente se observó un cambio significativo durante la última semana de gestación en las células de bazo. (* Diferencia significativa $p < 0.005$)



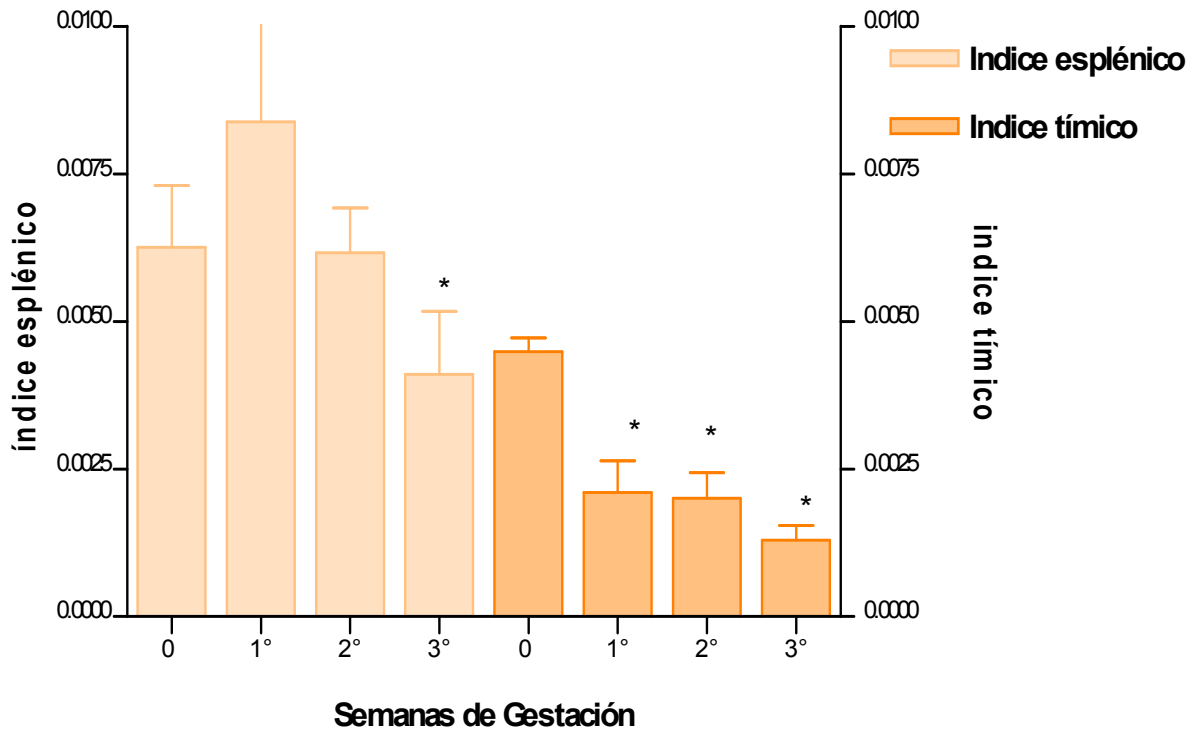
Gráfica 3 Concentración de zinc en suero y esplenocitos de ratones hembras no gestantes y sin suplemento de zinc durante un lapso igual a las semanas de gestación. (* Diferencia significativa $p < 0.005$)



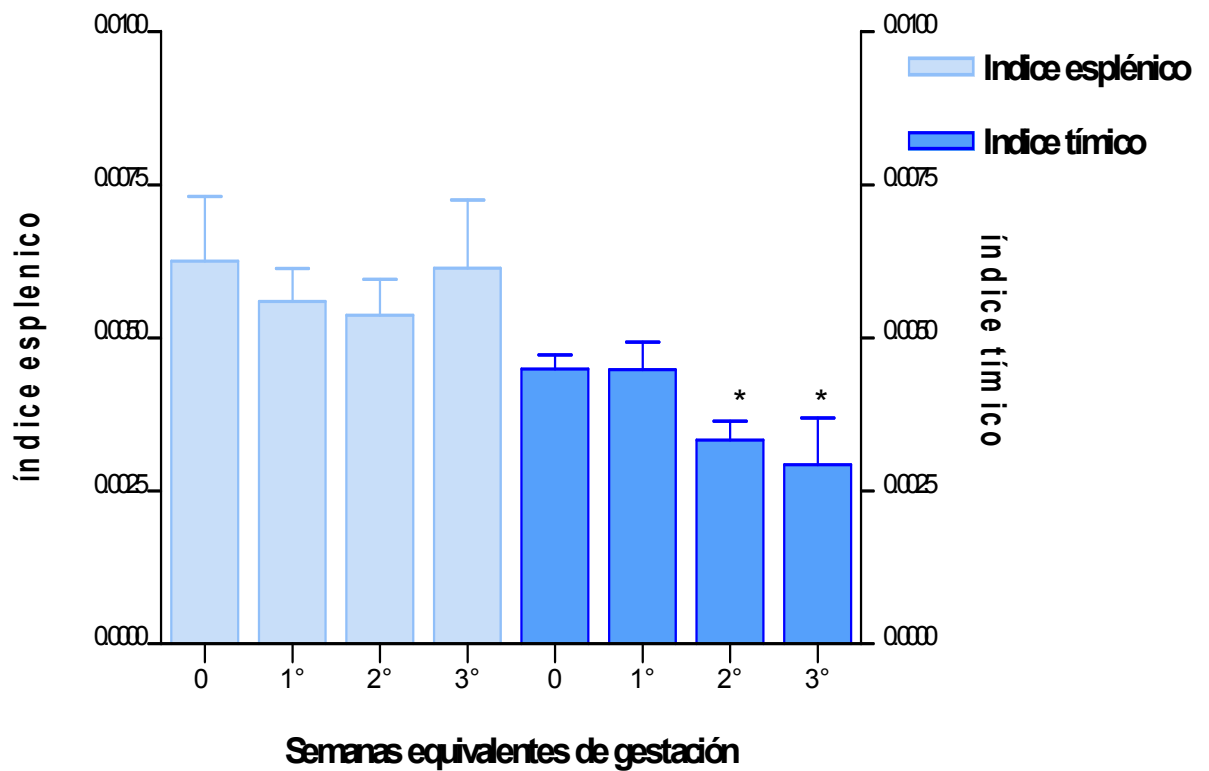
Gráfica 4 Concentración de zinc en tejido embrionario durante la 1°, 2° y 3° semanas de gestación. En la primera semana de gestación se observó un incremento del zinc en los ratones que recibieron suplemento de zinc.



Gráfica 5 Índice esplénico y tímico de ratones hembras en gestación con suplemento de zinc. Durante la 1° y 2° semanas de gestación se observó un incremento paulatino del índice esplénico, sin embargo en la última semana disminuyó significativamente. El índice tímico disminuyó, siendo significativo el cambio desde la primera semana de gestación. (* Diferencia significativa $p < 0.005$)



Gráfica 6 Índice esplénico y tímico de ratones hembras en gestación que no recibieron suplemento de zinc. En la primera semana se observó un aumento en el índice esplénico pero en las siguientes semanas disminuyó, siendo significativo en la última semana. Se observó una disminución del índice tímico durante el transcurso de la gestación. (* Diferencia significativa $p < 0.005$)



Gráfica 7 Índice esplénico y tímico de ratones hembras no gestantes y sin suplemento de zinc. En el índice esplénico no se observó un cambio significativo durante las semanas equivalentes de gestación. Sin embargo el índice tímico disminuyó significativamente en la 2° y 3° semana. (* Diferencia significativa $p < 0.005$)

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los elementos traza tienen un papel fundamental en el metabolismo celular, el desarrollo y el crecimiento, también son componentes centrales de diversas enzimas y factores de transcripción. Aunque, la necesidad de cantidades óptimas de los micronutrientes en ciertos estados críticos como la vida embrionaria y la fetal ha sido tema central de diversas investigaciones.

En el embarazo las demandas metabólicas se incrementan debido a los cambios fisiológicos en la madre y los requerimientos del feto para su desarrollo. ^{(31)King 2000}. Durante este tiempo, algunas deficiencias de micronutrientes afectan el desarrollo prenatal y la evolución del embarazo, siendo una de las principales causas la baja calidad de la alimentación, especialmente en ciudades en desarrollo. ^{(53)Black 2001}. Un ejemplo es el zinc, el cual conlleva a efectos severos en el humano y en animales experimentales al ocasionar infertilidad, retardo en el crecimiento intrauterino, teratogénesis, graves deficiencias inmunológicas en el producto así como muerte embrionaria o fetal. ^{(31)King 2000 (32) Lastra 2004}

En el Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química se han realizado una serie de protocolos para evaluar la participación del zinc tanto en la desnutrición y en la deficiencia del mismo en etapas perinatales en un modelo murino. Por otra parte, en algunas investigaciones no se ha encontrado alguna asociación significativa al tratar de evaluar la relación entre la nutrición materna con zinc y el desarrollo del embarazo y el feto, ^{(28) Tamura 2000}

Debido a la ambigüedad de los resultados, un grupo de investigadores realizaron un meta-análisis (investigación de carácter científico de diversos trabajos publicados referente a un tema aplicando una serie de criterios, principalmente estadísticos). Este trabajo concluye que no existe evidencia suficiente para afirmar la importancia de la suplementación de zinc durante la gestación, ^{(41) Mahomed 2004}

Aunado a esta conclusión, se realizó una revisión bibliográfica, encontrando que no hay información sobre la concentración de zinc en aquellos tejidos

involucrados en la respuesta inmune en etapas perinatales y durante la gestación. Considerando la necesidad de más información de la deficiencia de zinc en la gestación, en el presente estudio se determinó la concentración de zinc en el suero y en los esplenocitos de ratones hembras preñadas que recibieron suplemento de zinc en la dieta.

El determinar la concentración de zinc en suero se ha utilizado como un indicador de los niveles de zinc corporal por su fácil accesibilidad y la amplia existencia de estudios, sin embargo la diversidad de resultados que se han encontrado en la literatura, hizo necesario calcularlo en otras células del sistema inmune que como en este proyecto fueron las células de bazo.

Al analizar los resultados obtenidos en mi protocolo de tesis, se observó que la concentración de zinc en suero de ratones en gestación que recibieron suplemento mostró una disminución en la primera semana (31% con respecto a la semana 0), sin embargo en la última semana el incremento fue significativo (más del 10%). (Gráfica 1). Se advirtió la misma tendencia en las células de bazo, observándose que en la tercera semana de gestación aumentó la concentración de zinc (Gráfica 1).

La disminución de los niveles de zinc en suero y en los esplenocitos durante la primera semana de gestación podría deberse a la necesidad de almacenar el zinc en el feto para su desarrollo, esto lo observamos en los resultados obtenidos en un protocolo anterior realizado en el Laboratorio de Investigación en Inmunología, donde la concentración de zinc en tejido embrionario es 2 veces mayor que en el grupo que no recibió suplemento de zinc. (Gráfica 4).

(32)Lastra 2004

A este respecto, King *et al* publicaron que el 57% del zinc consumido se deposita en el feto y el otro 24% permanece en el músculo uterino donde se lleva a cabo el desarrollo fetal. (31)King 2000

No se observaron cambios significativos de los niveles del elemento en suero en el grupo que no recibió suplemento de zinc en la gestación. (Gráfica 2). En el caso de la concentración de zinc en los esplenocitos, se observó un ligero incremento en la primera semana y una disminución drástica en la última

semana de gestación, siendo 75% éste menor que en el grupo que recibió suplemento de zinc. (Gráfica 2)

Estos resultados se pueden explicar considerando que la madre trata de equilibrar la demanda propia de zinc como para el consumo del producto, lo cual lo podemos observar en la cantidad de zinc en tejido embrionario en la primera semana de vida, que es más del 50% menor que el grupo que recibió suplemento de zinc. (Gráfica 4). Sin embargo, la disminución del micronutriente al final de la gestación indicó nuevamente que las reservas de zinc se almacenan en el tejido embrionario.

En otras investigaciones mencionan que en el último trimestre del embarazo las demandas de zinc al ser altas y la dieta alimenticia baja, se observa un cambio en los niveles de zinc en suero, confirmando la transferencia de zinc madre-feto en respuesta al crecimiento fetal. ^{(31)King 2000} ^{(34) Srivastava 2002} Por otra parte, en otros estudios realizados observaron que la concentración de ciertos micronutrientes en el estómago de fetos disminuía durante el desarrollo prenatal. ^{(37)Hou SF 2003} En el caso del zinc se manifestó esta tendencia en la cantidad de zinc en tejido embrionario, la cual disminuyó tanto para el grupo con y sin suplemento de zinc en la última semana de gestación. (Gráfica 4).

Osada *et al* encontraron que la concentración de zinc en el cordón umbilical de neonatos con complicaciones en el embarazo mostraba niveles elevados, por lo tanto la madre necesita ingerir alimentos ricos en zinc o suplementos para disponer de este micronutriente durante la gestación y así evitar daños en el producto. ^{(35)Osada 2003}

De igual manera, en diversos protocolos realizados en el Laboratorio de Investigación de Inmunología en cuanto a la concentración de zinc en diversos tejidos y células los grupos que recibieron suplemento de zinc es significativo el aumento de este elemento traza. (Tabla 1)

Una serie de mecanismos inmunoregulatorios son vitales para el desarrollo del embarazo. El órgano reproductor femenino es capaz de reconocer, discriminar

y responder apropiadamente a agentes extraños como es el semen y los agentes de transmisión sexual. ^{(42) Hedge 2001}

Los linfocitos sensibilizados migran a diferentes órganos linfoides primarios y secundarios. En el caso del timo y el bazo al ser dos órganos linfoides muy importantes donde se lleva a cabo tanto la producción de células precursoras del sistema inmune como la eliminación de aquellas que fueron reconocidas como extrañas, se observó atrofia del timo y esplenomegalia transitoria.

Por lo anterior se realizó el cálculo del índice esplénico y se observó en el grupo con suplemento de zinc un incremento durante la gestación sin embargo en la última semana una disminución del 30% fue evidente con respecto a la semana cero de gestación (Gráfica 5). Cabe resaltar que el grupo sin suplemento de zinc fue indiscutible el incremento del índice esplénico en la primera semana de gestación hasta disminuir en la última semana (Gráfica 5)

Aunque no existe suficiente información de los cambios inmunológicos en este órgano linfoide durante la gestación, la esplenomegalia transitoria que se presenta tanto en el grupo con suplemento de zinc y el grupo sin suplemento es evidente, debido a la proliferación de linfocitos que reconocieron como extraño el líquido seminal y finalmente en la apoptosis de los mismos linfocitos al reconocer como propio el producto.

En el índice tímico se observó una disminución significativa tanto para el grupo con y sin suplemento de zinc. (Gráfica 6) Sin embargo en el grupo control también se observa una disminución del índice tímico en el transcurso equivalente de las semanas de gestación, pero menor a los grupos con tratamiento. (Gráfica 7). No obstante cabe mencionar que la disminución del índice esplénico y tímico en la última semana de gestación se ve afectada por el aumento de peso de la madre influyendo de manera negativa en el resultado.

Clarke *et al* observaron que el timo sufre una serie de cambios tanto en su morfología como en la población de células precursoras de linfocitos. En el transcurso de la gestación disminuye su tamaño, pero al finalizar este periodo el timo vuelve a su dimensión normal. En el grupo que recibió suplemento de

zinc se observaron cambios no significativos en el timo con respecto al grupo sin suplemento, lo cual, nos hace suponer que no solo depende de eventos inmunoregulatorios sino también neuroendocrinos. ⁽⁴⁷⁾Clarke 1994

Con la literatura revisada y los resultados de este trabajo se concluye que la suplementación de zinc durante la gestación favorece la función de la respuesta inmune, lo cual en grupos con deficiencia de zinc en el embarazo puede ser beneficioso al disminuir la morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas además de complicaciones durante el parto.

En el transcurso de la gestación el índice esplénico y tímico presentaron alteraciones significativas tanto en los grupos con y sin suplemento de zinc, lo cual indica la participación de diversos mecanismos inmunoregulatorios en este periodo, aunque la escasa información plantea el desarrollo de nuevos proyectos de investigación.

La suplementación del zinc en la etapa gestacional y su papel en las funciones fisiológicas, en especial los cambios que suceden en la etapa fetal, obliga la realización de diversos protocolos para comprender la trascendencia de este micronutriente en el metabolismo y en la respuesta inmune durante la gestación, así como los posibles efectos adversos, principalmente para aquella población con deficiencias de zinc. ⁽³⁷⁾Hou SF 2003 ⁽⁵³⁾Black 2001

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- González de Dios J, Moya M, Castell C. Cuantificación de la excreción fecal de elementos traza en recién nacidos como expresión de la secreción intestinal fetal. *An Esp Pediatr* 1996; 45: 281-285.
- 2.- Ashworth CJ, Antipatis C. Micronutrient programming of development throughout gestation. *Reproduction* 2001; 122: 527-535.
- 3.- Rink L, Gabriel P. Extracellular and immunological actions of zinc. *BioMetals* 2001; 14: 367-83.
- 4.- Shankar AH Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr* 68(suppl):447S-63S, 1998
- 5.- Rink L, Gabriel P. Zinc and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society* 2000; 59: 541-552.
- 6.- Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Cremaschi G, Goldman CG, Caro R, Paoli T, et al. Zinc status and immune system relationship. *Biological Trace Element Research* 2000,76: 193-205.
- 7.- Dardenne M. Zinc and immune function. *European Journal of Clinical Nutrition* 2002; 56 (suppl 3): S20-3.
- 8.- Helge K, Rink L. Zinc-altered immune function. *The Journal of Nutrition* 2003; 133(suppl): 1452S-56S.
- 9.- Brown KH. Effect of infections on plasma zinc concentration and implications for zinc status assessment in low-income countries. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(suppl):425S-29S.

10.- Hambidge KM, Krebs NF, Miller L. Evaluation of zinc metabolism with use of stable-isotope techniques: implications for the assessment of zinc status. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(suppl): 410S-3S.

11.- Allen LH. Zinc and micronutrient supplements for children. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(suppl): 495S-98S.

12.- Gibson RS, Ferguson EL. Assessment of dietary zinc in a population. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(suppl):430S-34S.

13.-Sandström B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *British Journal of Nutrition* 2001; 85 (suppl 2): S181-S185.

14.- Fischer C, Black RE. Zinc and the risk for infectious disease. *Annu. Rev. Nutr* 2004; 24: 255-75.

15.- Prasad AS. Zinc and immunity. *Mol Cell Biochem* 1998; 188: 63-69.

16.- Bahl R, Bhandari N, Hambidge KM, Bhan MK. Plasma zinc as a predictor of diarrheal and respiratory morbidity in children in an urban slum setting. *Am j Clin Nutr* 1998; 68: 414S-417S.

17.- Erickson KL, Medina EA, Hubbard NE. Micronutrients and Innate Immunity. *The Journal of Infectious Diseases* 200; 182 (suppl 1): S5-10.

18.- Field CJ, Johnson IR, Schley PD. Nutrients and their role in host resistance to infection. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 16-32.

19.- Prasad AS. Anti-oxidant effect of zinc in humans. VIIIth conference of the international society for trace element research in humans 2004.

20.- Prasad AS. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 182: S62-S68.

21.- Fragoso G, Lastra MD, Aguilar AE, Pastelin R, Rosas G, Meneses G, et al. Effect of oral zinc supplementation upon *Taenia crassiceps* murine cisticercosis. *J Parasitol* 2001; 87: 1034-39.

22.- Fraker PJ, King LE. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annu. Rev. Nutr* 2004; 24: 277-98.

23.- Wellinghausen N, Rink L. The significance of zinc for leukocyte biology. *Journal of Leukocyte Biology* 64: 571-577; 1998.

24.- Prasad AS. Zinc deficiency. *BMJ* 2003; 326: 409-410.

25.- Bhaskaram P. Immunobiology of mild micronutrient deficiencies. *British Journal of Nutrition* 2001; 85 (suppl 2): S75-S80.

26.- Caulfield LE, Zavaleta N, Shankar AH, Meriandi M. Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(suppl): 499S-508S.

27.- Allen LH. Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 1206S-1212S.

28.- Tamura T, Goldenberg RL, Johnston KE, DuBard M. Maternal plasma zinc concentrations and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 109-13.

29.- Eidelman AI. The relationship of maternal nutrition to fetal growth and outcome. *Maternal Nutrition and Fetal Growth*; 71-82. 2002

30.- Pathak P, Kapil U. Role of trace elements zinc, copper and magnesium during pregnancy and its outcome. *Indian J Pediatr* 2004; 71: 1003-1005.

31.- King JC. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2000; 71 (suppl):1334S-43S.

32.- Lastra MD Aguilar AE, Martínez K, Murguía N, Cabañas MA, Márquez C, Saldivar L. Zinc concentrations in mice during pregnancy. *Metal Ions in Biology and Medicine* 2004; 4:307-310.

33.- Luna C, Villanueva LA. Significado fisiológico del zinc: una aproximación perinatal. *Ginecol Obstet Mex* 2001;69(2): 77-81.

34.- Shah D, Sachdev HPS. Effect of gestational zinc deficiency on pregnancy outcomes: summary of observation studies and zinc supplementation trials. *British Journal of Nutrition* 2001; 85: S101-S108.

35.- Osada H, Watanabe Y, Nishimura Y, Yukawa M, Seki K, Sekiya S. Profile of trace element concentrations in the feto-placental unit in relation to fetal growth. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81:931-937.

36.- Srivastava S, Mehrotra PK, Srivastava SP, Siddiqui MKJ. Some essential elements in maternal and cord blood in relation to birth weight and gestational age of the baby. *Biological Trace Element Research*. 2002; 86: 97-105.

37.- Hou SF, Li HR, Wang LZ., Li DZ, Yang LS, Li CZ. Contents of chemical elements in stomach during prenatal development: different age-dependent dynamical changes and their significance. *World j Gastroenterol* 2003; 9(5): 1063-1066.

38.- Wellinghausen N. Immunobiology of gestational zinc deficiency. *British Journal of Nutrition* 2001; 85 (suppl 2): S81-S86.

39.-Castillo-Duran C, Weisstaub G. Zinc supplementation and growth of the fetus and low birth weight infant. *The Journal of Nutrition* 2003;133 (suppl):1494S-97S.

40.-Beach R. Gestational zinc deprivation in mice: Persistence of immunodeficiency for three generations. *Science* 1982; 218: 469-71.

41.- Mahomed K. Zinc supplementation in pregnancy (review). The Cochrane Database of Systematic Reviews 2004; 4: -12.

42.- Hedge UC, Ranpura S, D'Souza S, Raghavan VP. Immunoregulatory pathways in pregnancy. Indian j Biochem Biophys 2001; 38(4): 207-219.

43.- Clarke AG, Kendall MD. The thymus in pregnancy: the interplay of neural, endocrine and immune influences. Immunology Today 1994; 15: 545-551.

44.- Li L, Hsu HC, William GE, Stockard CR, Ho KJ, Lott P, et al. Cellular Mechanism of Thymic Involution. Scandinavian Journal of Immunology 2003; 57: 410-22.

45.- Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. Nature 2005; 5: 606-616.

46.- Pepper FJ. The effect of age, pregnancy and lactation on the thymus gland and lymph nodes of the mouse. J Endocrin 1961; 22: 335-348.

47.- Clarke AG, Gil AL, Kendall MD. The effects of pregnancy on the mouse thymic epithelium. Cell Tissue Res 1994; 275: 309-318.

48.- Kendall MD, Clarke AG. The thymus in the mouse changes its activity during pregnancy: a study of the microenvironment. J Anat 2000; 197: 393-411.

49.- Beaty R. Conceptos, instrumentación y técnicas de espectrofotometría por absorción atómica. Perkin elmer. 1980.

50.- Lastra MD, Pastelin R, Herrera MA, Orihuela VD, Aguilar AE. Increment of immune responses in mice perinatal stages after zinc supplementation. Arch Med Res 1997; 28: 67-72.

51.- Lastra MD, Pastelin R, Camacho A, Monroy B, Aguilar AE. Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response. *J Trace Elem. Med. Biol* 2001; 15: 5-10.

52.- Lastra MD, Aguilar AE, Cabañas MA, Hernandez R, Kumanez K, Pastelin R. Interleukin-1 α , tumor necrosis factor $-\alpha$, and interleukin-12 secreted by zinc-induced murine macrophages in vivo and in vitro. *J. Trace Elem. Exp. Med* 2004; 17: 123-35.

53.- Black RE. Micronutrients in pregnancy. *British Journal of Nutrition* 2001; 85 (suppl 2): S193-S197.