



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TESIS

EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ZINC SOBRE LA
DISTRIBUCIÓN DE SUBPOBLACIONES
DE LINFOCITOS EN EL TIMO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARISOL CRUZ AGUIRRE



MÉXICO, D.F.

2008



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	Prof. Héctor Bourges Rodríguez
Vocal	Prof. Enrique Moreno Sáenz
Secretario	Prof. Ana Esther Aguilar Cárdenas
1er. Suplente	Prof. Martha Leticia Jiménez Pardo
2º. Suplente	Prof. Marta Alicia Menjívar Iraheta

Sitios en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Investigación en Inmunología, Depto. de Biología, Facultad de Química y Laboratorio de Inmunohistoquímica, Depto. de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Asesor del tema

Dra Ana Esther Aguilar Cárdenas

Sustentante

Marisol Cruz Aguirre

Quiero expresar mi agradecimiento

Al Dr. Gerardo Salas Garrido, jefe del Laboratorio de Inmunohistoquímica, Departamento de Patología, FMVZ por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su experiencia científica y por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.

A mi madre

En reconocimiento a su esfuerzo y apoyo incondicional y como muestra de mi infinita gratitud por su cariño y comprensión; gracias por guiarme, por enseñarme a tener fe en mi misma y en Dios y por enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr los objetivos. Finalmente podrá ver reflejado el resultado de su dedicación.

A mis tíos

Por su apoyo a pesar de la distancia, por sus buenos deseos, por su cariño y sus oraciones.

ÍNDICE

	pág
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	2
<i>Importancia de los Elementos Traza</i>	2
Deficiencias Nutrimientales en México.....	5
<i>El Zinc</i>	12
La bioquímica del zinc.....	12
El Papel del zinc en el sistema inmunológico.....	13
<i>El Timo</i>	16
<i>Linfocitos</i>	19
<i>Antecedentes en el Laboratorio de Investigación en Inmunología</i>	23
JUSTIFICACIÓN.....	24
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	25
<i>Objetivo General</i>	25
<i>Objetivos Particulares</i>	25
<i>Hipótesis</i>	25
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
<i>Suplementación y Organización de Grupos Experimentales</i>	26
MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
<i>Tratamiento de los Timos</i>	26
<i>Desparafinación</i>	27
<i>Tinción y Análisis Histológico</i>	27
<i>Análisis Estadístico</i>	27

	pág
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	43
PERSPECTIVAS	44
BIBLIOGRAFÍA	
SITIOS DE INTERNET	

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de zinc tiene consecuencias que afectan a la salud humana, entre las cuales se encuentra el retraso en el crecimiento, el hipogonadismo en hombres, los cambios neurosensoriales (adaptación anormal a la oscuridad y cambios en la agudeza del gusto), el retraso en la cicatrización de heridas y la alteración de las funciones inmunológicas y cognitivas; estos efectos son reversibles con la suplementación con zinc. La deficiencia moderada en mujeres embarazadas se asocia con el incremento de la morbilidad maternal, alteración del sentido del gusto, gestación prolongada, trabajo de parto ineficaz y riesgos para el feto. Por otra parte la deficiencia subclínica de este elemento contribuye al aumento en la incidencia y severidad de infecciones comunes como la diarrea y la neumonía en niños (Penny, 2002). En México, así como en otros países en vías de desarrollo, es frecuente el déficit en el consumo de zinc debido a la ingestión de alimentos con contenidos bajos de este nutrimento o bien con baja biodisponibilidad. Actualmente se han implementado programas de adición de hierro y zinc a alimentos de alto consumo.

La falta de zinc afecta al sistema inmune, dañando la producción de citocinas que participan en la respuesta Th1, el desarrollo de linfocitos B, la producción de anticuerpos y las funciones de las células NK, de los macrófagos y de los neutrófilos. Además, la apoptosis de linfocitos y de otras células se potencia. También se han observado reducciones significativas en el número total de linfocitos en el sistema inmune tanto en humanos como en animales; lo mismo la linfopenia que la atrofia tímica son marcadores de desnutrición. La carencia de este elemento también se asocia a la pérdida de la actividad de la timulina, un nonapéptido de unión al zinc que se secreta por las células tímicas epiteliales, las cuales a su vez requieren zinc para promover la maduración extratímica de los linfocitos T (Boukaiba *et al.*, 1993).

Este trabajo tiene por objetivo establecer los efectos de la administración de zinc por vía oral sobre la histología y distribución celular del timo de ratones BALB/c en etapas perinatales, empleando técnicas histológicas para analizar la corteza, la médula y las poblaciones celulares de importancia inmunológica del órgano.

Para realizar el análisis histológico de los timos, contamos con la valiosa colaboración del Dr. Gerardo Salas Garrido de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, quien nos asesoró y brindó todas las facilidades para el desarrollo de este protocolo.

MARCO TEÓRICO

Importancia de los Elementos Traza

Los elementos traza son elementos inorgánicos necesarios en pequeñas cantidades por el organismo para la utilización de otros nutrimentos. Se ha demostrado que hay elementos inorgánicos indispensables para el organismo: hierro, zinc, cobre, cromo, selenio, yodo, manganeso, molibdeno y flúor. Éstos se absorben como sustancias inorgánicas y como compuestos orgánicos, posteriormente circulan en el organismo como complejos unidos a proteínas, los cuales no siempre están en equilibrio libre con los depósitos. Por esta razón las concentraciones circulantes no representan la disponibilidad para cubrir los requerimientos, debido a que los depósitos tisulares no están disponibles en situaciones de abastecimiento deficiente ya que se incorporan a enzimas y no se intercambian libremente. Otra característica importante de la mayoría de estos nutrimentos es su eliminación por el tracto gastrointestinal. En consecuencia, cualquier incremento de las pérdidas digestivas puede aumentar los requerimientos.

Existen 3 elementos que son de gran importancia inmunológica: zinc, cobre y selenio. Se tiene evidencia de que la deficiencia de éstos se asocia a la supresión de numerosas actividades de las células tanto del sistema inmune innato como del adquirido, lo que se puede reflejar en la disminución de la actividad celular así como en la reducción del número de células efectoras en los tejidos. Este desequilibrio incrementa el riesgo de morbilidad y mortalidad debido a infecciones virales, microbianas y parasitarias. Por otra parte, la suplementación adecuada puede revertir estos efectos adversos.

Las células requieren cantidades adecuadas de elementos traza para la estructura y función de metaloproteínas que participan en procesos como la producción de energía y la protección contra especies reactivas de oxígeno. Un desequilibrio en la concentración de los elementos puede afectar la síntesis y la secreción de citocinas y quimiocinas que modulan las actividades de las células, las concentraciones plasmáticas de hormonas que regulan el desarrollo y la función de las células que participan en la defensa frente a antígenos. Específicamente, los procesos de generación de células del sistema inmune en la médula ósea y la expansión clonal de los linfocitos necesitan hierro y zinc (Failla, 2003).

Se han realizado estudios en los que se observa que la suplementación con hierro y zinc puede prevenir, atenuar y tratar infecciones. También es importante mencionar que el exceso puede ser perjudicial; por ejemplo el hierro y el cobre pueden ocasionar formación de radicales libres, además pueden ser usados por los virus y bacterias ya que requieren de los mismos elementos para su supervivencia y replicación (Muñoz, 2006).

Zinc. Se encuentra ampliamente distribuido en los alimentos como la carne de res, el hígado, los productos lácteos, las leguminosas, el huevo, las tortillas, algunas verduras (el chile, el brócoli, la espinaca, la papa, el huazontle, el cilantro, entre otras), algunas frutas (principalmente en el coco y el tamarindo). Forma parte de alrededor de 300 enzimas (anhidrasa carbónica, carboxipeptidasa, fosfatasas alcalinas, ligasas, óxido reductasas, tranferasas, liasas, hidrolasas e isomerasas). La deficiencia en el organismo tiene efecto en el metabolismo de ácidos nucleicos debido a que es un constituyente de la DNA polimerasa, la transcriptasa reversa, la RNA polimerasa, la RNA_t sintetasa y del factor de elongación de cadenas proteicas. Por lo tanto, el déficit de este elemento puede alterar la síntesis proteica y por ende, el crecimiento.

En México, la ingestión diaria recomendada (IDR) de zinc en niños es 6.6 mg/día, en hombres es 15.0 mg/día y en mujeres es 11.0 mg/día; durante el embarazo la ingestión diaria sugerida (IDS) aumenta a 14.0 mg/día y durante la lactancia a 16 mg/día (Bourges *et al.*, 2005). En Chile, la recomendación para niños es 100 µg/kg/día y aumenta en bebés prematuros a 300-500 µg/kg/día, debido a que en el último mes de gestación se produce el traspaso de zinc de la madre al niño (Hirsch, 2004). En Estados Unidos la IDR para individuos mayores de 19 años es 11 mg/día para hombres y 8 mg/día para mujeres. En Inglaterra y la Comunidad Europea, así como la Organización Mundial de la Salud recomiendan valores de 6.5 a 7.1 mg/día para mujeres y de 9.4 a 9.5 mg/días para hombres (Haase *et al.*, 2006)

Cobre. El cobre se encuentra en la carne, los moluscos, las legumbres y la cocoa. En el organismo se distribuye ampliamente, participando como coenzima de varias enzimas como la citocromo c oxidasa, la superóxido dismutasa, la dopamina β-hidroxilasa, la monoaminooxidasa y la lisil oxidasa. El 90% del cobre plasmático se encuentra unido a ceruloplasmina. La deficiencia de este elemento se manifiesta principalmente por la disminución de ceruloplasmina en el suero y de lisil oxidasa; también se han descrito alteraciones en el metabolismo de las catecolaminas asociadas con un déficit de la enzima dopamina β-hidroxilasa. En México la IDR de cobre en niños es 440 mg/día, en hombres es 730 mg/día y en mujeres es 730 mg/día (Bourges *et al.*, 2005).

Cromo. Se encuentra en la levadura de cerveza, aceite de maíz, verduras, y granos enteros. En animales se ha observado que la deficiencia de cromo produce intolerancia a la glucosa, efecto que es reversible con la suplementación. Este elemento aumenta *in vitro* el estímulo de la insulina para la oxidación de glucosa y la lipogénesis en tejido adiposo. En el músculo se observa mayor efecto de la insulina sobre la glicogénesis y el transporte de aminoácidos. El cromo se distribuye en todo el organismo y su concentración disminuye con la edad. Se absorbe alrededor del 10 a 25% del cromo de la dieta, como compuesto orgánico. El zinc y los fitatos inhiben su absorción. En México la IDS de cromo en niños (de 4 a 8 años) es 15 mg/día, en hombres (de 19 a 30 años) es 30 mg/día y en mujeres (de 19 a 30 años) es 22 mg/día (Bourges *et al.*, 2005).

Selenio. Este nutrimento se encuentra en los pescados (especialmente atún), carne, cebollas y vísceras (hígado, riñón, páncreas y corazón). En la sangre se encuentra en el plasma y en los eritrocitos. En los tejidos forma parte de la glutatión peroxidasa (GSHpx) y de algunos aminoácidos sulfurados. Tanto las formas inorgánicas como las orgánicas se absorben en el duodeno. La absorción es muy eficiente (75-100%) (Hirsch, 2004). En México la IDR de selenio en niños (de 4 a 8 años) es 30 mg/día y en hombres y mujeres (de 19 a 30 años) es 48 mg/día (Bourges *et al.*, 2005).

El selenio es un componente de diversas proteínas que contienen selenocisteína, por ejemplo, la glutatión peroxidasa que se encarga de la protección de los neutrófilos contra los radicales libres de oxígeno; otro ejemplo es la tioredoxina reductasa, la cual actúa como antioxidante. El selenio actúa como un antioxidante en el espacio extracelular y en el citosol asociado a la membrana celular y específicamente en el tracto gastrointestinal, ejerciendo una influencia notable en los procesos inmunológicos, la deficiencia de selenio ocasiona una disminución en la capacidad proliferativa de linfocitos frente a mitógenos; disminuye la síntesis de leucotrienos B4 (moléculas indispensables para la quimiotaxis de los neutrófilos) en macrófagos; en cuanto a la respuesta humoral, se sabe que los títulos de IgM, IgG e IgA disminuyen en ratas, mientras que en humanos disminuyen los títulos de IgG e IgM (Arthur *et al.*, 2003).

Además actúa como anticancerígeno, debido a sus efectos sobre la muerte celular programada, en la reparación del DNA, su papel en las selenoenzimas, su actividad antiangiogénica y la inhibición específica que algunos metabolitos del selenio tienen sobre el crecimiento de células tumorales (Aboul-Fadl, 2005).

Deficiencias Nutrimientales en México

Los sectores poblacionales más afectados por la desnutrición en México son los niños, las mujeres embarazadas y los adultos mayores.

Una revisión realizada por Rosado y colaboradores en 1995 mostró que la principal deficiencia nutrimental en México es la de hierro, la cual se presenta principalmente en las zonas rurales del sur y sureste del país; también encontraron que la deficiencia de yodo prevalecía en algunas zonas montañosas. Sin embargo ésta se informa en años anteriores y no se encuentran datos actualizados que reafirmen los hallazgos; finalmente la deficiencia de zinc se encontró en mujeres embarazadas en Nuevo León, así como en niños en edades preescolares, quienes presentaron concentraciones bajas de zinc en eritrocitos.

Por su parte, Villalpando y colaboradores en 1993 estudiaron las deficiencias de hierro y zinc de la población mexicana, en niños menores de 12 años y mujeres entre 12 y 49 años.

Su estudio abarcó a la población de 4 zonas del país: 1) Norte: Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Chihuahua, Durango, Nuevo León, Sonora y Tamaulipas; 2) Centro: Aguascalientes, Colima, Guanajuato, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa y Zacatecas; 3) Ciudad de México y Área Metropolitana y; 4) Sur: Campeche, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán.

En las tablas 1 y 2 se resumen los resultados obtenidos por estos investigadores, los cuales muestran que el 66.6% de los niños de 12 a 24 meses de edad presentaban la deficiencia de hierro más alta a escala nacional, la cual disminuye progresivamente con la edad; esta deficiencia fue 10% mayor en las zonas rurales que en las urbanas hasta los 11 años. También encontraron deficiencia de zinc en el 33.9% de los niños menores de 24 meses. Además, la diferencia entre las zonas rurales y las urbanas fue del 50%, siendo los niños de las zonas rurales los más afectados; la deficiencia de zinc fue mayor en la zona sur del país mientras que en la zona norte fue menor.

En cuanto a las mujeres, la deficiencia de hierro a escala nacional representó un 40.5% de la población estudiada y fue mayor en el área rural que en la urbana. La deficiencia de zinc en mujeres se presentó en alrededor del 30% de las muestras a escala nacional, no hubo diferencia entre el área rural y urbana; la zona más afectada fue el sur y la menos afectada fue la Ciudad de México.

Tabla 1. Deficiencia de hierro y zinc en niños menores de 12 años y mujeres no embarazadas entre 12 y 49 años.

	Edad (años)	Muestra n	Prevalencia de deficiencia de hierro (%)	Muestra n	Prevalencia de deficiencia de zinc (%)
NIÑOS	0.5-2	35	66.6	31	33.9
	3-4	120	48.1	128	32.9
	5-6	188	37.2	186	21.4
	7-8	238	33.8	265	19.3
	9-10	232	35.5	268	21.6
	11	118	38.7	123	24.4
	Total	931	41.4	1001	25.3
MUJERES NO EMBARAZADAS	12-49	563	40.5	543	29.7

Modificada de (Villalpando *et al.*, 2003)

Tabla 2. Deficiencia de hierro y zinc en niños menores de 12 años y mujeres no embarazadas entre 12 y 49 años. Comparación entre la zona rural y urbana.

	Edad (años)	Muestra n		Prevalencia de deficiencia de hierro (%)		Muestra n		Prevalencia de deficiencia de zinc (%)	
		Zona rural	Zona urbana	Zona rural	Zona urbana	Zona rural	Zona urbana	Zona rural	Zona urbana
NIÑOS	0.5-2	16	19	74.6	62.2	12	19	24.7	36.6
	3-4	52	68	61.5	42.3	53	75	55.8	21.6
	5-6	91	97	42.3	34.6	88	98	34.3	13.9
	7-8	109	129	40.2	31.3	129	136	28.3	15.2
	9-10	108	124	41.7	32.4	126	142	37.1	13.6
	11	57	61	31.2	42.1	60	63	41.1	16.7
	Total	433	498	48.3	38.2	468	533	40.0	18.2
MUJERES NO EMBARAZADAS	12-49	217	436	51.8	36.4	221	322	33.9	28

Modificada de (Villalpando *et al.*, 2003)

Como ya se mencionó, en las zonas rurales de nuestro país existen problemas de nutrición en niños pequeños como deficiencias de nutrimentos en la dieta, retraso en el crecimiento y un alto índice de morbilidad debido a enfermedades infecciosas. Debido a este problema, Rosado y colaboradores llevaron a cabo un protocolo de suplementación con hierro y zinc en 219 niños en edad preescolar en 1997.

Los suplementos empleados fueron 20 mg de metionina de zinc, 20 mg de sulfato ferroso, 20 mg de zinc combinados con 20 mg de hierro, o una solución placebo. Después de 12 meses de suplementación oral diaria, encontraron que la concentración de zinc en el plasma había aumentado significativamente en los grupos tratados con zinc solo y en combinación con hierro, además los grupos suplementados con zinc tuvieron menos episodios de diarrea. Finalmente, el zinc no tuvo efecto sobre la velocidad de crecimiento ni sobre la composición corporal de la población que estudiaron.

Otros estudios efectuados en México, incluyen datos sobre el contenido de elementos traza de algunos alimentos; en general falta información sobre el contenido de nutrimentos (Zn, Fe y Cu). En 1999, P López y colaboradores realizaron un estudio de cuantificación de estos metales en los alimentos de mayor consumo en el país de acuerdo con las Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición.

A continuación se presentan algunos de los datos más relevantes encontrados por este grupo de investigación.

Tabla 3. Contenido de Zn, Fe y Cu en cereales y productos derivados (mg/100 g)

Alimento	Zinc		Hierro		Cobre	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
Tortilla amarilla	1.002	0.010	2.074	0.110	0.189	0
Tortilla de harina	2.165	0.012	1.756	0.046	0.174	0.005
Tortilla de harina integral	2.369	0.012	2.014	0.014	0.341	0.005
Bolillo	0.865	0.021	1.420	0.012	0.170	0

Modificado de (López *et al.*, 1999)

Tabla 4. Contenido de Zn, Fe y Cu en verduras (mg/100 g)

Alimento	Zinc		Hierro		Cobre	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
Cebolla cruda	0.387	0.044	0.590	0.130	0.073	0.008
Jitomate crudo	0.140	0.016	0.000	0	0.040	0.014
Chile serrano crudo	0.277	0.016	1.140	7.500	0.122	0.047
Zanahoria cocida	0.176	0.008	0.345	0.120	0.032	0.047
Tomate verde cocido	0.162	0.020	0.806	0.280	0.054	0.047
Aguacate	0.222	0.008	0.549	0.110	0.109	0.081
Nopal cocido	0.141	0.021	0.680	0.060	0.046	0
Espinaca cruda	0.736	0.016	4.720	1.070	0.105	0.005
Chayote cocido	0.149	0.020	0.872	0.260	0.032	0
Elote cocido	0.289	0.008	0.944	0.140	0.116	0
Lechuga romana	0.243	0.033	0.284	0.060	0.024	0.005
Chile piquín	2.551	0.016	ND	ND	1.280	0.005
Papas cocidas	0.494	0.024	0.442	0.040	0.113	0.008
Betabel cocido	0.311	0.028	0.352	0.080	0.084	0.008
Quelites cocidos	0.442	0.058	3.732	0.130	0.151	0.005
Brócoli cocido	0.503	0.024	1.314	0.230	0.097	0.008
Huazontle cocido	1.004	0.032	9.742	0.600	0.337	0.008
Epazote crudo	0.384	0.037	5.298	1.070	0.162	0.016
Cilantro crudo	0.664	0.005	2.440	0.090	0.157	0.016

Modificado de (López *et al.*, 1999)

Tabla 5. Contenido de Zn, Fe y Cu en frutas (mg/100 g)

Alimento	Zinc		Hierro		Cobre	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
Melón	0.144	0.016	ND	ND	0.017	0.008
Mango	0.139	0.008	0.466	0.050	0.114	0.005
Limón	0.080	0.016	0.217	0.090	0.028	0
Piña	0.078	0.005	0.421	0.040	0.011	0.008
Sandía	0.098	0.028	0.171	0.040	0.020	0.008
Tamarindo	0.836	0.008	2.392	0.050	0.224	0.005
Guayaba con cáscara	0.188	0.008	0.687	0.060	0.014	0
Pera con cáscara	0.147	0.016	0.221	0.030	0.051	0.009
Coco	0.987	0.008	2.929	0.130	0.270	0.004
Plátano	0.186	0.008	0.938	0.070	0.090	0
Naranja	0.073	0.014	0.129	0.020	0.008	0.002
Manzana	0.092	0.016	0.163	0.040	0.028	0.002
Papaya	0.041	0.008	0.174	0.040	0	0

Modificado de (López *et al.*, 1999)

Tabla 6. Contenido de Zn, Fe y Cu en leguminosas (mg/100 g)

Alimento	Zinc		Hierro		Cobre	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
Lenteja cocida	1.159	0.005	3.464	0.090	0.154	0.004
Garbanzo cocido	0.682	0.017	2.223	0.050	0.161	0
Haba verde cocida	1.214	0.008	2.823	0.050	0.248	0
Frijol negro cocido	0.670	0.016	2.864	0.090	0.208	0.005

Modificado de (López *et al.*, 1999)

Tabla 7. Contenido de Zn, Fe y Cu en alimentos de origen animal (mg/100 g)

Alimento	Zinc		Hierro		Cobre	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
Manteca de cerdo	0.279	0.0035	1.248	0.035	0	0
Mantequilla	0.230	0.015	3.070	0.040	0	0
Mayonesa	0.588	0.001	2.124	0.037	0.179	0.011
Salchicha	1.297	0.015	1.365	0.070	0.313	0.140
Crema	2.324	0.123	0.354	0.001	0.097	0
Jamón	1.615	0.013	1.024	0.042	0.102	0.007
Queso Oaxaca	3.118	0.029	1.299	0.049	0.114	0.003
Chorizo	2.542	0.092	2.542	0.058	0.201	0.005
Carne de res	9.193	0.650	2.144	0.058	0.110	0.006
Atún	0.455	0.160	0.658	0.085	0.053	0.006
Pollo	0.898	0.078	0.538	0.013	0.067	0.002
Huevo	1.169	0.130	1.477	0.110	0.084	0.014
Yogurt	0.547	0.035	0.113	0.100	0	0
Hígado de res	3.725	0.530	7.723	0.079	3.371	0.130
Leche entera (Mi leche)	1.589	0.026	1.121	0.119	0.136	0.005
Leche descremada (Nutrileche)	2.122	0.053	3.550	0.005	0.480	0.004
Leche entera en polvo (Alpura)	2.724	0.050	0.439	0.010	0.166	0.002

Modificado de (López *et al.*, 1999)

En otras investigaciones realizadas en México se observó que la dieta de las personas en países en desarrollo está constituida por cereales y leguminosas que si bien aportan cantidades importantes de hierro (Fe) y zinc (Zn), resultan tener baja disponibilidad. En 2005 RO Méndez y colaboradores realizaron estudios de cuantificación de estos dos elementos en los estados de Sonora y Oaxaca.

**Tabla 8. Contenido total de Fe y Zn en alimentos de Sonora, México.
Base seca (mg/100 g)**

Alimento	Hierro total¹	Zinc total¹
Frijol cocido	5.72 ± 0.00	2.43 ± 0.01
Tortilla de maíz	2.62 ± 0.01	2.21 ± 0.01
Tortilla de harina de trigo	3.17 ± 0.02	0.91 ± 0.00
Carne molida	6.27 ± 0.56	11.58 ± 0.38
Carne para cocer	3.74 ± 0.04	13.58 ± 0.05
Jamón	11.59 ± 0.03	4.39 ± 0.03
Mortadela	4.74 ± 0.44	3.42 ± 0.16
Salchicha	4.18 ± 0.28	3.52 ± 0.07
Huevo blanco	6.11 ± 0.01	6.11 ± 0.01
Cazón	2.50 ± 0.13	1.39 ± 0.00
Leche de vaca	0.78 ± 0.00	3.31 ± 0.03
Queso fresco regional	1.10 ± 0.01	7.10 ± 0.07

Modificado de (Méndez *et al.*, 2005) ¹Media ± Desviación estándar

**Tabla 9. Contenido total de Fe y Zn en alimentos de Oaxaca, México.
Base seca. (mg/100 g)**

Alimento	Hierro total¹	Zinc total¹
Pan		
Sierra	2.31 ± 0.02	1.48 ± 0.00
Amarillo	4.26 ± 0.02	0.69 ± 0.01
Yema	1.79 ± 0.03	1.18 ± 0.06
Telera y Bolillo	4.55 ± 0.01	0.64 ± 0.02
Tortillas de maíz		
Urbanas	1.58 ± 0.03	1.75 ± 0.02
Rurales	1.45 ± 0.45	1.97 ± 0.01
Alimentos varios		
Chorizo de puerco	3.32 ± 0.01	2.06 ± 0.05
Quesillo	1.14 ± 0.06	3.20 ± 0.03
Queso fresco	0.86 ± 0.02	3.03 ± 0.02
Frijol negro	6.36 ± 0.04	2.65 ± 0.05

Modificado de (Méndez *et al.*, 2005) ¹Media ± Desviación estándar

En la Encuesta Nacional de Nutrición de 1999 se evaluó el estado de nutrición en zinc en niños de 0 a 11 años; en total se encontró que un 40% de la población infantil en la zona rural tenía deficiencia, mientras que en la zona urbana fue de 18.2%; los niños más susceptibles tenían entre 3 o 4 años y 11 años con un 55.8% y 41.1% respectivamente. También se estableció la proporción de mujeres con deficiencia de zinc y se encontró que 58.4% de las mujeres embarazadas en la zona rural presentaba déficit, mientras que 33.9% de las mujeres no embarazadas en la misma zona lo presentaban; el porcentaje de deficiencia en la zona urbana fue menor, de 14.6% y 28% respectivamente. Estos datos muestran que la deficiencia de zinc es un problema importante en la población mexicana y no es exclusivo de las zonas menos desarrolladas del país (Bourges *et al.*, 2005).

Con el fin de contrarrestar la deficiencia de vitaminas y minerales en la dieta, la Secretaría de Salud (SSA) realizó un programa de adición de algunos nutrimentos a las harinas de trigo y maíz empleadas en la elaboración de pan y tortillas en México. Para ello, JL Rosado y colaboradores elaboraron un esquema con las cantidades recomendadas de las vitaminas (tiamina 5 mg/kg, riboflavina 3 mg/kg, niacina 35 mg/kg y ácido fólico 2 mg/kg en harina de trigo y 0.5 mg/kg en harina de maíz) y los minerales (hierro 30 mg/kg y zinc 20 mg/kg) adicionados, así como un límite superior de adición para evitar efectos en el producto o incluso excesos en los individuos, este límite fue de 60% arriba del sugerido para la tiamina, la riboflavina y el ácido fólico y de 30% por arriba para la niacina, el hierro y el zinc. También se estableció un límite inferior como control de calidad, que corresponde a 20% menos de la cantidad recomendada.

Esta iniciativa tiene gran importancia ya que la tortilla de maíz es uno de los alimentos básicos de la población mexicana; además la elaboración de tortillas a partir de harina industrializada es cuantitativamente importante.

La adición de nutrimentos a los cereales se debe a que durante el proceso de molienda para la obtención de la harina se pierden y es necesario restaurarlos; además la suplementación de cereales se emplea como vehículo para aumentar el consumo de nutrimentos cuya presencia es deficiente en una proporción importante de la población (Rosado *et al.*, 1999).

El Zinc

- La bioquímica del zinc

El elemento químico de símbolo Zn, número atómico 30 y peso atómico 65.37, es un metal maleable, dúctil y de color gris. Fue descubierto por Andreas Marggraf en 1746. Es uno de los elementos menos comunes; se estima que forma parte de la corteza terrestre en un 0.0005-0.02% y ocupa el lugar 25 en orden de abundancia entre los elementos (www.lenntech.com/home.htm).

Es un mineral indispensable para nuestro organismo, más del 85% del total de zinc presente en él se deposita en los músculos, huesos, testículos, cabellos, uñas y tejidos pigmentados del ojo (www.zonadiet.com). El contenido total de zinc en el plasma es de 100 µg/100 mL, valor que puede variar de acuerdo con la edad (adultos > adolescentes > niños), el sexo (hombres > mujeres), el embarazo (la cantidad se ve disminuida en el curso de esta etapa y con el uso de anticonceptivos) e incluso la hora del día (en la mañana > en la tarde).

El zinc se absorbe en el yeyuno e íleon, la presencia de glucosa en el lumen intestinal ayuda a este proceso, mientras que el calcio y el ácido fólico pueden retardarlo. Se cree que la absorción se lleva a cabo por difusión pasiva y posiblemente por difusión mediada por acarreadores.

El zinc se excreta a través del tracto gastrointestinal; en las secreciones pancreáticas se llegan a encontrar 2 a 5 mg/día. Por vía urinaria se pierden cerca de 500 a 800 µg/día (sobre todo en el túbulo proximal) y en el sudor se pierden alrededor de 500 a 600 µg/día; finalmente hay pérdida por la descamación de la piel y a través de la capa epitelial del intestino.

El zinc lleva a cabo sus funciones bioquímicas en forma de catión divalente, unido a enzimas y a otras proteínas. Sus propiedades químicas hacen que bajo condiciones fisiológicas no presente reducciones u oxidaciones, por lo que es estable en medios biológicos. Otra cualidad fisicoquímica que posee es la de ser anfótero, por lo que existe en forma acuosa y como complejo hidroxilado con valores de pH casi neutros. Tiene la capacidad de adquirir diferentes geometrías, de tal forma que tiene números de coordinación que van desde 2 hasta 8, siendo 4, 5 y 6 los más comunes en complejos enzimáticos (Vallee y Falchuk, 1993).

- El papel del zinc en el sistema inmunológico

La ingestión inadecuada del elemento puede ocasionar alteraciones en el proceso linfopoyético y también puede ocasionar un aumento de la apoptosis. Se ha demostrado que los glicocorticoides producidos durante la deficiencia de zinc causan atrofia tímica que induce la apoptosis de células pre T y pre B tanto *in vivo* como *in vitro* (Fraker y King, 2001).

LE King y colaboradores desarrollaron un modelo experimental con ratones adultos y encontraron que la deficiencia de zinc tiene varios efectos como la reducción del número de linfocitos esplénicos lo cual conduce a la pérdida de la capacidad para montar la respuesta mediada por anticuerpos; la alteración de la linfopoyesis en la médula ósea, lo cual ocasiona una pérdida entre 30% y 70% de las células pre B, así como de las células B maduras, aunque las células pro B presentan resistencia a la deficiencia de zinc; todo esto ocasiona una reducción sustancial en el tamaño del compartimento linfoide mientras más grave es la deficiencia. En sus experimentos la adrenalectomía (remoción de las glándulas suprarrenales, en las cuales se produce la corticosterona) produjo protección sustancial contra la atrofia tímica producida por la deficiencia de zinc (King *et al.*, 2002; Raqib *et al.*, 2007).

La deficiencia de zinc también tiene efectos adversos sobre las funciones de las células NK, de las células citotóxicas, de los macrófagos y neutrófilos; además se aumenta la apoptosis de linfocitos y otras células.

Algunos de los efectos sobre el sistema inmune en ancianos incluyen una reducción en la cantidad de células T (especialmente en las células T *naïve*) y disfunción y desequilibrio en la subpoblación de células cooperadoras (Kahmann *et al.*, 2006). También disminuye la actividad del timo y de las hormonas tímicas; se da un cambio en el equilibrio Th1/Th2 hacia Th2; disminuye la respuesta hacia las vacunas y hay una alteración de las funciones de las células del sistema inmune innato (Haase *et al.*, 2006).

Además de la desnutrición, la deficiencia de zinc se puede deber al síndrome de mala absorción, cirrosis, daño renal crónico, enfermedad de células falciformes, por el consumo de agentes quelantes como la penicilamina la cual se utiliza como terapia contra la enfermedad de Wilson y otras.

En numerosos estudios en animales y humanos se muestra que la deficiencia de zinc ocasiona disminución en la resistencia a infecciones, los animales entonces se vuelven más susceptibles a agentes infecciosos. En la tabla 10 se muestran algunos ejemplos.

Tabla 10. Agentes patógenos asociados con la deficiencia de zinc

Tipo	Nombre
Virus	<i>Herpes simplex</i>
	<i>Semliki forest</i>
Bacterias	<i>Francisella tularensis</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Salmonella enteritidis</i>
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Parásitos	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	<i>Tripanosoma musculi</i>
	<i>Toxoplasma gondii</i>
	<i>Plasmodium yoelii</i>
Eucariotes	<i>Candida albicans</i>
Helmintos	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>
	<i>Strongyloides ratti</i>
	<i>Trichinella spiralis</i>
	<i>Fasciola hepatica</i>
	<i>Schistosoma mansoni</i>

Modificado de (Shankar y Prasad, 1998)

La diarrea es una de las manifestaciones clínicas de la deficiencia de zinc tanto en humanos como en animales; además puede agravar aún más la deficiencia ya que se pierde gran cantidad del elemento en las heces. Esta pérdida se puede dar, por ejemplo, en el síndrome de la acrodermatitis enteropática, que es un padecimiento congénito hereditario, en la que hay una anomalía en la absorción intestinal del zinc; esto puede reducirse al administrar dosis orales del nutrimento, lo cual ocasiona que desaparezcan los síntomas; en Bangladesh se realizó un estudio en niños con diarrea y tras la administración de zinc se observó mejora en la permeabilidad de la mucosa del intestino (Penny, 2002).

La suplementación con zinc también se asocia con la disminución del estrés oxidativo y la mejora del sistema inmune; quizá estos pueden ser los dos mecanismos mediante los cuales pueda ejercer su actividad en la prevención de procesos neoplásicos. Sin embargo, se necesitan estudios preclínicos y clínicos para establecer la modulación de las vías genética y epigenética (Prasad y Kucuk, 2002).

Varios protocolos de suplementación con zinc realizados en humanos han demostrado la reducción en la incidencia y la duración de diarrea aguda y crónica en un intervalo de 25 a 30%, y en la incidencia de infecciones respiratorias menores en un 45%. En estudios realizados en niños menores de 13 años, se encontró que la suplementación con zinc se acompaña de aumento estadísticamente significativo en el crecimiento y aumento de peso corporal.

Estudios realizados en P. Nueva Guinea informan que la suplementación con zinc reduce la incidencia de la malaria en un 35%; además disminuye la frecuencia de la elevación de la temperatura en niños infectados con el parásito *Schistosoma mansoni*, así como disminución en la cuenta de huevos del parásito (Prasad, 1998).

En cuanto a individuos de la tercera edad, quienes constituyen el otro extremo de la población vulnerable a la deficiencia de zinc, se ha investigado que la disminución de la ingestión de zinc se relaciona con los cambios alimenticios de esta proporción de la población, los cuales pueden reducir tanto la cantidad como la biodisponibilidad del elemento. Los alimentos de origen animal tienen una mayor biodisponibilidad del zinc comparada con los de origen vegetal. Los cambios asociados a la edad también influyen en el estado de zinc ya sea por la presencia de enfermedades o por el uso concomitante de medicamentos. Se tiene registrado que más del 90% de la población anciana en Estados Unidos tienen una ingestión de zinc menor a la recomendada.

La concentración de zinc en el suero disminuye con la edad; sin embargo las concentraciones en la circulación no reflejan del todo las concentraciones en los tejidos. Debido a que la síntesis de proteínas requiere de zinc, las concentraciones de proteínas en el suero son una medida indirecta del estado de zinc. La deficiencia del elemento se asocia con la reducción en la concentración de proteínas tales como la transferrina y la transtiretina (Boukaiba *et al.*, 1993).

El Timo

Los órganos linfoides son tejidos que tienen un gran número de linfocitos contenidos en un ambiente de células no linfoides que les permiten diferenciarse, iniciar la respuesta inmune adaptativa y preservar su producción. Los órganos linfoides pueden clasificarse de acuerdo con su función en centrales o primarios, donde los linfocitos se generan y en periféricos o secundarios, donde se inicia la respuesta inmune adaptativa y donde se almacenan los linfocitos. Los órganos linfoides centrales son la médula ósea y el timo mientras que los órganos periféricos son el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT y GALT).

Los órganos linfoides primarios proporcionan microambientes esenciales para la linfopoyesis, es decir la producción inicial de linfocitos a partir de células progenitoras. La función de los órganos linfoides secundarios es llevar a su máximo los encuentros entre los linfocitos y las sustancias extrañas y es a partir de estos sitios donde se inicia la mayor parte de las respuestas inmunes (Parslow *et al.*, 2002).

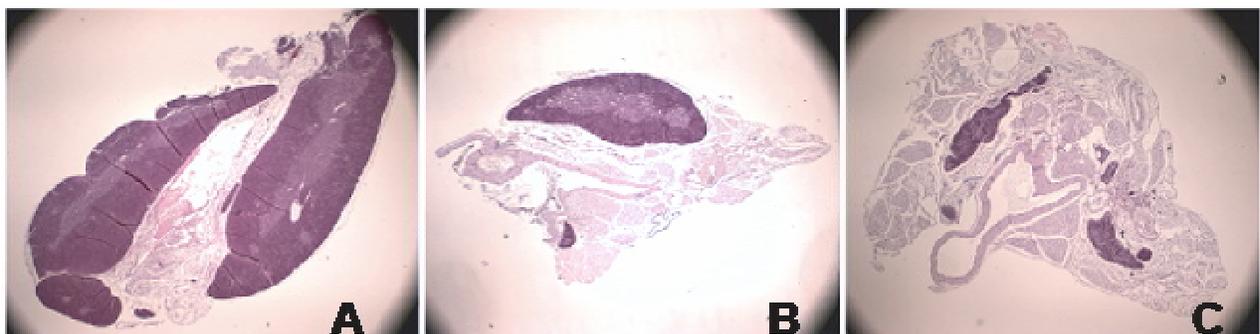
El timo es un órgano linfoide primario, se localiza en la parte superior de la cavidad torácica. Se divide en dos lóbulos conectados por tejido areolar y limitados por una cápsula de tejido conectivo. Los lóbulos varían en tamaño, forma y orientación mientras que los elementos histológicos del timo son similares en todos los vertebrados. Cada lóbulo contiene linfocitos T inmaduros, los cuales se encuentran embebidos en una red de células epiteliales conocidas como estroma tímico. En conjunto, estos elementos dan lugar a la formación de una corteza densa y de una médula menos compacta.

La corteza se subdivide en un área subcapsular que contiene células precursoras inmaduras y densamente empaquetadas, la cual a su vez se compone de una corteza interna y una externa. La médula tímica se distingue histológicamente por tener una distribución menos densa de linfocitos T, más queratina y por la presencia de células epiteliales tímicas completamente diferenciadas conocidas como corpúsculos de Hassall. Entre la corteza y la médula se encuentra la región córticomedular, la cual es un área rica en vasos sanguíneos y en donde las trabéculas pueden alcanzar la médula.

En conjunto, la médula y la corteza forman el espacio tímico epitelial, sitio en el que se lleva a cabo la timopoyesis. Otra región anatómica del timo es conocida como el espacio perivascular, el cual se localiza entre la cápsula y los elementos vasculares, pero esta región no contiene linfocitos T en desarrollo. En el nacimiento, el timo se compone principalmente del espacio tímico epitelial, sin embargo con la edad, el órgano comienza a atrofiarse dando como resultado un aumento del espacio perivascular. Éste comienza a llenarse con adipocitos, fibroblastos y otras células linfoides; no es claro de donde se originan las células de este espacio y cual es su papel específico en el desarrollo tímico y en su atrofia. El timo también está colonizado por macrófagos derivados de la médula ósea, lo cuales se concentran en la médula tímica pero también se encuentran en la corteza aunque en menor cantidad (Taub y Longo, 2005).

El timo alcanza un tamaño máximo de aproximadamente 25 cm³ dentro de los primeros 12 meses de vida. A partir de este punto, el espacio tímico designado para la linfopoyesis disminuye su volumen en un 3% por año hasta la pubertad, y posteriormente la disminución es del 1% por año. Bajo estas consideraciones, la pérdida total del timo ocurrirá a los 105 años de edad (Mitchell *et al*, 2006)

Durante la involución, en los lóbulos se pierde la definición entre las regiones corticales y medulares debido a la disminución en el número de linfocitos T corticales; esta pérdida puede ser significativa, por ejemplo un ratón de 24 meses tiene menos del 1% de células T de lo que tiene uno recién nacido (Rodewald, 2008).



Modificada de (Taub y Longo, 2005)

Figura 1. Timo de ratón, se muestra la involución tímica (A. 4 meses, B. 12 meses, C. >12 meses)

Se conocen diferentes factores fisiológicos y patológicos que interfieren con el funcionamiento normal del timo, entre los cuales se encuentran las infecciones, edad, embarazo, pubertad, estrés físico y emocional, factores ambientales, alteraciones hormonales y las concentraciones de citocinas y de zinc en el organismo. Por otra parte, la atrofia tímica no es únicamente consecuencia de la edad, existen otras condiciones como la pubertad, embarazo, timomas, inflamación, alteraciones psicológicas, ejercicio, oxidación, infecciones bacteriana y virales, estrés, medio ambiente, exposición a sustancias tóxicas, desnutrición, terapia con glucocorticoides, quimioterapia, radioterapia, enfermedad de injerto contra huésped, síndrome de distrés respiratorio agudo, hipoxia, exposición a campos magnéticos, traumas (Taub y Longo, 2005).

Existen diferentes hipótesis que explican los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la involución tímica tanto en humanos como en ratones; estas son: la disminución en la migración hacia el timo de progenitores de células T desde la médula ósea, alteraciones en el rearreglo del receptor de las células T (TCR), la pérdida de células dentro del microambiente tímico y las alteraciones en la cantidad de hormonas, citocinas (IL-7, IL-2, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-14) y factores de crecimiento tanto en la circulación como dentro del timo (Jin *et al.*, 2006).

Linfocitos

El cuerpo humano adulto sano contiene cerca de un billón de linfocitos; la mayor parte de estas células son prácticamente idénticas entre sí cuando se examinan por medio de técnicas histológicas convencionales. En un adulto joven sano (< 30 años), hay aproximadamente 2×10^{11} células T, de las cuales entre 1 y 2% se encuentran en la sangre y de éstas, más del 50% forman parte de la población de células T *naïve*.

El linfocito clásico es una célula pequeña de forma redondeada, tiene un diámetro de 5 a 12 μm y contiene un núcleo esférico con cromatina nuclear densamente compacta y citoplasma tan escaso que apenas es detectable (Parslow *et al.*, 2002).

El timo en los mamíferos es responsable del desarrollo, selección y exportación de linfocitos T *naïve* hacia la periferia, proceso conocido como timopoyesis. La mayoría de los progenitores de timocitos inmaduros son negativos para los marcadores de superficie CD4 y CD8 y su etapa de maduración puede distinguirse por la expresión diferencial de las moléculas CD44 y CD25.

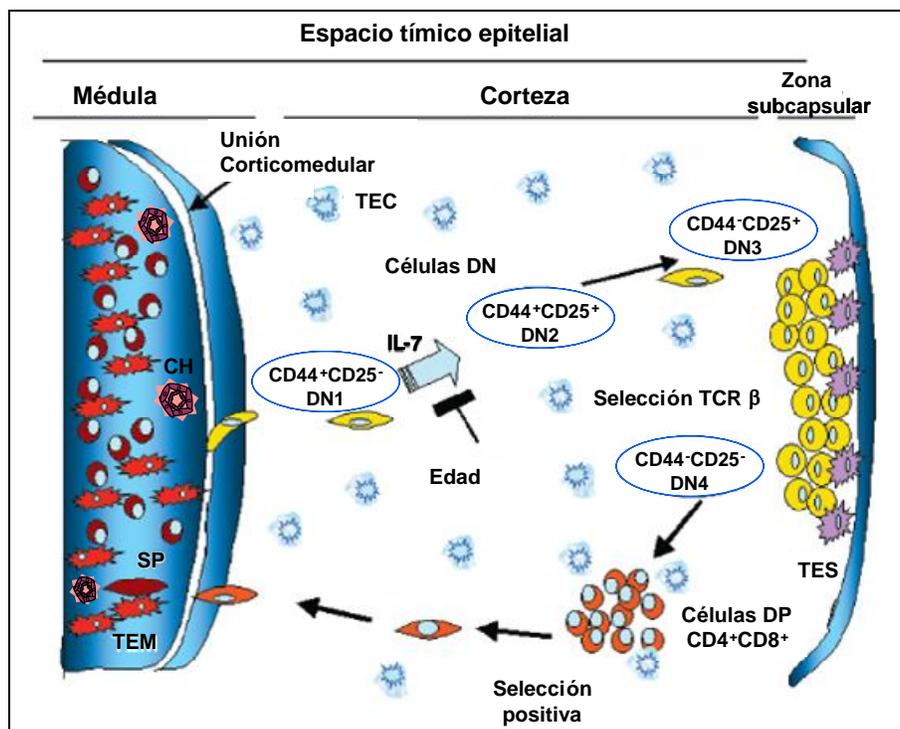
Los progenitores más tempranos de las células T son la población $\text{CD44}^+\text{CD25}^-$ (doble negativo, DN) y tienen la capacidad de producir células T, células dendríticas y células asesinas naturales (NK). Las células DN entran eventualmente a la zona subcapsular donde se lleva a cabo una expansión masiva independiente de antígeno con el fin de proveer de un número suficiente de timocitos que serán posteriormente seleccionados. Dentro de la zona subcapsular los timocitos DN se subdividen de acuerdo con la expresión de CD44 y CD25 de manera secuencial de $\text{CD44}^+\text{CD25}^-$ (DN-1) a $\text{CD44}^+\text{CD25}^+$ (DN-2) a $\text{CD44}^-\text{CD25}^+$ (DN-3) a $\text{CD44}^-\text{CD25}^-$ (DN-4). Durante la etapa de expresión de la molécula CD25 se lleva a cabo un rearreglo de la cadena β del receptor de la célula T (TCR) el cual posteriormente se expresa en la superficie celular junto con una cadena α del pre TCR, continúa el proceso de selección, rearreglo y finalmente la expresión de la cadena α del TCR.

Mientras los timocitos maduran, tienden a desplazarse progresivamente y de forma radial desde la región subcapsular exterior de la corteza hacia la corteza interior y luego hacia la médula. Esta migración coincide con la diferenciación de los timocitos inmaduros doble positivos (DP) $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ a los positivos maduros (SP) $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ y $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$, formando así el repertorio de células T.

La selección positiva y negativa ocurre dentro de la corteza y de la médula, produciendo células T maduras capaces de reconocer una amplia variedad de antígenos en el contexto del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH). En este proceso de selección se pierde poco más del 95% de los timocitos en desarrollo ya sea porque son muy ávidos para reconocer antígenos propios o porque no son capaces de reconocer antígenos en el contexto del CPH.

Las células $CD4^+$ o $CD8^+$ que expresen adecuadamente las cadenas $\alpha\beta$ del TCR migran de la región medular a la periferia como parte del repertorio de células T maduras y funcionales (Taub y Longo, 2005; Alberts *et al.*, 2008).

Figura 2. Diferenciación de los linfocitos T en el timo.



Modificada de (Taub y Longo, 2005)

Las células T maduras que expresan CD4 tienen receptores que reconocen péptidos unidos a las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad clase II propias y son programadas para convertirse en células secretoras de citocinas Th1 o Th2. En contraste, la mayoría de las células que expresan CD8 tienen receptores que reconocen péptidos unidos al CPH clase I propio y son programadas para convertirse en células citotóxicas efectoras. Así, la selección positiva también determina el fenotipo de la superficie de la célula y el potencial funcional de la célula T madura.

El sistema de células T periféricas abarca varias poblaciones fenotípicamente distintas. Los linfocitos T que expresan el receptor T $\alpha\beta$ (TCR) comprenden más del 90% de todas las células T que se encuentran en los órganos linfoides secundarios y en la sangre periférica (en humanos y en ratones).

Como ya se mencionó estos linfocitos se subdividen en células T $\alpha\beta$ CD4⁺, las cuales reconocen antígenos peptídicos presentados por CPH clase II; y en células T $\alpha\beta$ CD8⁺, que interactúan con los antígenos peptídicos en el contexto de moléculas del CPH clase I.

En conjunto, aproximadamente 70% de las células T en sangre humana o en tejidos linfoides secundarios es CD4⁺CD8⁻, mientras que el 25% es CD4⁻CD8⁺, el 4% de las células T periféricas son CD4⁻CD8⁻ (linfocitos dobles negativos) y el 1% restante son células T extratímicas dobles positivas CD4⁺CD8⁺ cuya función se desconoce.

Los patógenos citosólicos son los estimuladores más potentes de células T CD8⁺, mientras que los linfocitos T CD4 son estimulados principalmente por patógenos fagosomales.

La principal función de las células T CD8⁺ es matar a las células infectadas. Estas células pueden eliminar a sus células blanco por dos mecanismos distintos: a) vía secretora y contacto membrana con membrana que involucra a las perforinas y granzimas; b) vía no secretora mediada por receptores de muerte celular presentes en la superficie celular, uno de ellos es la proteína Fas o CD95.

La respuesta de las células T CD8⁺ frente a infecciones virales agudas consta de 3 fases: activación y expansión, muerte y memoria.

Durante la etapa inicial, la cual dura alrededor de una semana, hay una expansión dirigida por el antígeno específico del linfocito T y su diferenciación a linfocito T citotóxico efector (CTL). Posteriormente (entre una y dos semanas) sobreviene un periodo de muerte celular cuando la mayoría de las células T activadas experimentan apoptosis y la actividad efectora se desploma. Esta contracción de la respuesta de las células T es tan dramática como la expansión, ya que desaparece el 95% o más de las células T específicas para el antígeno. Este fenómeno, llamado muerte celular inducida por activación (AICD, por sus siglas en inglés Activation-Induced Cell

Death) sirve como un mecanismo para la regulación del número de células y el mantenimiento de la homeostasis. La apoptosis que resulta de la interacción Fas (CD95)/Ligando de Fas (FasL) y el papel del TNF en la apoptosis de las células T CD8⁺ activadas también ha sido documentada. La tercera etapa de la respuesta celular T se caracteriza por la generación de células de memoria y puede durar varios años.

Las células T CD4⁺ tienen una importancia central en la inmunidad antiviral. Son necesarias para las respuestas mediadas por anticuerpos y por las células T CD8⁺ y pueden actuar como efectoras de sí mismas al producir citocinas antivirales como el IFN- γ y el TNF.

Un papel importante de las células T CD4⁺ en las infecciones virales es la de proveer ayuda para la expansión clonal y la diferenciación de las células B específicas para el virus. La respuesta CD4 frente a infecciones virales se denomina regularmente de tipo Th1 y es caracterizada por la producción de IFN- γ e IL-2, lo cual lleva a la respuesta de IgG_{2a}.

Sin embargo también se puede dar una respuesta de tipo Th2, caracterizada por la secreción de IL-4 e IL-5. Los parásitos pueden polarizar la respuesta hacia Th2, pero en las infecciones virales parece existir una mezcla de ambas (Janeway *et al.*, 2001).

Entre otros elementos, la carencia de zinc tiene efectos sobre la respuesta inmune y su mayor efecto se localiza especialmente en los dos extremos de la vida, la infancia y la vejez. Este problema es frecuente en países en desarrollo, como secuela de la desnutrición debida a dietas hipoproteicas e hipocalóricas. Dicha situación se agrava en la gestación y en los neonatos.

En 1997 se realizaron estudios de suplementación con zinc en un modelo murino, empleando la cepa de ratones BALB/c para determinar sus efectos en la respuesta inmune durante etapas específicas de la ontogenia. Los grupos experimentales recibieron 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de acetato de zinc durante la gestación, la lactancia y la postlactancia. Los resultados de este estudio mostraron que la suplementación hasta la lactancia produce un aumento en la proliferación de linfocitos esplénicos, obteniendo además mejores resultados en el grupo que recibió 500 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, cuando el tratamiento continuó hasta la postlactancia la linfoproliferación disminuye. Por otra parte se observó que en ambos grupos experimentales aumenta la respuesta mediada por IgM tanto en animales de 21 como de 42 días de edad (Lastra *et al.*, 1997).

Asimismo, se ha investigado que el zinc actúa como mitógeno; la estimulación *in vitro* de esplenocitos con concentraciones de zinc 0.1mM ocasiona aumento en la proliferación celular, sin embargo un exceso del metal puede llegar a saturar los mecanismos involucrados en la estimulación, de tal forma que se ve reflejado en una disminución de la proliferación (Lastra *et al.*, 2001). De forma similar, la suplementación oral de ratones (hasta la lactancia) más la estimulación posterior *in vitro* de macrófagos peritoneales mejoró la capacidad funcional de estas células (evaluada por eritrofagocitosis) y nuevamente cuando la suplementación se prolonga, se observó una disminución en el mismo parámetro (Lastra *et al.*, 2000).

Se conoce además que el zinc modula procesos específicos que controlan y facilitan la expresión genética, como la replicación del DNA y del RNA, la síntesis de proteínas, el metabolismo de los hidratos de carbono y lípidos, los procesos que median el metabolismo de alguna vitaminas como el retinol, la piridoxina y el folato (Lastra *et al.*, 2001).

Por otra parte, se ha observado el efecto del zinc en la disminución dramática de la carga parasitaria en cisticercosis, para ello se emplearon ratones infectados por vía intraperitoneal con el cisticerco de *Taenia crassiceps*, y se observó que la infección se combate mediante una respuesta de tipo Th1, lo que deriva en una protección importante. (Fragoso *et al.*, 2001).

En el LII se ha demostrado que el zinc administrado en forma oral durante etapas perinatales incrementa la expresión de citocinas como IL-1, IL-12, TNF- α ; a la vez se observa aumento de IL-2 y de IFN- γ , tanto *in vivo* como *in vitro*. Es decir, se muestra aumento en la respuesta de citocinas proinflamatorias, seguida de aumento en la respuesta celular en el neonato, lo que debe conducir a un efecto positivo en el control de infecciones en estas etapas (Lastra *et al.*, 2004).

Se han observado efectos importantes del zinc sobre el timo. Inicialmente se encontró un efecto positivo sobre la involución del órgano. También se ha detectado que el retraso en la involución tímica es atribuible a la inhibición de la apoptosis. Este fenómeno parece estar directamente asociado con las concentraciones de zinc intracelulares (Lastra *et al.*, 2005).

J U S T I F I C A C I Ó N

La falta de zinc en la dieta de los individuos sumado a la baja biodisponibilidad del elemento en algunos alimentos hace necesario que se realicen estudios de suplementación como una forma de aportar la cantidad necesaria para alcanzar los valores de ingestión diaria recomendada y evitar la aparición de efectos adversos.

En el sistema inmune, la disminución de zinc provoca reducciones en el número total de linfocitos tanto en humanos como en animales. La linfopenia y la atrofia tímica son marcadores de la desnutrición. En general, los efectos adversos que causa la deficiencia de zinc pueden ser corregidos mediante la suplementación adecuada.

Es importante mencionar que no se debe exceder el consumo de zinc, puesto que su acumulación puede saturar y disminuir algunas funciones celulares inmunológicas importantes. Este trabajo busca demostrar que la suplementación con zinc puede mantener la citoarquitectura tímica sin causar efectos adversos a este órgano que es de gran importancia inmunológica.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo General

- Establecer el efecto que tiene la administración de zinc por vía oral sobre la histología y distribución celular del timo de ratones BALB/c en etapas perinatales

Objetivos Particulares

- Conocer y estandarizar los procedimientos para la fijación, corte y tinción histológica del timo de una cepa singénica de ratones BALB/c
- Plantear e implementar un esquema de suplementación con zinc empleando un modelo murino en etapas perinatales
- Establecer, mediante técnicas histológicas y de análisis de imágenes los efectos del zinc en el tamaño de la corteza y de la médula de los timos
- Determinar la influencia del zinc sobre el porcentaje de linfocitos en la corteza y en la médula de los timos de ratones
- Localizar y cuantificar otras poblaciones celulares de importancia inmunológica en el timo de animales suplementados con zinc, como son las células reticuloepiteliales y los corpúsculos de Hassall

Hipótesis

La suplementación con 500 µg/mL de zinc de los ratones modificará la celularidad del timo de forma benéfica sin alterar su estructura fundamental.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Suplementación y Organización de Grupos Experimentales

Se emplearon ratones machos de la cepa BALB/c del bioterio del LII, se decidió no trabajar con hembras para excluir los cambios hormonales como otra posible variable. Los animales se dividieron en grupos de acuerdo con la suplementación que recibieron (Zn0, Zn500) y a la edad (21, 28, 35, 42, 49, 56 y 63 días).

Los grupos experimentales (Zn500) recibieron 500 µg/mL de acetato de zinc (Mallinckrodt-Baker, México, Cat. 8740) en el agua de beber desde el día de cruce de los progenitores (n=21). Los grupos testigo (Zn0) no recibieron el suplemento en el agua de beber (n=21).

Los animales de ambos grupos recibieron el mismo alimento comercial (2018S, Harlan Teklad Global Diets, Madison, Winsconsin, USA). Todos los ratones se mantuvieron en cajas de plástico equipadas con cubiertas de acero y aserrín estéril; las botellas para el agua fueron de vidrio con tapa de polietileno y bebederos de acero inoxidable.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tratamiento de los Típos

Para cada edad y tratamiento, los ratones se eutanizaron empleando una cámara cerrada con éter durante 5 minutos aprox. Posteriormente, los típos íntegros se extrajeron quirúrgicamente y se sumergieron en una solución de formaldehído al 10% (J.T. Baker, USA, Cat. 8740) para ser fijados durante 6 a 24 h dependiendo del tamaño; posteriormente se deshidrataron, sumergiéndolos en soluciones de alcohol en agua destilada de mayor a menor polaridad (etanol al 50%, etanol al 70%, etanol al 96%, alcohol absoluto, alcohol absoluto:xilol (1:1) y xilol) (J.T. Baker, USA); se realizó el aclaramiento de los órganos sumergiéndolos en xilol absoluto (J.T. Baker, USA, Cat. 9490-03) durante 1 a 6 h y se incluyeron en parafina para histología (Merck, Darmstadt, Alemania, Cat. 7163) en horno a 60°C durante 30 min a 6 h. Finalmente se obtuvieron cortes de 4µm de grosor por triplicado mediante el uso de un microtomo (Leica, Mod. RM2125RT, Alemania), los cuales fueron adheridos a portaobjetos tratados previamente con adherente Histogrip (Zymed, San Francisco California, USA, Cat. 00-8050) (Boenisch, 2001).

Desparafinación

La desparafinación se realizó sumergiendo los cortes en xilol absoluto (J.T. Baker, USA, Cat. 9490-03) durante 15 minutos. Posteriormente se hidrataron de los tejidos sumergiéndolos en los siguientes disolventes*:

Xilol ¹	2 cambios de 5 minutos
Xilol:Alcohol absoluto (1:1)	1 cambio de 3 minutos
Alcohol absoluto ²	1 cambio de 2 minutos
Etanol al 96%	1 cambio de 2 minutos
Etanol al 70%	1 cambio de 2 minutos
Etanol al 50%	1 cambio de 2 minutos

*J.T. Baker, USA, ¹Cat. 9490-03, ²Cat. 9401-01

Tinción y Análisis Histológico

Se llevó a cabo un estudio histológico tradicional del timo empleando tinciones de hematoxilina-eosina y se complementó mediante el uso de un programa computacional para el análisis de imágenes que nos permitió efectuar la identificación y cuantificación automática de elementos celulares en los cortes.

Se realizó la tinción con hematoxilina (J.T. Baker, USA, Cat. 3870) y eosina (J.T. Baker, USA, Cat. 3871); finalmente se adicionó el medio de montaje (Zymed, San Francisco California, USA, Cat. 95-9541).

Para el estudio histológico de los timos y la captura y el análisis de las imágenes se empleó un microscopio modelo BX5 Professional Series y el programa *Motic Image Advanced 3.1*.

Análisis Estadístico

En los casos que se indican, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) empleando el programa *GraphPad Prism 4.03*. y posteriormente la prueba *t de Student*, considerando como significancia estadística una $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El órgano linfoide que analizamos en este protocolo es el timo, su importancia radica en que en éste se lleva a cabo la maduración y diferenciación de los linfocitos T, los cuales son fundamentales para llevar a cabo la respuesta inmune celular. En la corteza del timo las células que predominan son los linfocitos los cuales son más diferenciados en inmunocompetentes mientras más cercanos estén a la médula (Jin *et al.*, 2006).

Con el propósito de profundizar en los efectos del zinc sobre la histología del timo, en este trabajo analizamos la corteza y la médula del timo de los ratones BALB/c de 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 63 días de edad y suplementados con zinc desde el día de cruce de sus progenitores. Los grupos testigo correspondientes no recibieron la suplementación (Figura 3).

Como se esperaba, en los cortes histológicos se observó que en la corteza tímica las células que predominan son los linfocitos, células con un núcleo muy grande y poco citoplasma, que con la tinción de hematoxilina-eosina adquirieron un color morado intenso o púrpura. Por otra parte en la médula también observamos menor cantidad de linfocitos, células reticuloepiteliales y corpúsculos de Hassall; estas últimas dos subpoblaciones celulares se tiñeron de color rosa con la eosina.

Las diferencias celulares anteriormente descritas hicieron posible identificar y analizar las zonas histológicas del timo, así como las diferentes estirpes celulares presentes sin mostrar cambios notables entre los grupos aún bajo el criterio del observador experto.

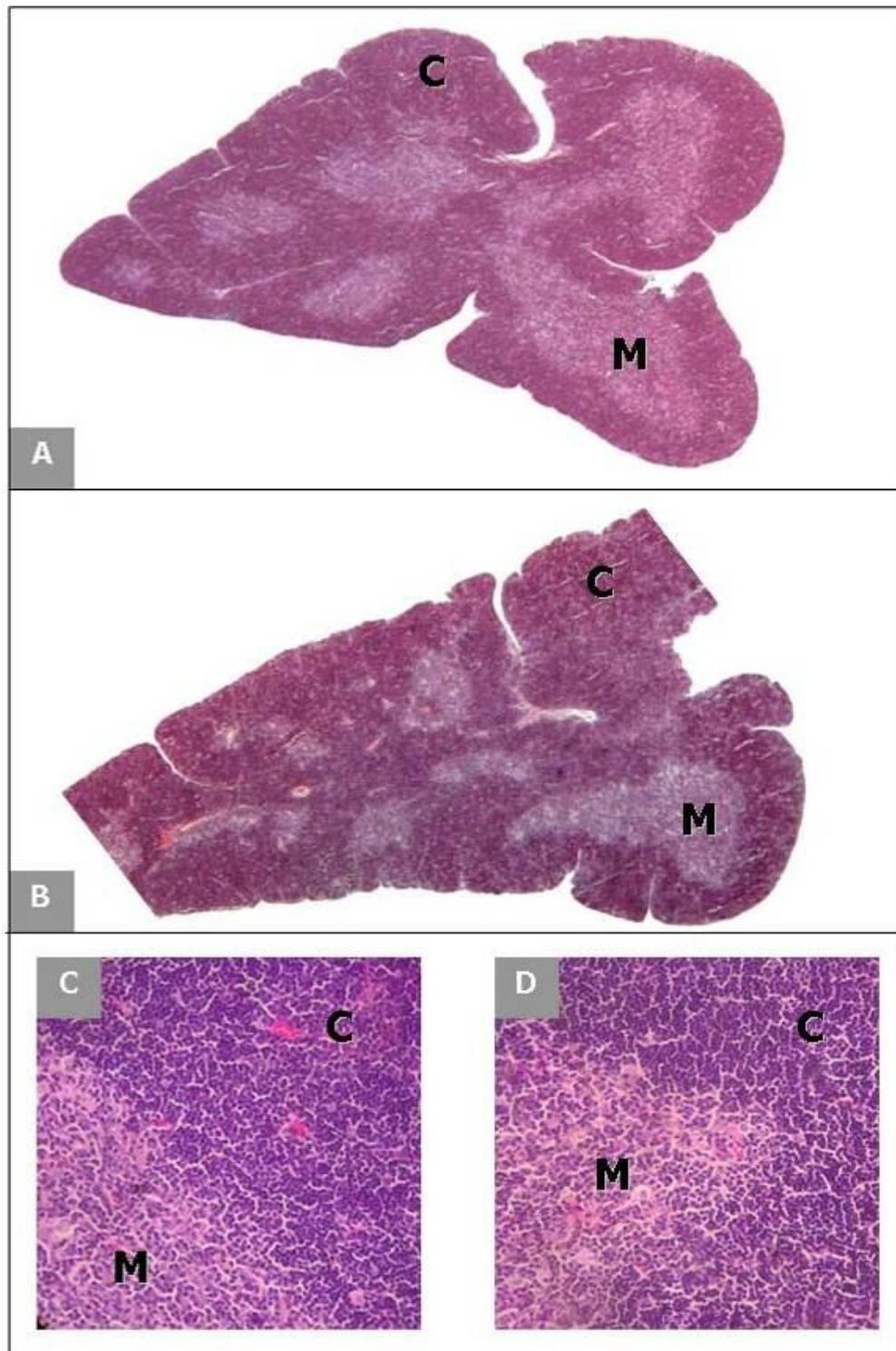


Figura 3. Corte longitudinal de timo de ratones Zn500 A y C y Zn0 B y D. Aumento 40x y 400x. La corteza del timo se observó de color morado intenso debido a la afinidad que tiene la hematoxilina por los componentes nucleares, en esta zona predominan los linfocitos. La médula se observó de un tono más claro, en esta región encontramos linfocitos (en menor cantidad), células epiteliales, macrófagos y corpúsculos de Hassall. La suplementación con zinc no ocasionó diferencias en el tamaño de estas regiones.

Para obtener resultados cuantitativos, se continuó el protocolo empleando el programa *Motic Image Advanced 3.1*. La figura 4 explica el procedimiento para cuantificar el área de la corteza y de la médula de cada timo por campo a un aumento de 40x.

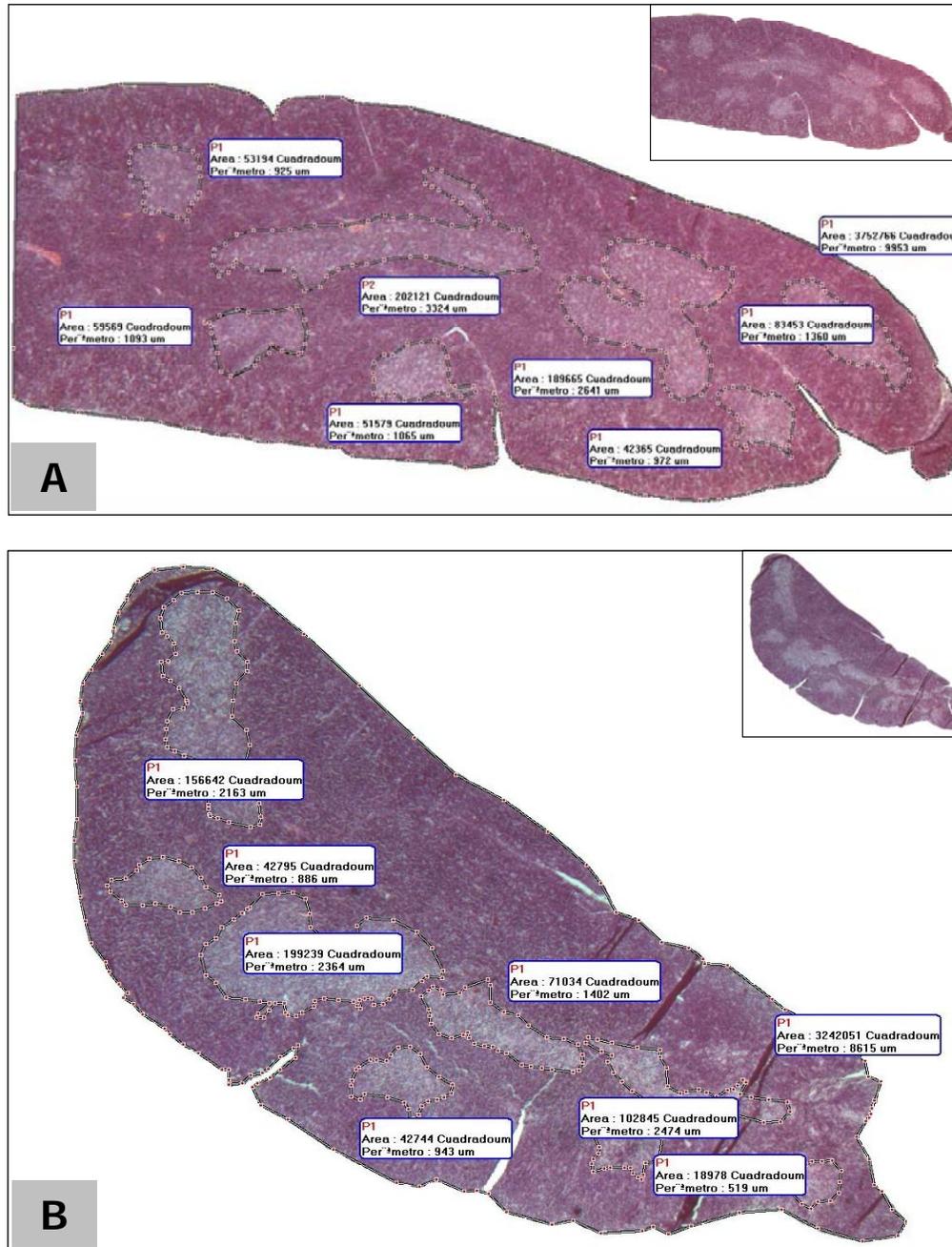


Figura 4. Corte longitudinal de timo de un ratón de 49 días de edad, aumento 40x.

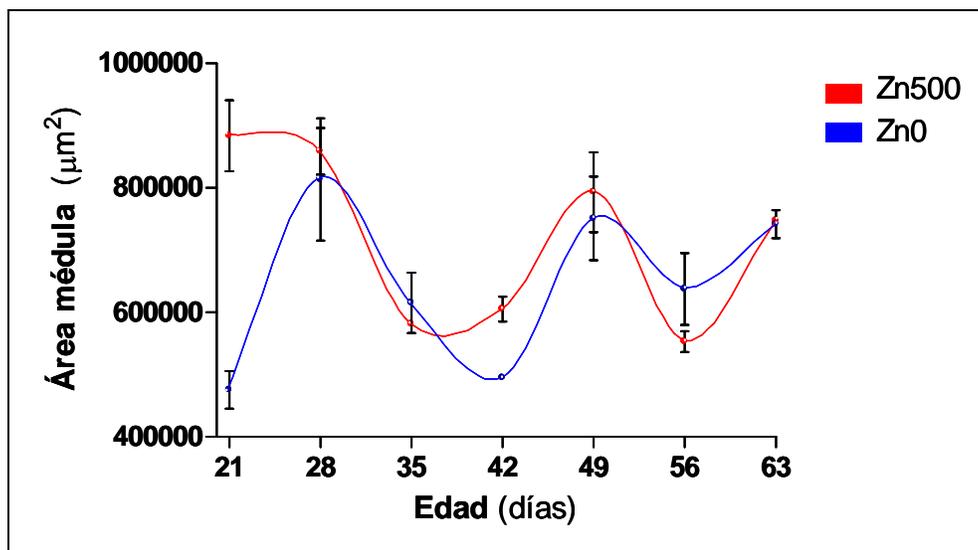
A Zn500 B Zn0. En el recuadro superior derecho de ambas imágenes se muestra la figura panorámica del corte. En la figura principal correspondiente observamos seleccionada el área total de cada corte y las áreas de la médula. La médula se encuentra seccionada. Debido a que obtuvimos cortes longitudinales, la suma de las secciones se consideró como el área total de la médula. Mediante la diferencia entre el área total del corte y el área de la médula se calculó el área de la corteza.

Los resultados para cada grupo experimental de las áreas de la corteza y de la médula se muestran en la tabla 11, con estos datos se realizaron las gráficas 1 y 2.

Edad (días)	Área médula (μm^2)		Área corteza (μm^2)	
	Zn500	Zn0	Zn500	Zn0
21	883721	475421	4933708	1990496
28	858754	813413	3204151	3173075
35	581207	615228	2463899	3730383
42	605104	494866	2232928	2403558
49	793159	750890	3890102	2580281
56	552982	637436	1679105	1852399
63	747458	741762	2134512	3364553

Tabla 11. Efecto de la suplementación con zinc sobre el área de la corteza y de la médula. Se muestran los valores promedio del área de la corteza y de la médula típicas de ratones suplementados con zinc (Zn500) y sus testigos (Zn0)

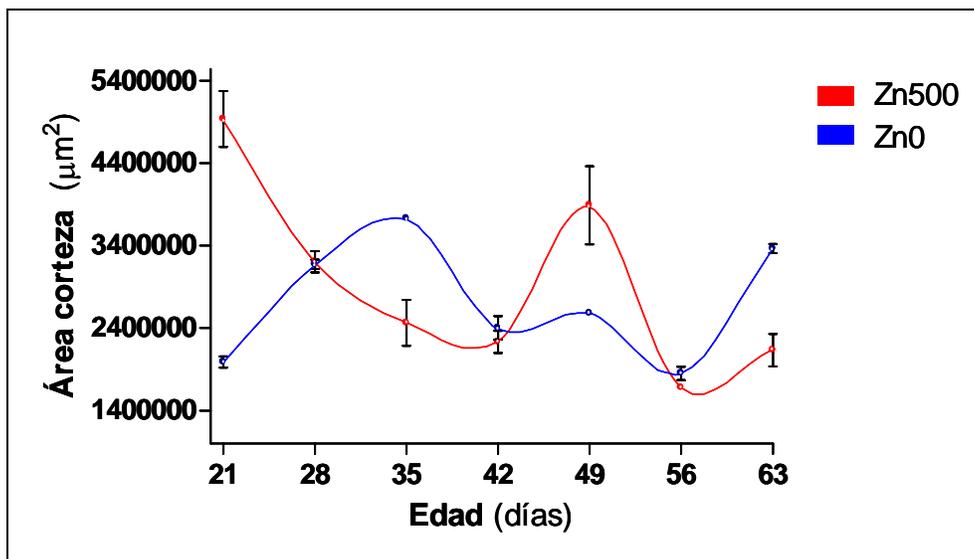
Como se observa en los testigos (Zn0), el área de la médula tiende a disminuir con la edad y se observa con respecto al tiempo de suplementación que para los ratones Zn500 el área fue mayor comparada con los Zn0, excepto a los 35 y 56 días. En los ratones de 21 días, Zn500 esta diferencia se acentúa.



Gráfica 1. Área de la médula del timo. Observamos que para los ratones de 21 y 42 días Zn500 el área medular es mayor respecto a los testigos. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. (*t de Student* $p > 0.05$, GraphPad Prism 4.03).

En cuanto al área de la corteza para los animales Zn500 se observa una tendencia a disminuir con la edad y los testigos tienen un comportamiento similar.

Podemos explicar por qué en los ratones Zn500 de 21 días observamos que las áreas de la corteza y de la médula fueron mayores respecto a sus testigos; esto se puede deber a que las crías obtuvieron mayor cantidad de zinc de la leche materna y la gestación pero una vez terminado el periodo de lactancia, la cantidad de zinc que recibieron provino exclusivamente del suplemento contenido en el agua de consumo. Además en etapas tempranas el sistema inmunológico no ha madurado completamente y como se ha mostrado en trabajos previos podría verse modificado con mayor facilidad (Lastra *et al*, 2004).



Gráfica 2. Área de la corteza del timo. Observamos que el área de la corteza de los ratones de 21 y 49 días Zn500 es mayor respecto a los testigos. No se encontraron diferencias significativas (*t de Student* $p > 0.05$, GraphPad Prism 4.03).

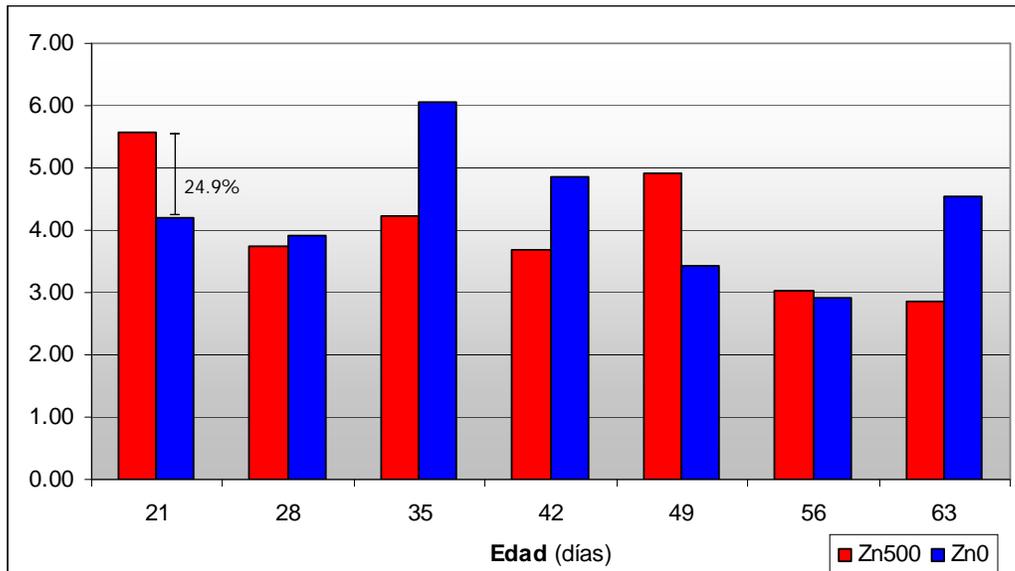
En resumen, en las graficas 1 y 2 se puede observar que no hay cambios significativos en las áreas de la médula ni de la corteza debidas a la suplementación con zinc. Pero si se observó que, con respecto a la edad, el área de la médula tiende a disminuir ligeramente en ambos grupos (Zn500 y Zn0). La corteza también presentó ese comportamiento.

Con los valores de área de corteza y médula se calculó el índice corteza/médula (Tabla 12) para evaluar algún cambio en la proporción de estas zonas respecto al tratamiento o a la edad (Gráfica 3).

Los valores de índice corteza/médula fueron mayores en los ratones Zn500 a los 21 y 49 días, mientras que en el valor fue marcadamente mayor para los grupos Zn0 a los 35 y 63 días. En general no observamos relación entre el índice corteza/médula y la edad o el tratamiento. La disminución en el índice corteza/médula muestra una disminución de los componentes de la corteza.

Edad (días)	Índice C/M	
	Zn500	Zn0
21	5.58	4.19
28	3.73	3.90
35	4.24	6.06
42	3.69	4.86
49	4.90	3.44
56	3.04	2.91
63	2.86	4.54

Tabla 12. Índice corteza/médula



Gráfica 3. Índice corteza-médula. El índice corteza/médula del grupo Zn500, 21 d se incrementó un 24.9% comparado con su testigo y un 29.8% en los animales de 49 días. Mientras que en los ratones Zn500 de 35, 42 y 63 días hubo un decremento del 30, 24.1 y 37% respectivamente.

Además de estudiar la influencia del zinc en el tamaño de la corteza y de la médula, es importante conocer su influencia en la cantidad y distribución de células de importancia inmunológica en este órgano.

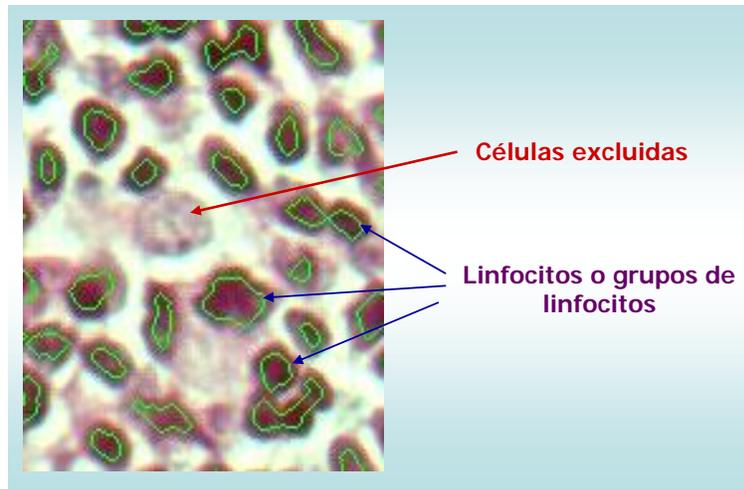


Figura 5. Identificación de linfocitos en los cortes del timo. Los linfocitos o grupos de linfocitos fueron distinguidos en verde por el programa de acuerdo al color adquirido con la tinción de hematoxilina-eosina, de tal forma que se seleccionaron las células teñidas de color púrpura y se excluyen las células débilmente teñidas o teñidas en color rosa.

Continuando con el análisis histológico, se calculó el porcentaje de linfocitos en la corteza y en la médula tímicas. Para ello se eligieron aleatoriamente tres campos de la corteza de cada timo y se analizaron con un aumento de 400x empleando el programa *Motic Image Advanced 3.1*.

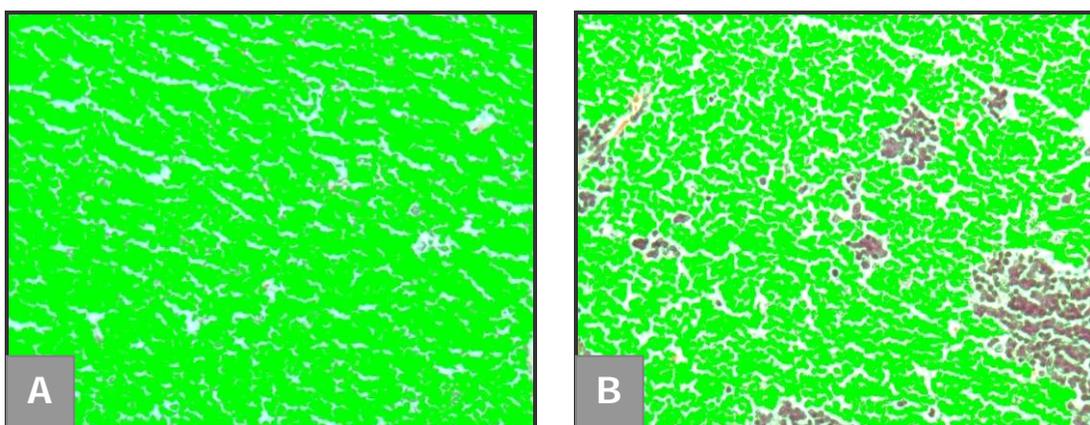


Figura 6. Corteza tímica de ratones de 28 días de edad, aumento 400x. A. Zn500 B. Zn0. El área seleccionada por el programa en color verde corresponde a los linfocitos presentes en la corteza. Comparando el porcentaje promedio de linfocitos por campo, observamos que para el grupo suplementado con zinc fue de 79.7%, mientras que para el testigo fue de 69.8% a esta edad.

Nuestros resultados muestran que la proporción de linfocitos en la corteza del timo fue superior para los ratones Zn500 de los 21 a los 35 días de edad respecto a sus testigos; en cambio para los últimos periodos estudiados se observó una menor cantidad de linfocitos en los ratones suplementados con zinc, aunque esta disminución no fue significativa. Estas últimas observaciones concuerdan con hallazgos previos en nuestro Laboratorio, en los cuales se demostró que la suplementación oral con zinc por periodos prolongados, en el modelo murino empleado, puede ocasionar efectos desfavorables como la disminución de la capacidad funcional de los macrófagos (Lastra *et al.*, 2001).

Edad (días)	Linfocitos en la Corteza (% células)		Infiltración hacia la médula (% células)	
	Zn500	Zn0	Zn500	Zn0
21	78.16	76.98	21.68	18.02
28	79.74	69.81	31.75	18.46
35	78.53	74.75	*33.88	18.74
42	68.54	79.40	31.32	35.58
49	64.54	66.36	29.05	23.37
56	72.24	76.71	29.94	28.87
63	73.33	72.75	31.43	27.19

*p<0.05

Tabla 13. Proporción de linfocitos en la corteza y en la médula tímicas. Se muestran los valores promedio del porcentaje de linfocitos en la corteza y en la médula tímicas de ratones suplementados con zinc (Zn500) y sus testigos (Zn0).

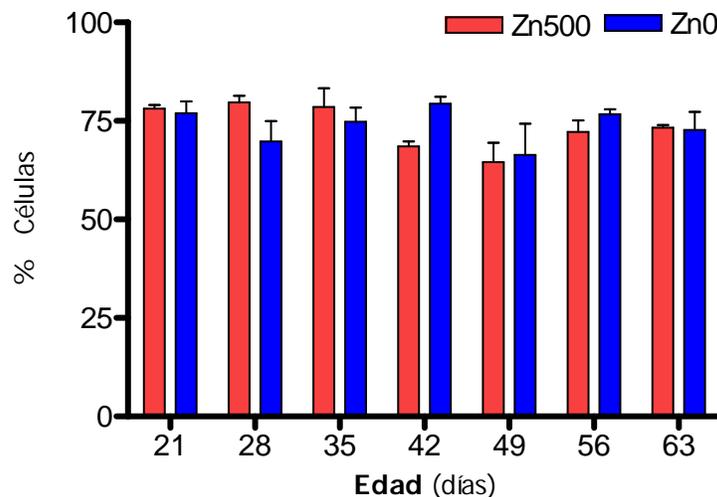


Gráfico 4. Porcentaje de linfocitos en la corteza tímica. El incremento de linfocitos en los ratones Zn500 a los 21, 28 y 35 días de edad fue de un 1.5, 12.5 y 4.8% respectivamente en relación con los testigos. Para los animales de 42, 49 y 56 días de edad hubo una disminución en el número de linfocitos en los grupos Zn500 del 13.7, 2.7 y 5.8% respectivamente. (*t de Student* p>0.05, GraphPad Prism 4.03).

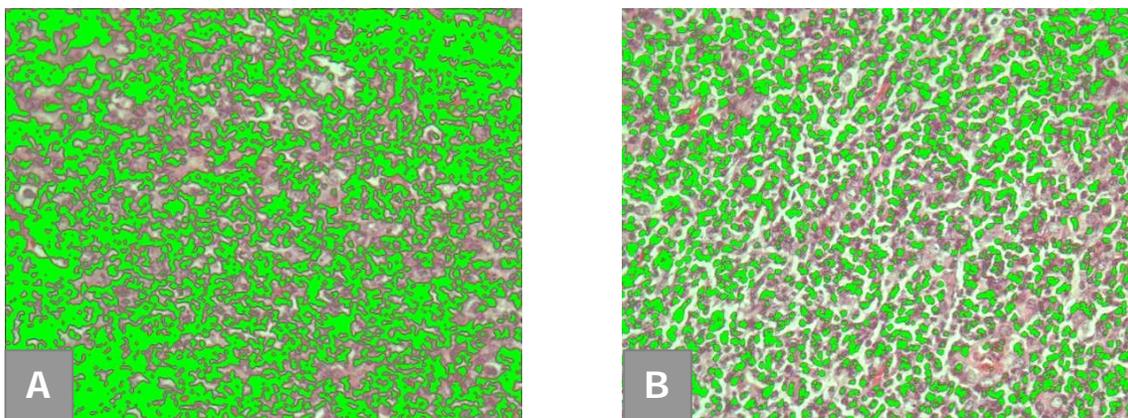
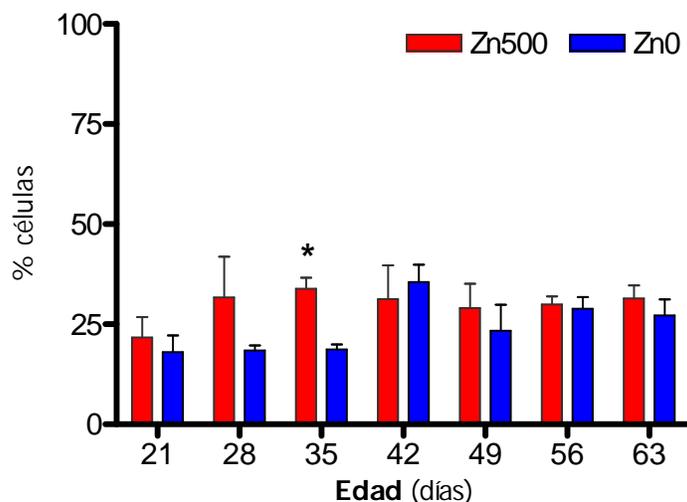


Figura 7. Médula tímica de ratones de 28 días de edad, aumento 400x. A. Zn500 B. Zn0. La zona en verde corresponde a los linfocitos seleccionados por el programa en la médula del timo. El porcentaje promedio de linfocitos infiltrados en la médula para los ratones suplementados con zinc fue 31.7%, mientras que en los testigos fue 18.5%.

En la médula tímica existe una menor cantidad de linfocitos que en la corteza, como se muestra en la tabla 13. Estos linfocitos infiltrados en la médula ya se han diferenciado y están listos para ser exportados a la periferia (Taub y Longo, 2005). El porcentaje de linfocitos infiltrados en la médula fue superior para los grupos Zn500 respecto a los testigos, a excepción de los ratones de 42 días de edad (disminución del 12%). Mediante la prueba *t de Student* se determinó que existe un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos en la médula de los ratones de 35 días, Zn500 (GraphPad Prism 4.03). Estos resultados indican que el zinc tiene un efecto positivo en la cantidad de linfocitos diferenciados en el timo.



Gráfica 5. Porcentaje de linfocitos infiltrados en la médula tímica. Se muestra un incremento en el porcentaje de linfocitos de los ratones Zn500 en todas las edades (excepto a 42 días) en relación a los testigos. Las diferencias fueron de 16.9, 41.9, 44.7, 19.6, 3.6 y 13.5% a los 21, 28, 35, 49, 56 y 63 días respectivamente. Mediante la prueba *t de Student* se determinó que en los ratones de 35 días de edad, la suplementación con zinc tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$).

Además de nuestros hallazgos, en la literatura se tienen datos relacionados de efectos benéficos de este nutrimento en el timo, por ejemplo el grupo investigación de PJ Fraker y LE King en el 2004 demostró que la suplementación con sulfato de zinc en el agua de beber en ratones puede incrementar la masa tímica y la timopoyesis. De igual forma, E Mocchegiani y N Fabris en 1995 demostraron que la suplementación con zinc produce un aumento en la secreción de timulina en ratones de edad avanzada y por su parte AS Prasad en 1988 demostró que el zinc tiene un efecto benéfico en la función del timo en humanos (Mitchell *et al.*, 2006).

En contraste, la carencia de zinc en el organismo también se ha estudiado; en 2002 el grupo de King observó que la deficiencia de zinc en ratones puede acelerar la apoptosis de los timocitos CD4⁺CD8⁺ de un 50 a un 300%, esto conlleva a una alteración fenotípica en la composición celular en el timo. Si la deficiencia persiste durante varios días se puede presentar una pérdida de entre el 70 al 80% en la celularidad, con la aparición de atrofia tímica. Nuestros resultados demuestran que la suplementación con zinc puede aumentar la cantidad de linfocitos en la médula del timo; además, en los periodos de suplementación empleados no observamos una disminución importante en la celularidad de la corteza.

Para analizar los efectos del zinc en la apariencia de la unión córticomedular se realizó un análisis histológico tradicional de los cortes de timo de ratones suplementados (Zn500) y sus testigos (Zn0). En la figura 8 se muestra el criterio empleado para realizar el análisis de la apariencia de la unión córticomedular. En este caso se eligió aleatoriamente un campo del corte en donde se apreciara la corteza y la médula y se le asignó un valor a la unión córticomedular.

Esta región es reconocida por la abundancia de vasos sanguíneos y porque las trabéculas pueden llegar hasta la médula (Taub y Longo, 2005). Además, en esta zona ingresan las células progenitoras provenientes de la médula ósea y se inicia el proceso de desarrollo linfocitario (Jin *et al.*, 2006; Blackburn y Manley, 2004).

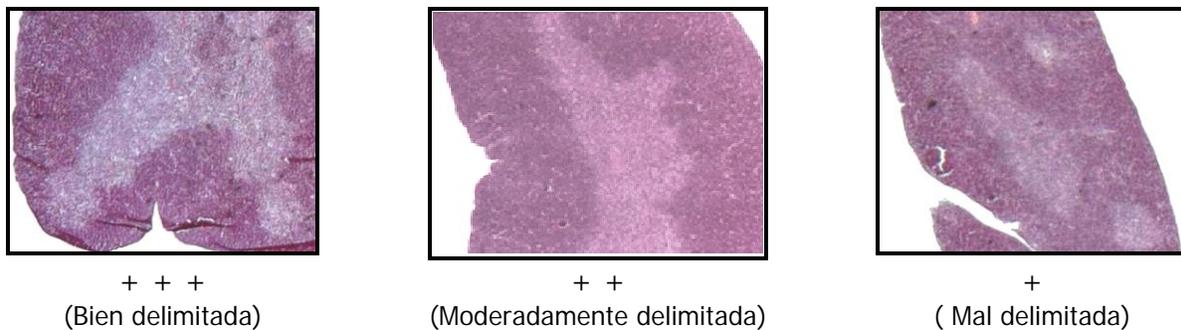


Figura 8. Criterio para la definición de la unión córticomedular

Nuestros datos sugieren que probablemente la infiltración linfocitaria hacia la médula debida a la suplementación con zinc ocasionó que la unión córticomedular se observara menos definida en los ratones suplementados con zinc, estos resultados se muestran en la tabla 14.

Edad (días)	Aspecto de la unión córticomedular	
	Zn500	Zn0
21	+	++
28	+	++
35	++	+++
42	++	+
49	++	++
56	+	++
63	++	++

Tabla 14. Análisis de la unión córticomedular del timo. Se observaron las uniones córticomedulares moderadamente delimitadas y mal delimitadas en los cortes de ratones Zn500. En cambio los cortes analizados de ratones Zn0 mostraron uniones córticomedulares bien delimitadas y moderadamente delimitadas y en ratones de 35 días se observó una unión bien delimitada.

Otras células que conforman el estroma tímico y que además tienen importancia inmunológica son las células reticuloepiteliales. Estas células se localizan en la zona medular del timo. Para cuantificar esta estirpe celular se realizó la observación de células con un aumento de 400x y se contó el número de células en tres campos diferentes, en la tabla 15 se menciona únicamente el valor mayor.

En la figura 9 se observa la morfología de estas células, las cuales se tiñen débilmente con hematoxilina-eosina; en comparación con los linfocitos, estas células son más grandes y con más citoplasma.

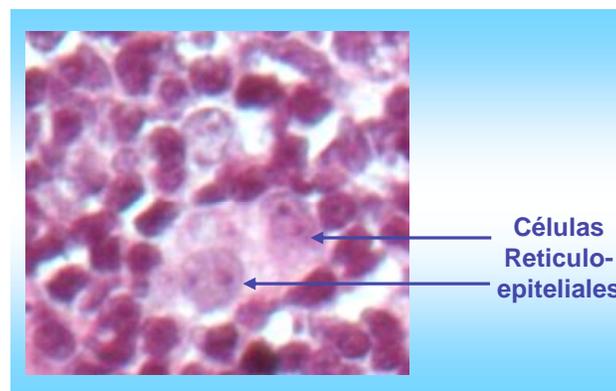


Figura 9. Células reticuloepiteliales. Aumento 400x y zoom. A diferencia de los linfocitos, las células reticuloepiteliales se tiñeron suavemente con la tinción de hematoxilina-eosina; estas células son más grandes que los linfocitos. Se puede llegar a confundir con los macrófagos debido a la forma y al tamaño cuando se emplea esta técnica histológica. No hubo diferencia entre los grupos con zinc y sus testigos.

La formación del microambiente tímico depende de la interacción entre las células epiteliales y los progenitores de los timocitos. Aún cuando se tenga un número adecuado de progenitores de linfocitos, se puede presentar involución tímica debida a deficiencia de células estromales como las células epiteliales. Estas células se encuentran divididas en poblaciones de acuerdo con su etapa de diferenciación (Aspinall y Andrew, 2000; Klug *et al.*, 1998).

En este trabajo observamos que no hay diferencia significativa entre el número de células reticuloepiteliales debida a la suplementación con zinc (Tabla 15).

Como antecedente y acorde con nuestros resultados, en el 2006 observamos que la suplementación *in vivo* con zinc durante la gestación, lactancia y postlactancia disminuye la involución tímica en ratones (Lastra *et al.*, 2006).

La atrofia tímica se ha visto influenciada por las metalotioneínas (isoformas I+II y III). Son enzimas de unión al zinc y su inducción está controlada por los glicocorticoides (los cuales aumentan cuando hay deficiencia de zinc) y por citocinas proinflamatorias como la IL-6. Ambos factores aumentan con la edad y además la IL-6 también se asocia a la desregulación tímica; un alto contenido de metalotioneínas es dañino en la senectud, ya que secuestran al zinc y provocan alteraciones a otras proteínas como la timulina (Mocchegiani *et al.*, 2004; Boukaiba *et al.*, 1993).

La importancia del zinc en el timo también ha sido estudiada por Dardenne y colaboradores en 1993, quienes encontraron que la suplementación oral en ratones de edad avanzada produce incremento en las concentraciones de timulina en circulación y al mismo tiempo un decremento de los inhibidores plasmáticos de esta proteína. Simultáneamente observaron un aumento en el tamaño y celularidad del timo, así como cambios estructurales en las células epiteliales y en las redes de la matriz extracelular.

Edad (días)	Células Reticuloepiteliales	
	Zn500	Zn0
21	35	40
28	35	30
35	20	32
42	50	20
49	40	35
56	36	30
63	40	40

Tabla 15. Células reticuloepiteliales en la médula tímica. De forma general no se observaron diferencias entre los grupos Zn500 y Zn0, excepto en los animales de 42 días, Zn500 donde observamos un aumento en el número de células reticuloepiteliales.

Otra subpoblación celular estudiada en este protocolo fueron los corpúsculos de Hassall, que son agrupaciones de células epiteliales que se encuentran en la médula tímica. Fueron descritos en 1849 por Arthur Hill Hassall. Se ha sugerido que éstas células participan en la eliminación de timocitos y representan un área privilegiada de la médula en donde pueden madurar los linfocitos (Watanabe *et al.*, 2005).

Para este estudio se eligieron aleatoriamente tres campos de la médula y se realizó el conteo de los corpúsculos de Hassall a un aumento de 400x (Figura 10) como se describió para las células reticuloepiteliales. En la tabla 16 se muestra el intervalo encontrado para cada corte analizado.

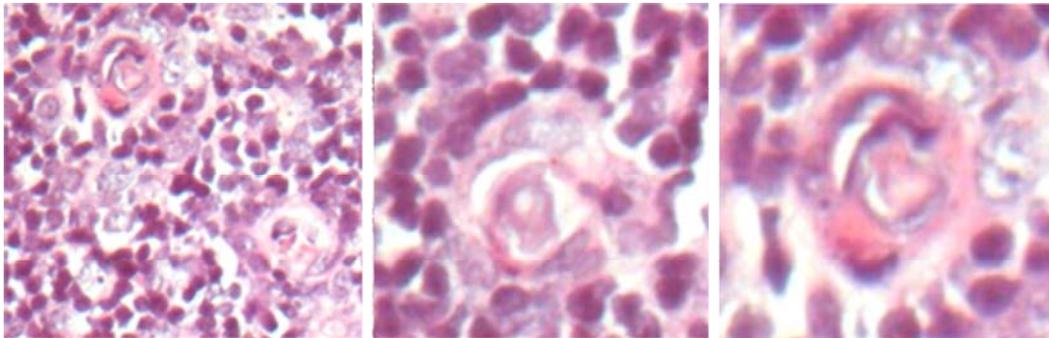


Figura 10. Corpúsculos de Hassall. Aumento 400x y zoom. Los corpúsculos de Hassall son células queratinizadas eosinófilas, se tiñeron de color rosa con la tinción de hematoxilina-eosina. Son células más grandes que las células reticuloepiteliales, las encontramos en la médula. No observamos diferencias significativas entre los grupos suplementados y sus testigos.

Como vemos en la tabla 16, la cantidad de corpúsculos de Hassall en la médula tímica fue muy baja. Se observaron estas células en los ratones Zn500 a los 21, 28, 49, 56 y 63 días de edad, mientras que en los Zn0 únicamente los observamos a los 56 y 63 días de edad.

El análisis de estas células aporta nuevos datos a los estudios realizados previamente en el Laboratorio, demostrando que la suplementación con zinc no afecta significativamente al número de corpúsculos de Hassall en el timo, aún cuando observamos una mayor cantidad.

Edad (días)	Corpúsculos de Hassall	
	Zn500	Zn0
21	1	0
28	1	0
35	0	0
42	0	0
49	1	0
56	3	1

Tabla 16. Conteo de Corpúsculos de Hassall en la médula tímica. El número fue muy bajo en los grupos Zn500 y en los testigos.

Se han realizado otros estudios en donde se ha confirmado que los corpúsculos de Hassall son células activas que tienen receptores de citocinas o de factores de crecimiento involucrados en la señalización, la transcripción y el metabolismo celular. Es posible que expresen interleucinas como la IL-7, el TGF- α (factor de crecimiento transformante), al ligando de CD30, el SDF-1 (factor derivado de las células estromales-1) y MDC's (quimiocinas derivadas de macrófagos). Estos hallazgos sugieren que los corpúsculos de Hassall participan en la comunicación para el desarrollo de las células T y para la presentación de antígenos dentro del timo.

Se ha demostrado que los corpúsculos de Hassall expresan linfopoyetina tímica estromal (TSLP), en los humanos esta proteína activa a las células dendríticas tímicas CD11c⁺ para expresar cantidades altas de CD80 y CD86, lo que trae como consecuencia la proliferación y diferenciación de las células T CD4⁺ CD8⁻ CD25⁻ tímicas a células T CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ reguladoras (Watanabe *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

- La suplementación con zinc no produjo cambios significativos en el tamaño de la médula ni de la corteza, pero si se observó una ligera disminución en ambas zonas con la edad
- En el periodo estudiado no hubo pérdida importante en la celularidad linfocitaria de la corteza tímica. Además, la cantidad de linfocitos infiltrados en la médula de los ratones suplementados fue mayor en casi todas las edades y tuvo un incremento significativo en los ratones de 35 días. Esto implica que el zinc tiene un efecto positivo en la maduración y diferenciación celular en el timo
- Se propone que el aumento de la infiltración linfocitaria hacia la médula ocasionó un cambio en la definición de la unión córticomedular de los ratones suplementados en casi todas las edades
- La suplementación con zinc no afecta al número de células reticuloepiteliales, las cuales son indispensables para tener un microambiente tímico adecuado y para la diferenciación de las células efectoras de la respuesta inmune
- Finalmente se observó un ligero aumento en el número de corpúsculos de Hassall en los ratones Zn500 a edades tempranas en comparación con sus testigos; sin embargo este aumento no fue significativo; estas células son importantes para la maduración y eliminación de linfocitos
- En nuestro modelo la suplementación oral con zinc no modifica la estructura tímica pero mejora la celularidad de la médula sin tener efectos adversos

P E R S P E C T I V A S

Debido a que en este trabajo se muestra que la suplementación con zinc aumentó la celularidad en la médula del timo, sería conveniente investigar el fenotipo de estos linfocitos. El análisis se puede llevar a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas, poniendo de manifiesto *in situ* a las células que tengan un marcador específico.

Dado que las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ son las principales poblaciones efectoras de la respuesta inmune, estos serían los marcadores esenciales para identificarlos. De esta forma podríamos evaluar si el zinc tiene algún efecto que conduzca a incrementar o disminuir alguna de estas dos subpoblaciones, ya que actualmente se tienen pocas referencias al respecto.

La cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos también se puede realizar mediante inmunofluorescencia por citometría de flujo, aun cuando no sería posible observar la distribución de las células en los cortes del órgano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aboul-Fadl T, 2005. Selenium derivatives as cancer preventive agents. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 5, 637-652.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2008 The adaptative immune system. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, EUA, 1539-1601.
3. Arthur JR, McKenzie RC, Beckett GJ, 2003. Selenium in the immune system. *J. Nutr.* 133, 1457S-1459S.
4. Aspinall R, Andrew D, 2000. Thymic involution in aging. *J. Clin. Immunol.* 20, 250-256.
5. Blackburn CC, Manley NR, 2004. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nature* 4, 278-289.
6. Boenisch T, 2001 Handbook of immunochemical staining methods, 3th edition. DAKO, California, EUA, 18-23, 26-32.
7. Bourges H, Casanueva E, Rosado JL, 2005 Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases Fisiológicas. Editorial Médica Panamericana, México, 267-272.
8. Boukaiba N, Flament C, Acher S, Chappuis P, Piau A, Fusselier M, Dardenne M, Lemonnier D, 1993. A physiological amount of zinc supplementation: effects on nutritional, lipid, and thymic status in an elderly population. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 566-572.
9. Dardenne M, Boukaiba N, Gagnerault MC, Homo-Delarche F, Chappuis P, Lemonnier D, Savino W, 1993. Restoration of the thymus in aging mice by in vivo zinc supplementation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 66, 127-135.
10. Failla ML, 2003. Trace elements and host defense: recent advances and continuing challenges. *J. Nutr.* 133, 1443S-1447S.
11. Fragoso G, Lastra MD, Aguilar AE, Pastelin R, Rosas G, Meneses G, Scitutto E, Lamoyi E, 2001. Effect of oral zinc supplementation upon *Taenia crassiceps* murine cysticercosis. *J. Parasitol.* 87, 1034-1039.
12. Fraker PJ, King LE, 2001. A distinct role for apoptosis in the changes in lymphopoiesis and myelopoiesis created by deficiencies in zinc. *FASEB J.* 15, 2572-2578.
13. Haase H, Mocchegiani E, Rink L, 2006. Correlation between zinc status and immune function in the elderly. *Biogerontology.* 7, 421-428.
14. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, 2001. *Immunobiology*, 5th edition. Garland Publishing, New York.
15. Jin R, Zhang J, Chen W, 2006. Thymic output: influence factors and molecular mechanism. *Cell Mol. Immunol.* 3, 341-350.
16. Kahmann L, Uciechowski P, Warmuth S, Malavolta M, Mocchegiani E, Rink L, 2006. Effect of improved zinc status on T helper cell activation and Th1/Th2 ratio in healthy elderly individuals. *Biogerontology.* 7, 429-435.

17. King LE, Osati-Ashtiani F, Fraker PJ, 2002. Apoptosis plays a distinct role in the loss of precursor lymphocytes during zinc deficiency in mice. *J. Nutr.* 132, 974-979.
18. Klug D, Crouch E, Carter C, Roop D, Conti C, Richie E, 1998. Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 11822-11827.
19. Lastra MD, Aguilar AE, Cabañas MA, Hernández R, Humaney K, Pastelin R, 2004. Interleukin-1 α , Tumor Necrosis Factor- α , and Interleukin-12 secreted by zinc-induced murine macrophages *in vivo* and *in vitro*. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 17, 123-135.
20. Lastra MD, Aguilar AE, Munguia N, Saldivar L, 2006. Thymus, apoptosis and zinc. *Metal Ions in Biology and Medicine* 9, 366-369.
21. Lastra MD, Pastelin R, Camacho A, Monroy B, Aguilar AE, 2001. Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 15, 5-10.
22. Lastra MD, Pastelin R, Herrera MA, Orihuela VD, Aguilar AE, 1997. Increment of immune responses in mice perinatal stages after zinc supplementation. *Arch. Med. Res.* 28, 67-72.
23. Lastra MD, Saldivar L, Martinez K, Munguia N, Marquez C, Aguilar AE, 2005. Zinc concentrations during mice gestation. *Biol. Trace Elem. Res.* 105, 205-214.
24. López P, Castañeda M, López G, Muñoz E, Rosado JL, 1999. Contenido de hierro, zinc y cobre en los alimentos de mayor consumo en México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 49, 287-294.
25. Méndez RO, Bueno K, Campos N, López D, Wyatt CJ, Ortega MI, 2005. Contenido total y disponibilidad *in vitro* de hierro y zinc en alimentos de mayor consumo en Sonora y Oaxaca, México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 55, 187-193.
26. Mitchell WA, Meng I, Nicholson SA, Aspinall R, 2006. Thymic output, ageing and zinc. *Biogerontology.* 7, 461-470.
27. Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Gasparini N, Malavolta M, 2004. Are zinc-bound metallothionein isoforms (I+II and III) involved in impaired thymulin production and thymic involution during ageing? *Immun. Ageing* 1, 5.
28. Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, 2001. *Medical Immunology*, 10th edition. Lange, EUA, 40-60.
29. Prasad AS, 1998. Zinc deficiency in humans: a neglected problem. *J. Am. Coll. Nutr.* 17, 542-543.
30. Prasad AS, Beck FW, Bao B, Fitzgerald JT, Snell DC, Steinberg JD, Cardozo LJ, 2007. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 837-844.
31. Prasad AS, Kucuk O, 2002. Zinc in cancer prevention. *Cancer and Metastasis Reviews* 21, 291-295.
32. Raqib R, Hossain MB, Kelleher SL, Stephensen CB, Lonnerdal B, 2007. Zinc supplementation of pregnant rats with adequate zinc nutrition suppresses immune functions in their offspring. *J. Nutr.* 137, 1037-1042.
33. Rodewald HR, 2008. Thymus organogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 355-388.

34. Rosado JL, Bourges H, Saint-Martin B, 1995. Deficiencia de vitaminas y minerales en México, una revisión crítica del estado de la información, I: deficiencia de minerales. *Salud Pública Mex.* 37, 130-139.
35. Rosado JL, Camacho-Solis R, Bourges H, 1999. Addition of vitamins and minerals to corn and wheat flour in Mexico. *Salud Publica Mex.* 41, 130-137.
36. Rosado JL, López P, Muñoz E, Martínez H, Allen LH, 1997. 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.
37. Shankar AH, Prasad AS, 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 447S-463S.
38. Taub DD Longo DL, 2005. Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol. Rev.* 205, 72-93.
39. Vallee BL, Falchuk KH, 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 73, 79-118.
40. Villalpando S, García-Guerra A, Ramírez-Silva CI, Mejía-Rodríguez F, Matute G, Shamah-Levy T, Rivera JA, 2003. Iron, zinc and iodide status in Mexican children under 12 years and women 12-49 years of age. A probabilistic national survey. *Salud Pública Mex.* 45 Suppl 4, S520-S529.
41. Walker CF, Black RE, 2004. Zinc and the risk for infectious disease. *Annual Review of Nutrition* 24, 255-275.
42. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ, 2005. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436, 1181-1185.

S I T I O S D E I N T E R N E T

1. Hirsch S. Vitaminas y Elementos Traza. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile (INTA). Santiago, Chile. 2004. www.med.uchile.cl/apuntes/archivos/2004/medicina/vitaminas_y_elementos_traza.pdf
2. Muñoz C., Trace Elements and Immunity. Immunology Unit, INTA, University of Chile. Santiago, Chile. 2006. www.pasteur.fr/applications/euroconf/nutrition/5_Munoz_abstract.pdf
3. Penny M. The Role of Zinc in Child Health. Instituto de Investigación Nutricional, Peru. 2002. www.zincworld.org
4. El zinc en nuestra alimentación. 2008. www.zonadiet.com
5. Lenntech. Tabla Periódica. 2008. www.lenntech.com/home.htm