



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
" ZARAGOZA "

" Distribución en suero de Zinc ultrafiltrable, no ultrafiltrable
y su relación con las fracciones proteicas en niños normales "

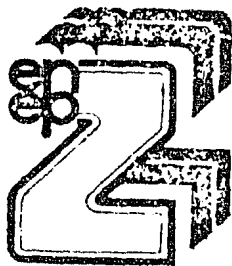
T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

GEORGINA ERNESTINA RIOS OLIVERA

Asesor: Q F.B. SILVIA DIAZ BENSUSSEN



México, D. F.

Febrero, 1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	pág.
RESUMEN	1
<u>CAPITULO</u> 1. INTRODUCCION:	
1.1. Antecedentes	3
1.2. Metabolismo del Zinc	6
1.3. Significado Biológico del Zinc	19
1.4. Significado Clínico del Zinc	28
1.5. Fundamento de los Métodos	35
1.6. Métodos Estadísticos	40
<u>CAPITULO</u> 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46
<u>CAPITULO</u> 3. OBJETIVOS	47
<u>CAPITULO</u> 4. HIPOTESIS	48
<u>CAPITULO</u> 5. METODOS:	
5.1. Determinaciones de Zinc	49
5.2. Curva de Calibración	52
5.3. Análisis por Espectrofotometría de Absorción Atómica	54
5.4. Determinación de Proteínas	56
<u>CAPITULO</u> 6. RESULTADOS :	
6.1. Curva de Calibración	60
6.2. Valores Normales	62

pág.

6.3. Equivalencia de los Métodos de Cuantificación de Zinc total	62
6.4. Valores de Zinc	63
6.5. Proteínas	65
<u>CAPITULO</u> 7. DISCUSION	77
<u>CAPITULO</u> 8. CONCLUSIONES	84
<u>CAPITULO</u> 9. BIBLIOGRAFIA	86
APENDICE:	
A.1. Instrumentos	94
A.2. Reactivos	94
A.3. Material de vidrio con lavado especial	95
A.4. Equipos	97
A.5. Material Biológico	97

RESUMEN:

Se estudian 128 niños normales a los cuales se les determina la concentración de Zinc total, Zinc ultrafiltrable y Zinc no-ultrafiltrable séricos por Espectrofotometría de Absorción Atómica. Se construye una curva de calibración registrando continuamente la desviación de la linealidad y obteniendo un Coeficiente de Determinación de 99.75%. La estimación de Zinc total en suero se realiza simultáneamente por dos métodos: el primero, es llevando el suero a cenizas y el segundo, es por precipitación de proteínas, dando como resultado que los dos métodos son equivalentes. Las concentraciones de Zinc total, Zinc ultrafiltrable y Zinc no-ultrafiltrable presentan un patrón específico sin cambios durante la infancia y adolescencia no encontrando alguna dependencia específica con respecto a la edad. El Zinc ultrafiltrable puede ser determinado en pequeños volúmenes de suero por el uso de membranas Amicon para ultrafiltración. Se considera que esta fracción ultrafiltrable está libre y/o unida a aminoácidos y que está disponible para cualquier actividad fisiológica. Se evalúa la influencia de las proteínas séricas sobre el Zinc no-ultrafiltrable encontrando una ligera asociación con las Proteínas totales, Albúmina y Transferrina, considerando efectivamente que la Albúmina y Transferrina compiten por los sitios de enlace del Zinc. Las Globulinas no presentan ninguna relación.

1. INTRODUCCION

1.1. Antecedentes.

1.2. Metabolismo del Zinc.

1.3. Significado Biológico del Zinc.

1.4. Significado Clínico del Zinc.

1.5. Fundamento de los Métodos.

1.6. Métodos Estadísticos.

1.1. Antecedentes

Por muchos años los elementos "esenciales" han sido de interés básico para los científicos y de gran importancia práctica en la economía animal (1). Sin embargo, en la última década ha crecido el interés por estudiar cierta clase de metales que se encuentran en el organismo humano a bajas concentraciones, a éstos metales se les han denominado metales "ápice ó traza" (Ver Tabla I); y dentro de éstos hay algunos que se consideran esenciales para la vida tales como: Cromo, Cobalto, Cobre, Fluor, Hierro, Iodo, Plomo, Manganeso, Molibdeno, Níquel, Selenio, Estaño y Zinc (2).

El creciente interés desarrollado en los últimos años por la significación del Zinc para los seres vivos y la continua revelación de nuevos datos de conocimiento han motivado la aparición de frecuentes comunicaciones de conjunto que tratan de incluir y correlacionar las aportaciones más recientes. Dado que el Zinc aparece implicado en funciones que se extienden a los más variados sistemas biológicos e intervienen en distintos niveles de organización, la labor de su estudio resulta útil para la salud y la nutrición humana, así como su reconocido interés en la práctica Pediátrica.

La importancia biológica del Zinc data desde hace más de un siglo donde Raulin, en Francia en el año de

Tabla I Elementos áipice encontrados en la materia

Aluminio	Cobre*	Mercurio
Antimonio	Estaño*	Molibdeno*
Arsénico	Estroncio	Níquel*
Bario	Fluor*	Rubidio
Boro	Galio	Selenio*
Bromo	Hierro*	Silicio
Cadmio	Iodo*	Plata
Cromo*	Litio	Plomo*
Cobalto*	Manganeso	Vanadio
		Zinc*

*= Probablemente esenciales para la vida,

Umer.: P.V.N.J.Med., 297:318, 1977.

1869, demostró su importancia como un nutriente esencial para el crecimiento de Aspergillus niger (3). Drinker y Collier señalaron en 1926 la presencia general del Zinc en los seres vivos (4). Las evidencias de la esencialidad del Zinc para el desarrollo y crecimiento normal de los animales no fué aducido sino hasta la mitad de los 30's, donde en el año de 1934 Tood determinó que el Zinc era un elemento traza necesario en la rata (2). La primera demostración concreta de una función biológica específica dependiente de la presencia de Zinc fué en 1940 donde Keilin y Mann aislaron la anhidrasa carbónica demostrando que era una Zinc-metaloenzima (5). En los últimos años de los 40's e inicios de los 50's, el Dr. Bert Vallee realizó numerosas investigaciones acerca de las Zinc-metaloenzimas y su efecto en enfermedades del hígado e infartos al miocardio sobre el metabolismo del Zinc. Su estudio sobre la Fisiología y Bioquímica del Zinc marca el real inicio del interés biomédico del elemento, así como su relación con los seres humanos (3). Desde entonces se han reconocido más de 40 Zinc-metaloenzimas identificadas en tejidos de mamíferos y dentro de las que se incluye a la fosfatasa alcalina, carboxipeptidasas, alcohol y glutámico deshidrogenasas (5), a las enzimas que tienen importancia central en el metabolismo de los ácidos nucleicos dependientes de Zinc, como la DNA y RNA polimerasas y la Timidín-cinasa (TC) (6). Sin em

bargo, no fué sino hasta el inicio de los 60's que Prasad postuló el papel de la deficiencia del Zinc en enfermedades humanas (7).

1.2. Metabolismo del Zinc.

1.2.1. Fuentes de este metal para el hombre.

El Zinc es un elemento del grupo IIB, que junto con el Cadmio y el Mercurio se encuentran al final de la serie de transición del bloque D. El Zinc tiene un número atómico de 30 y un peso atómico de 65.38. Existen varios isótopos de este elemento, de los cuales el Zinc⁶⁵, con una vida media de 250 días, ha sido el más usado para estudios biológicos. El Zinc⁶³, con una vida media de 38 minutos, empleado en investigaciones terapéuticas (3). El Zinc se puede presentar en dos formas iónicas, Zn^+ y Zn^{++} , pero desde el punto de vista biológico, sólo la segunda es importante, si bien la forma de Zn^{++} impide la intervención del metal en los procesos de la óxido-reducción. El Zinc es un elemento de transición más electropositivo que los elementos vecinos pertenecientes a dicho grupo, y se asemeja a ellos en la facilidad de formar complejos. El Zinc es uno de los metales más ampliamente difundidos en la naturaleza, ya que se encuentra en el suelo, aire, agua y en los animales y vegetales, hasta constituir el 0.004 % de la corteza terrestre y ser el 25avo en abundancia (3,4). A pesar de

esta escasa concentración en cifras absolutas tiende a localizarse en forma inorgánica en puntos fácilmente aislables. Mientras que los otros metales de su grupo se hallan fundamentalmente como sulfuros, el Zinc puede aparecer también como carbonato (calamina), óxido, silicato, etc.

El Zinc atraviesa un ciclo en la naturaleza cuyo mecanismo se puede describir en etapas químicas sencillas: el sulfuro primario de Zinc es oxidado a sulfato, más soluble, que es arrastrado por lavado de las rocas; el Zinc así disuelto pasa a las plantas donde se acumula, ó bien precipita en forma de carbonato, que bajo el influjo de procesos metamórficos se descompone a óxido.

Las diferencias en contenido de Zinc en las diversas clases de alimentos es alta, y se han atribuido a los efectos del tipo de suelo y a la distribución del Zinc en el mismo, a los fertilizantes utilizados, a la diferencia en la capacidad de almacenamiento de las plantas y al distinto contenido en la variedad de la dieta animal.

La puerta de entrada común del Zinc en el hombre es oral. Los alimentos especialmente ricos en Zinc son: carne, vísceras -sobre todo hígado- los cuales generalmente se establecen en un rango de 30 a 50 μg de Zinc; las ostras que llegan a contener alrededor de 1000 μg de Zinc y en una menor proporción otros animales marinos; de los vegetales destacan los cereales, legumbres secas, nueces, el

cacao y las especias; el huevo de gallina -especialmente la yema asociada con las lipoproteínas lipovitelinas- con un promedio en contenido de 762 μg de Zinc. El contenido de Zinc en la leche varía con las especies, el estado de lactación ó con la dieta diaria de Zinc. En todas las especies el calostro es de 3 a 5 veces más rico en Zinc que en la leche común, y los niveles declinan con el avance de la lactación. La leche de rata es más rica en contenido de Zinc que otras especies estudiadas. Los valores reportados para la leche de vaca, cabra y borrego son alrededor de 3 a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La concentración de Zinc en la leche humana es apreciablemente menor que en la leche de vaca, aunque la variabilidad independiente es alta. La leche en polvo contiene comúnmente 3.5 a 4.5 mg de Zinc/100g.

Dentro de los alimentos pobres en dicho elemento está el azúcar blanca, pepita, frutas cítricas, vegetales no frondosos y tuberosos y aceites vegetales, los que generalmente no contienen más de 1 μg de Zinc (1,4,7,8).

El total de la ingesta diaria de Zinc está gradualmente influenciado tanto por la elección de la comida consumida como por su origen. La ingesta de Zinc está principalmente relacionado al contenido protéico de las dietas. La proteína, particularmente la animal, es importante para la posición del Zinc en los nutrientes por su efecto generalmente favorable sobre el Zinc total ingerido y su apro-

vechamiento. Oberleas y Prasad han enfatizado el aspecto del Zinc y la nutrición protéica. Ellos han demostrado que la utilización de las proteínas de las semillas para el crecimiento en las ratas está grandemente influenciado por el nivel de la ingesta del Zinc, complementado con los cereales y que puede mejorar el crecimiento y favorecer a una gran sección de la población humana en muchas áreas (9).

1.2.2. Absorción y transporte.

La absorción del Zinc tiene lugar en el intestino delgado y existen varios factores que influyen en ésta. En primer término destaca la cantidad de Zinc contenida en los diferentes componentes alimenticios. Varios autores han señalado que el aprovechamiento del Zinc radioactivo aumenta cuando la alimentación es pobre en éste elemento, ó que disminuye en caso contrario (10). También es de importancia la combinación química en la que el Zinc se encuentra en los alimentos (11,12). Así, óxidos, fosfatos y carbonatos se absorben sin dificultad, al igual que Zinc metálico (13). El sulfito ó la mezcla de óxidos de Zinc, fierro y manganeso son prácticamente inabsorbibles. La presencia de otros metales ó compuestos orgánicos puede igualmente interferir la absorción. Entre el Zinc y el cobre existe un antagonismo recíproco (14). El calcio agrava el

síndrome de deficiencia de Zinc en algunos animales. Los fitatos y otras sales orgánicas similares impiden la absorción del metal porque forman compuestos muy estables con él, y dicha estabilidad se incrementa por la presencia de ciertos elementos como el calcio (8). El Zinc, sin embargo, es absorbido principalmente en duodeno, íleon y yeyuno, con una mínima actividad de absorción en estómago y colon. El sitio de absorción del Zinc en el intestino delgado no ha sido completamente clarificado. Estudios al respecto de Emes y Arthur sugirieron que el íleon distal era la región más activa en la absorción del Zinc mientras que el yeyuno tenía una mínima actividad (15). Este problema ha sido estudiado recientemente por varios grupos de investigadores (1983) usando una gran variedad de técnicas in vivo y parece ser que el duodeno es el sitio de mayor absorción del Zinc (12).

El mecanismo de absorción del Zinc ha sido ilustrado últimamente por los trabajos de Evans y colaboradores (16). Estos trabajos proponen la siguiente secuencia para la absorción del Zinc:

- a) El páncreas secreta un ligante enlazante de Zinc de bajo peso molecular a la luz intestinal (17).
- b) En la luz intestinal el Zinc se enlaza al ligante,
- c) Unido al ligante, el Zinc es transportado a las microvellosidades intestinales y a las células epite-

liales.

- d) En las células epiteliales, el Zinc es transportado a los sitios receptores sobre la membrana basolateral plasmática.
- e) La albúmina interactúa con la membrana basolateral y remueve al Zinc de los sitios receptores.

La cantidad de metal que interactúa con la albúmina en la membrana basolateral plasmática determina la cantidad de Zinc removido de las células epiteliales y así se regula el Zinc que entra en el organismo (16).

Aunque este autor sostiene los conceptos generales del mecanismo hipotético original, recientes evidencias obtenidas en el laboratorio indican que la apotransferrina interactúa con la membrana basolateral removiendo al Zinc de los sitios receptores; y que la transferrina transporta al Zinc a través de la sangre portal al hígado, en donde el metal es incorporado a la albúmina y a otras proteínas enlazantes de Zinc. Estos resultados demuestran que la transferrina funciona en la absorción y transporte del metal (18). El cobre y otros metales inhiben la absorción del Zinc por competición con los sitios de enlace a la albúmina y del ligante ó ligantes de las secreciones pancreáticas a la luz intestinal. En el plasma venoso la mayor parte de Zinc se enlaza a las diferentes proteínas para ser transportado e incorporado a otros tejidos. La mayor fracción del Zinc sé-

rico (88%) está unido a proteínas y el resto (12%) se considera como Zinc disponible (19). Datos obtenidos por Prasad y Oberleas indican que los aminoácidos compiten efectivamente con la albúmina, transferrina, haptoglobina e IgG por enlazarse al Zinc. Es probable que la fracción de aminoácidos enlazados al Zinc les toque un importante papel fisiológico en el transporte biológico de este elemento (20).

1.2.3. Distribución y utilización.

1.2.3.1. Distribución general.

En la Tabla II se dan los niveles de Zinc en los principales tejidos blandos de varias especies (1,4). En un hombre adulto se ha estimado que el contenido de Zinc es de 1.4 a 2.3 g, en el que alrededor del 20% está presente en piel. La concentración media de Zinc en epidermis y dermis de un hombre normal es de 70.5 y 12.6 μg /de peso seco, respectivamente (1).

La concentración de Zinc en músculo varía con su color y actividad funcional. El contenido más alto de Zinc en el músculo rojo está situado íntegramente en la fracción subcelular, compuesta principalmente de miofibrillas y nucleínas. En las células del hígado y mamarías el Zinc está presente en núcleo, mitocondrias y en las fracciones flotantes, encontrándose los niveles más altos en los microsomas por unidad de proteína (21).

Tabla II Contenido de Zinc en Tejidos Normales ^a						
Tejido	Hombre ^b	Hombre ^c	Mono ^d	Rata ^e	Lechón ^f	Hombre ^g _h
Aorta	-	-	-	-	-	1600
Bazo	21	-	21	24	28	-
Cerebro	14	13	-	18	-	820
Corazón	33	-	22	21	-	2800
Duodeno	-	-	-	-	-	2500
Estómago	-	-	-	-	-	2600
Hígado	55	76	51	30	40	3800
Músculo	54	39	24	13	-	4800
Páncreas	29	-	48	33	45	2400
Piel	-	-	-	-	-	1000
Próstata	102	-	-	223	-	9200
Pulmón	15	14	19	22	-	1400
Riñón	55	37	29	23	40	4900
Supra- renales	12	-	16	-	33	-
Testículos	17	13	17	22	-	-
Utero	-	-	-	-	-	2500
Vejiga urinaria	-	-	-	-	-	3200

a= $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco

b= Tipton y Cook

c= Hamilton y colaboradores

d= Macapinale y colaboradores

e= Gilbert y Taylor; Mawson y Fischer

f= W.G. Hoekstra

g= Holtmeier

h= $\mu\text{g/g}$ de cenizas

1.2.3.2. Zinc en el tejido ocular.

La concentración más alta de Zinc existe normalmente en el tejido de la coroides del ojo, y se cree que los iones de Zinc forman " puente " que mantienen a la retina en posición normal. La inyección de ditizona en el ojo provoca inmediatamente desprendimiento de retina y ceguera. Además, el Zinc juega otro papel en la visión y es como activador de la enzima retino-reductasa. El contenido de Zinc en el iris y coroides de los ojos de carnero, ha sido reportado de 436 y 277 μg respectivamente. Los niveles de Zinc en la coroides de perro y zorra han sido reportados de 14 y 600 μg respectivamente (3,4).

1.2.3.3. Zinc en órganos sexuales masculinos y en secreciones.

La concentración de Zinc en testículos de rata en una edad de 7 a 58 días permanece constante, con valores de 120 μg en peso seco aproximadamente durante los primeros 30 a 35 días y aumentados cerca de 200 μg durante el segundo mes de vida, cuando los espermátides se transforman a espermatozoides. La concentración más alta de Zinc está presente en la glándula prostática, el líquido seminal y en los espermatozoides. Los niveles de Zinc se ven reducidos por castración y gonadotrofinas, mientras que la testosterona parece favorecer la acumulación. La gonadotro

finis coriónica aumenta el peso de todas las estructuras reproductoras de la rata e incrementa también en ellas la incorporación de Zinc radioactivo, mientras que la hormona folículo estimulante produce el efecto contrario. En la última década la significativa deficiencia de Zinc ha demostrado ser una etiología de inmadurez genital así como un crecimiento retardado (22).

1.2.3.4. Zinc en pelo y uñas.

Smith y colaboradores reportaron un rango de 93 a 292 μg de Zinc en las uñas de 18 personas normales. El cabello de la cabeza de 46 personas fué similar, siendo de 92 a 255 μg de Zinc. En el pelo, el metal se halla firmemente unido a proteínas y su cuantía no se modifica en un largo período de tiempo, lo que sugiere que se trata de un depósito estable y que su determinación en el cabello puede ser útil para valorar la cantidad global de Zinc en el organismo. La pigmentación parece influir sobre el contenido en el pelo, de modo que el oscuro tiene mayor cantidad que el claro, pero estos resultados no han sido confirmados por todos los autores. Por otro lado, parece aceptarse que la edad es un factor influyente. Petering ha señalado un incremento de Zinc en el cabello hasta la edad de 12 años, y un descenso posteriormente paulatino (23).

Pelo, huesos y piel parecen constituir un depósi

to de reserva de Zinc; la inyección intravenosa de Zinc⁶⁵ hace que se acumule rápidamente en estos lugares y la disminución del metal en la dieta hace que se movilice de éstos depósitos, dando lugar a alteraciones cutáneas y malformaciones esqueléticas (4).

1.2.3.5. Zinc en Páncreas e Hipófisis.

El páncreas y la hipófisis muestran un amplio intercambio de Zinc. En el páncreas, el metal juega un importante papel en la producción y función de la insulina. La mayor parte de Zinc pancreático se encuentra en las células alfa y beta de los islotes de Langerhans y varía, probablemente, con el estado funcional de éstas células. Si se estimula la secreción de insulina con dibclamina, decae paralelamente el número de gránulos en las células beta y su contenido de Zinc, y viceversa, si los gránulos aumentan, lo hace a la vez el metal (24,25).

1.2.3.6. Zinc en sangre.

En la sangre el Zinc se encuentra tanto en plasma como en suero, y en todos los elementos celulares sanguíneos como eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Los datos obtenidos por Vallee y Gibson indican que los eritrocitos contienen del 75-88% de Zinc total en sangre humana normal, unida en su mayor parte a la anhidrasa carbónica y

una pequeña cantidad unida laxamente a otras enzimas. Se ha descrito un equilibrio entre el Zinc sérico y el debilmente unido a proteínas de los eritrocitos, constituyendo la reserva ó parte lábil rápidamente disponible en la sangre (1). Los leucocitos contienen solamente el 3% del Zinc total de la sangre, pero un leucocito aislado posee 25 veces más Zinc que un eritrocito. Dentro de los leucocitos este elemento se encuentra formando parte de varias enzimas (3). Las plaquetas humanas contienen entre 0.2 y 0.4 $\mu\text{g}/10^9$ plaquetas.

En el plasma se encuentra el 12 al 22% de Zinc total de la sangre, mientras que en el suero hay un 16 % más. Este incremento sérico se atribuye a la desintegración de las plaquetas durante la coagulación (44%), a una ligera dilución en el plasma (39%) y el 4% restante a la hemólisis (26).

En cuanto a la distribución de estas cantidades, se sabe que en plasma el 22% se halla firmemente unido a la alfa-2-macroglobulina, el 66% de manera laxa a la albúmina y el 12% restante puede considerarse libre y posiblemente disponible para cualquier actividad fisiológica (19), aunque algunos autores han estimado que este Zinc libre puede estar enlazado a algunos aminoácidos (20). En cambio en el suero, un 36% está unido a la albúmina, un 24% a la globulina alfa-1, 27% a la alfa-2-macroglobulina, 12% a

las beta-globulinas y 1% a las gama-globulinas (4,27).

1.2.4. Excreción.

El Zinc se excreta principalmente en heces. La mayor parte del Zinc eliminado corresponde al no absorbido en la dieta; sin embargo, una pequeña cantidad es de origen interno, procedente del jugo pancreático, bilis, jugo gástrico y secreciones de ciego y colon.

Se ha demostrado que esa eliminación disminuye significativamente en animales a los que se han sometido a una dieta pobre en Zinc, contribuyendo de este modo al mantenimiento homeostático del metal.

El Zinc también es eliminado en pequeñas cantidades por orina, las cuales oscilan entre 0.1 y 0.7 μg por día. Esta Zincuria es muy constante y no se modifica significativamente con las variaciones del ingreso. La velocidad de excreción urinaria de Zinc de 24 horas ha sido significativamente mayor en hombres que en mujeres, pero esta diferencia se eliminó cuando la velocidad de excreción del Zinc se relacionó con la velocidad de excreción de la creatinina. Esto indica que la mejor manera de expresar la excreción urinaria de Zinc es como μmol de Zinc por mmol de creatinina (28). Por lo general, el riñón parece que solo posee limitada capacidad de excreción de este elemento, tanto cuando se administra por la boca como

por inyección intravenosa (1,3). Sólo ciertos Zinc-quelantes (EDTA, TPTA, D-penicilamina) consiguen aumentar la Zincuria. Igualmente el Zinc puede ser eliminado por sudor y por semen cuyas cantidades oscilan entre 115 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ y de 100 a 200 p.p.m. respectivamente (4,11).

1.3. Significado Biológico del Zinc

Los efectos beneficiosos ó adversos de los oligoelementos han sido objeto de estudio de la Biología y la Medicina durante centurias. Sin embargo, los papeles bioquímicos del Zinc sólo se han investigado de un modo sistemático durante las últimas 4 décadas. Estas investigaciones han permitido, de un modo general, llegar a los siguientes puntos:

- i) Los metales pueden formar parte del locus activo de múltiples enzimas, participando directamente en su acción catalítica.
- ii) Los metales participan en la estabilización de las estructuras de macromoléculas, ácidos nucleicos y proteínas, por lo que, indirectamente, afectan a su función.
- iii) Los metales son capaces de regular los procesos biológicos no sólo formando parte de las enzimas, sino también interviniendo en la construcción y funcionamiento de membranas y partículas subcelu-

lares.

1.3.1. Metaloenzimas Zinc-dependientes.

1.3.1.1. Zinc y síntesis de DNA, RNA y síntesis protéica.

La primera demostración de la necesidad del Zinc para la síntesis de DNA es debido a Fujioka y Liberman, quienes estudiaron la incorporación de la timidina en el hígado de rata Zinc-deficiente. Los análisis por Espectrofotometría de Absorción Atómica de la DNA-polimerasa-I de E. coli, de la DNA-polimerasa del fago T-4 han revelado la presencia de 1 átomo/gr. de Zinc respectivamente, por mol de enzima (29).

El Zinc está incluido primeramente en ácidos nucleicos y en el metabolismo de proteínas y de aquí, su importancia en los procesos fundamentales de la replicación celular. El Zinc presenta un papel importante en la síntesis de colágena, DNA, RNA y en la formación protéica del cerebro. El daño en la síntesis de DNA en hígado de ratas Zinc-deficientes ha sido demostrado en varios estudios. Se ha encontrado que el contenido total de proteínas y RNA de los testículos de ratas Zinc-deficientes es bajo, y a la vez la actividad de las ribonucleasas aumenta (30). El Zinc se ha visto envuelto en el curso de la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas en linfocitos estimulados con fitohemaglutininas, posiblemente en el momento de

activación del gene (31).

Otro conocimiento del defecto metabólico en deficiencia de Zinc está en la disminuída actividad de la Timidina-cinasa (TC), la enzima que nos gufa a la formación de la Timidina-trifosfato (TTP) que es un pre-requisito para la síntesis de DNA y así la división celular (6). No obstante, la reduplicación del DNA es un problema muy complejo, en el que intervienen toda una cadena enzimática. Ver Tablas III y IV.

Los datos presentados por Scrutton y colaboradores indican que la RNA-polimerasa purificada de E.coli es una Zinc-metaloenzima de acuerdo por el criterio propuesto por Vallee. La RNA-polimerasa-DNA-dependiente de E.coli contiene 2 átomos/gr. de Zinc por mol de enzima. Los estudios de Scrutton indican la importancia del Zinc en la iniciación de la síntesis de RNA (32).

En resumen, el Zinc es un elemento que participa de modo esencial en los mecanismos de expresión genética.

1.3.1.2. Enzimas Zinc-dependientes.

El aislamiento de la anhidrasa carbónica por Keilin y Mann en 1940, fué la primera demostración de una función biológica específica dependiente de la presencia de Zinc. Esta enzima tiene un papel cardinal en la homeostasis ácido-básica del organismo viviente por catálisis

Tabla III Zinc y Síntesis de DNA

Pasos en el proceso de síntesis.

1. Síntesis de mononucleótidos.
2. Fosforilación de mononucleótidos a trinucleótidos.
3. Síntesis de un modelo de RNA que inicia la unión de nucleótidos.
4. Síntesis de proteínas necesarias para el proceso, tales como los factores para la formación de las "horquillas duplicadoras" que resultan del desenrollamiento del helicoide de DNA "paterno".
5. Alineamiento de los trinucleótidos en las "horquillas duplicadoras" de acuerdo con la secuencia de bases de la cadena de DNA "paterno".
6. Unión de los trinucleótidos para constituir la cadena hija de DNA.
7. Los fragmentos de DNA sintetizados, se unen para construir la cadena gigante de DNA, por la acción catalítica de las ligasas.
8. Los errores en la secuencia de bases son degradados y se forma una nueva cadena con la secuencia correcta.

Probable intervención del Zinc.

- Aporte energético, puesto que muchas deshidrogenasas son Zinc-dependientes.
- Algunas quinasas fosforilizantes son Zinc-dependientes.
- Zinc-dependencia de la RNA-polimerasa.
- En la síntesis protéica el Zinc es necesario: a) a nivel de la transcripción, para el funcionamiento de la RNA-polimerasa catalizadora de la formación de RNA nuclear heterogéneo, precursor del RNA mensajero; b) a nivel de la translación; b₁) para la formación del RNA ribosómico; b₂) para la actuación del factor de alargamiento I, necesario para la síntesis de la cadena peptídica.
- Las enzimas catalizadoras de DNA-polimerasas son, en gran número, Zinc-dependientes.
- Este proceso también es catalizado por la DNA-polimerasa I, enzima Zinc-dependiente.

Tabla IV Zinc y Ciclo Celular

Fase G ₁	En ella existe síntesis de ácido ribonucleico y proteínas (véase Tabla III).
Fase S	Caracterizada por la duplicación de ácido desoxirribonucleico (véase Tabla III).
Fase G ₂	No se ha demostrado ninguna influencia directa del Zinc.
Fase M	Existen pruebas de que la ausencia de Zinc puede bloquear la división celular, a pesar de que se sintetice ácido desoxirribonucleico. Ello habla a favor de una influencia directa en el mecanismo de división, probablemente en el funcionamiento del aparato mitótico responsable citoquinesis.

de la deshidratación reversible del ácido carbónico, un proceso crítico para el transporte y eliminación del dióxido de carbono. Se cree que la enzima contiene 0.33% de Zinc, esencial para su mecanismo de acción (33). En la mitad de los años 50's la carboxipeptidasa pancreática bovina llegó a ser la segunda enzima cuya función se encontró ser dependiente de la presencia de Zinc. En los últimos 15 años se han identificado más de 40 Zinc-proteínas, la mayoría de las cuales son metalo-enzimas. El Zinc está contenido en varias deshidrogenasas, aldolasas, peptidasas, fosfatasas e isomerasas de levaduras.

Los complejos de los metales con proteínas puede ser caracterizado más precisamente por sus constantes de estabilidad, cuyas magnitudes son funciones directas de la firmeza de enlace del metal. En la Tabla V se han enlistado algunas Zinc-metaloproteínas y metaloenzimas más conocidas. Un gran número de enzimas son activadas por varios metales, entre los cuales el Zinc es el metal más comúnmente incluido. Algunas enzimas son activadas por el Zinc y éstas se encuentran enlistadas en la Tabla VI (5,34,35).

1.3.2. Acciones del Zinc no debidas a metaloenzimas.

- A. Además de interferir en sus procesos de síntesis, el Zinc participa en la estabilidad macromolecular del DNA y de los ribosomas.

Tabla V Zinc metaloenzimas y Zinc metaloproteínas				
	Cofac- tor	P.M.	g-áto- mo/mol	Fuente
Anhidrasa carbónica	Ninguno	30000	1 Zn	Eritrocitos
Anhidrasa carbónica	"	28000	1 Zn	Eritrocitos humanos
Anhidrasa carbónica	"	29000	1 Zn	Eritrocitos de Macaca mulata
Carboxipeptidasa A	"	34300	1 Zn	Páncreas bovino
Carboxipeptidasa A	"	36500	1 Zn	Páncreas de pez-perro del Pacífico
Carboxipeptidasa B	"	34300	1 Zn	Páncreas de porcino
Carboxipeptidasa B	"	34300	1 Zn	Páncreas bovino
Proteasa neutra	"	44700	1-2 Zn	<u>B. subtilis</u>
Alcohol deshidrogenasa	NAD	150000	4 Zn	Levadura
Alcohol deshidrogenasa	NAD	80000	2-4 Zn	Hígado de caballo
Alcohol deshidrogenasa	NAD	87000	2 Zn	Hígado de humano
Glutámico deshidrogenasa	NAD	1×10^6	2-6 Zn	Hígado de res
D-Gliceraldehído-3-fosfato	NAD	137000	2-3 Zn	Músculo de cerdo, res y levadura
Deshidrogenasa láctica	NAD	Desconocido	Desconocido	Músculo de conejo
Deshidrogenasa málica	NAD	40000	1 Zn	Corazón de res
D-citocromo láctico reductasa	FAD	50000	4-6 Zn	Levadura

Continuación de la Tabla V				
	Cofac tor	P.M.	g-áto mo/mo	Fuente
Fosfatasa alcalina	Ningu no	89000	4 Zn	<u>E.coli</u>
Fosfatasa alcalina	"	Desco- nocido	Desco- nocido	Riñón de cerdo
Fosfatasa alcalina	"	"	"	Leucocitos humanos
Aldolasa	"	65-75 000	1 Zn	Levadura
Aldolasa	"	30000	2 Zn	<u>E.coli</u>
Aldolasa	"	50000	1 Zn	<u>A.niger</u>
Fosfolipasa	"	Desco- nocido	Desco- nocido	<u>B.cereus</u>
Manosa-6-fosfato isomerasa	"	"	"	Levadura
Amilasa	"	50000	4 Ca .5 Zn	<u>B. subtilis</u>
Proteinasa	"	26000	1 Zn	Veneno de serpiente
Metalotionina	"	9000	9(Zn+ Cd)	Riñón de caba- llo, humano e hígado de cone- jo
Procarboxipeptida- sa A	"	90000	1 Zn	Páncreas bovino
Procarboxipeptidasa	"	67400	1 Zn	Páncreas bovino

Enzimas	Metales activadores ^a
Glicilglicina dipeptidasa Arginasa	Zn ²⁺ . Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cd ²⁺ .
Deshidropeptidasa Alanil y leucil-glicina dipeptidasa	Zn ²⁺ . Zn ²⁺ , Pb ²⁺ , Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Sn ²⁺ , Cd ²⁺ , Hg ²⁺ .
Tripeptidasa Glicil-L-leucina dipeptidasa	Zn ²⁺ , Co ²⁺ .
Carnosinasa	Zn ²⁺ , Mn ²⁺ .
Amino peptidasa	Zn ²⁺ , Mn ²⁺ .
Histidina desaminasa	Zn ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺ .
Lecitinasa	Zn ²⁺ , Hg ²⁺ , Cd ²⁺ .
Enolasa	Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺ .
Aldolasa de levadura y de Clostridium	Zn ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ .
Oxalacético descarboxilasa	Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ . Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Cd ²⁺ , Pb ²⁺ , Ni ²⁺ , Fe ²⁺ , Mg ²⁺ , Ba ²⁺ , Cu ²⁺ .
Dihidroorotasa	Zn ²⁺ .
L-manosidasa	Zn ²⁺ .

a= También se enlistaron otros metales que incrementan la actividad observada.

B. La influencia del Zinc en la fisiología de las membranas destacando que interviene en la conservación y resistencia de la membrana celular y posee un efecto estabilizador de las membranas lisosómicas.

C. Además de lo expuesto, el Zinc juega importantes papeles en la fisiología de distintos sistemas de interés básico para la clínica en significado y aplicación.

1.4. Significado Clínico del Zinc

1.4.1. Requerimiento.

Los requerimientos del Zinc en el adulto y en el niño adolescente son de 10-15 mg; durante la infancia han sido estimados en 3 mg/día durante los primeros 6 meses y 5 mg para los siguientes 6 meses de vida; los niños de 1-10 años requieren 10 mg; para las mujeres embarazadas y en lactación los requerimientos son de 20 y 25 mg respectivamente (36). La importancia nutricional de este elemento en neonatos e infantes está recibiendo una mayor atención (37).

1.4.2. Manifestaciones clínicas de deficiencia de Zinc.

La etiología de las deficiencias de Zinc puede ser enmarcada por diferentes causas, y en la Tabla VII se marcan algunos mecanismos y ejemplos de deficiencia de Zinc (36).

Tabla VII	Deficiencia de Zinc.	Etiología
Mecanismos	Ejemplos	
Una dieta inadecuada	Pacientes con dietas restringidas de proteínas Bajo contenido de Zinc en algunos alimentos industrializados Inanición Alimentación intravenosa	
Inhibición de la absorción del Zinc	Alto consumo de dietas ricas en fitatos Geofagia (?)	
Deficiente absorción intestinal	Acrodermatitis Enteropática Esteatorrea Pequeñas enteropatías Síndrome de mala absorción	
Incremento de la pérdida de Zinc del cuerpo	Hiperzincuria Cirrosis Pérdidas crónicas de sangre Administración de quelantes Diarrea Algunas parasitosis Sudor excesivo Después de una cirugía	
Incremento en los requerimientos de Zinc en el cuerpo	Embarazo Lactación Crecimiento acelerado	

En el hombre las manifestaciones clínicas de deficiencia de Zinc han sido descritas como: enanismo, hipogonadismo, dermatitis (especialmente alrededor de la boca, perineo y piernas), anorexia, diarrea y alopecia. Probablemente el mejor ejemplo son los pacientes con Acrodermatitis enteropática y Kwashiorkor, ambos son irritables, anoréxicos, se alteran con el baño, cuando se visten, cuando se alimentan y con la presencia de personas a su alrededor; ambos presentan dermatitis, lento crecimiento de pelo y diarrea. En los infantes se ha observado excesivo llanto y dificultad en consolarlos, también los adultos con pérdidas agudas de Zinc presentan cambios neurológicos, anorexia y mal funcionamiento de los sentidos del gusto y olfato; todos estos cambios responden rápidamente con una terapia de Zinc.

Algunos ejemplos de condiciones patológicas asociados a deficiencias de Zinc en adultos y niños están en listados en la Tabla VIII.

La deficiencia de Zinc en infantes y en niños puede resultar de una dieta inadecuada, de un daño en la absorción, de una excesiva excreción o de un defecto heredado en el metabolismo del Zinc. Las tres condiciones iniciales son muy frecuentes en México en pacientes con gastroenteritis (36).

Tabla VIII Condiciones patológicas con deficiencia de Zinc en humanos

Adultos	Niños
Cambios Agudos	Crecimiento retardado
A) Infecciones	Enanismo e hipogonadismo
B) Infarto al miocardio	Síndrome de mala absorción
C) Después de una cirugía	Acrodermatitis enteropática
	Síndrome de Down
	Fibrosis quística (con crecimiento retardado)
Cambios Crónicos	
Embarazo	Kwashiorkor
Cirrosis	
Tuberculosis activa	
Úlceras	
Anticonceptivos orales	
Uremia	

1.4.3. Detección y diagnóstico.

La deficiencia de Zinc puede sospecharse por su gestivos síntomas clínicos. En Pediatría la determinación de la concentración de Zinc en suero ó plasma (38) puede ayudar para el diagnóstico clínico de varias enfermedades.

Los niveles de Zinc en sangre de personas sanas y enfermas han sido medidos por un gran número de investi gadores notables tales como Vallee y Gibson en 1948 y por Vikbladh en 1950 y 1951. El método colorimétrico de la di tizona, usado en estos primeros estudios de Zinc, fué di fícil y presentó un gran número de errores. Recientemente se han hecho estudios comparativos cuantitativos de Zinc por la técnica de ditizona y por espectofotometría de absorción atómica presentando poca variación en los resul tados (27,39).

La Espectofotometría de Absorción Atómica (E.A.A.) es un método analítico exacto y sensible para la determinación de metales de cualquier material que pueda ser disuelto ó puesto en suspensión. La E.A.A. ha demostrado ser una técnica útil desde que se introdujo en el año de 1955 por el físico australiano Allan Walsh. Pronto después, todavía en 1955, la fabricación de equipo comercial dió por resultado una rápida expansión de sus aplica ciones. En febrero de 1965, eran menos de 500 unidades

las que estaban en uso en los Estados Unidos. Su número en febrero de 1966 pasaba ya de las 1000 unidades y una estimación hecha a principios de 1968 indicó que en los Estados Unidos se hallaba en servicio más de 5000 unidades de absorción atómica.

La causa de esta rápida expansión en E.A.A. es que, instrumentalmente, el espectrofotómetro más avanzado de absorción atómica es muy simple comparado con herramientas analíticas como espectrofotometría de masa, análisis de activación de neutrones, fluorescencia por Rayos X y espectroscopía de emisión de arco ó de emisión de laser. Este método analítico de E.A.A. permite la detección de elementos en concentraciones inferiores a 1 p.p.m. en diferentes fluidos biológicos, los cuales han ido aumentando con el reciente desarrollo de quemadores de 3-ranuras, esto facilita el uso de soluciones más concentradas que las que son posibles con el quemador de 1-ranura (40,41). A la vez proporciona el desarrollo de microtécnicas para la determinación de Zinc en muestras pediátricas (38).

Utilizando la importancia fisiológica, bioquímica y clínica del Zinc, así como el desarrollo de sus métodos analíticos de determinación, Henkin y colaboradores en el año de 1971, realizaron los primeros estudios de Zinc ultrafiltrable (el disponible para cualquier actividad fisiológica) y Zinc no-ultrafiltrable (el cual está presente

formando uniones Zinc-proteína) en la inter-relación materno-fetal en infantes a término completo para explicar la transferencia de este metal de la madre al feto (42). Más tarde, en 1972 Henkin y Smith estudiaron pacientes con hepatitis viral aguda midiendo Zinc total y Zinc difusible ó ultrafiltrable, encontrando que el total disminuía y el difusible aumentaba al inicio del padecimiento, disminuyendo al desaparecer el mismo (43). En 1973, Henkin y Schulman estudiaron los cambios de Zinc total, ultrafiltrable y no-ultrafiltrable en niños recién nacidos a término hasta 1 año 9 meses, sin ningún padecimiento y con dieta adecuada para su edad, así como en adultos. Las cifras encontradas para el Zinc ultrafiltrable al nacimiento fueron $27 \pm 5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ descendiendo a las 48 horas a $19 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ y permaneciendo constantes hasta el año y nueve meses. En adultos el nivel fué de $19 \pm 2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, con $p < 0.05$ en relación al valor del recién nacido (44). Los estudios más recientes de Zinc ultrafiltrable son los realizados por Whitehouse y colaboradores en 1983, los cuales efectúan dos técnicas comparativas de Zinc ultrafiltrable en plasma con 12 sujetos control mediante el método de E.A.A. y con Zn^{65} (45). El Zinc ultrafiltrable "in vitro" ha sido comparable a la ultrafiltración fisiológica "in vivo" (20,46).

1.5. Fundamento de los Métodos

1.5.1. Espectrofotometría de Absorción Atómica.

En este método se introduce una fina rociada de la disolución problema en la flama, donde se produce un proceso de desolvatación, vaporización y atomización. Se hace pasar por la flama la radiación de una fuente externa de luz, que emite la línea espectral correspondiente a la energía necesaria para una transición electrónica del estado normal a un estado excitado ó niveles superiores de energía (espectro de líneas de absorción). Debido a que las bandas son tan estrechas, la fuente de radiación debe de producir bandas muy estrechas, puesto que si diera bandas amplias ó radiación continua la mayor parte de la luz pasaría sin ser absorbida. Los gases de la flama se consideran como un medio que contiene átomos libres y no excitados capaces de absorber radiación de una fuente externa, cuando dicha radiación corresponde exactamente a la energía requerida para una transición del elemento investigado de un estado electrónico normal a un estado normal de excitación. La radiación no absorbida pasa entonces a través del monocromador, que aísla la línea espectral exitante de la fuente de luz y se envía hacia el detector. La absorción de radiación de la fuente de luz depende de la población del estado normal, la cual es proporcional a la con-

centración de la disolución rociada en la flama. La absorbancia se mide por medio de la diferencia entre las señales transmitidas en presencia y ausencia del elemento analizado (41).

1.5.2. Electroforesis.

El desplazamiento de las partículas coloidales en un campo eléctrico se denomina electroforesis. Además, de la intensidad del campo eléctrico intervienen otros factores entre los que conviene resaltar la carga eléctrica, forma y tamaño de las partículas. La identificación de proteínas se realiza casi siempre por electroforesis. El pH de la disolución (usualmente un amortiguador) tiene la propiedad de que en la mayor parte ó todas las proteínas posean la misma carga, pero su movilidad sea diferente. La electroforesis de zona posee mayor capacidad de resolución y requiere muestras menores. En la electroforesis de zona, la disolución acuosa de proteínas se inmoviliza en una matriz sólida ó soporte, un material poroso hidratado que posea rigidez mecánica y elimine las alteraciones debidas a la convección y a la vibración. Los soportes más ampliamente utilizados son el papel filtro ó las tiras de acetato de celulosa, materiales que son relativamente inertes y no interactúan con las proteínas que emigran ni las retardan en su movimiento. Las proteínas son sometidas a un cam

po eléctrico entre electrodos y se deja proseguir hasta que los principales componentes protéicos se separen en zonas distintas. La posición y la cantidad de proteína existente en cada una de las zonas separadas se determina por la aplicación de un colorante que tiñe a las proteínas; la densidad de la coloración retenida es proporcional a la cantidad de proteína y puede valorarse mediante un densitómetro.

1.5.3. Ultrafiltración.

La ultrafiltración se realiza en membranas selectivas de alta-retención, formadas de materiales poliméricos inertes (Diaflo; Centriflo, Amicon Corp.; Lexiton, Mass.) que han sido usadas para concentrar disoluciones de proteínas, orinas y para separar complejos macromoleculares protéicos de las micromoléculas en mezclas. Estas membranas porosas son capaces de retener moléculas que pesan en exceso de 4×10^4 a 5×10^4 , mientras que su selectividad admite el paso de sales, metales libres y otros microsolutos. Se han fabricado estas membranas en forma de conos rígidos para la rápida ultrafiltración de suero, y la efectiva separación de una parte difusible y una no-difusible. La gravedad a la que es sometida esta membrana permite la difusibilidad de estas especies iónicas (42-45).

1.5.4. Refractometría.

Cuando una radiación pasa de un medio a otro, una parte de ella se refleja y otra se transmite. En el nuevo medio, la radiación transmitida conserva su frecuencia, pero tanto la velocidad como la dirección de propagación puede cambiar. Cuando una radiación electromagnética incide sobre una molécula, esta tiende a polarizarse, ya que el campo eléctrico de la onda desplaza electrones dando lugar a un dipolo. La energía producida por la polarización da lugar a la emisión de una radiación secundaria, que interfiere con la radiación incidente y causa los fenómenos de refracción, reflexión y dispersión de la luz. Refractómetro. Contiene una celda en la parte superior de un prisma de vidrio, en la que se colocan las muestras líquidas. La luz monocromada entra a la superficie horizontal del prisma y se observa por un telescopio móvil. La determinación del índice de refracción es proporcional a la concentración de proteínas (41).

1.5.5. Reacción de Biuret.

La reacción de Biuret se basa en que al reaccionar un reactivo alcalino de cobre con una sustancia que contiene 2 ó más enlaces peptídicos, se produce un color azul violeta debido al complejo que se forma entre el ion cúprico y dos enlaces peptídicos adyacentes. Esta intensi-

1.5.4. Refractometría.

Cuando una radiación pasa de un medio a otro, una parte de ella se refleja y otra se transmite. En el nuevo medio, la radiación transmitida conserva su frecuencia, pero tanto la velocidad como la dirección de propagación puede cambiar. Cuando una radiación electromagnética incide sobre una molécula, esta tiende a polarizarse, ya que el campo eléctrico de la onda desplaza electrones dando lugar a un dipolo. La energía producida por la polarización da lugar a la emisión de una radiación secundaria, que interfiere con la radiación incidente y causa los fenómenos de refracción, reflexión y dispersión de la luz. Refractómetro. Contiene una celda en la parte superior de un prisma de vidrio, en la que se colocan las muestras líquidas. La luz monocromada entra a la superficie horizontal del prisma y se observa por un telescopio móvil. La determinación del índice de refracción es proporcional a la concentración de proteínas (41).

1.5.5. Reacción de Biuret.

La reacción de Biuret se basa en que al reaccionar un reactivo alcalino de cobre con una sustancia que contiene 2 ó más enlaces peptídicos, se produce un color azul violeta debido al complejo que se forma entre el ion cúprico y dos enlaces peptídicos adyacentes. Esta intensi-

dad de color es directamente proporcional al número de enlaces peptídicos.

1.5.6. Inmunodifusión Radial.

La difusión radial está basada en el hecho de que existe una relación cuantitativa entre la cantidad de antígeno colocado en un pozo horadado sobre la placa de agar-anticuerpo y el anillo resultante de precipitación. El área circunscrita por el anillo de precipitación es proporcional a la concentración de antígeno. Este método de viraje requiere que los anillos de precipitación alcancen el mayor tamaño posible, lo cual a menudo requiere de 48-72 horas de difusión.

1.6. Métodos Estadísticos

1.6.1. "t Student Apareada".

En 1908, W.S. Gosset, quien escribía bajo el seudónimo de Student, describió la distribución de la variable

$$t = \frac{\bar{X}_d - \mu_d}{s_d / \sqrt{n}}$$

Esta distribución, que se conoce con el nombre de distribución "t de Student" ó simplemente con el nombre de "distribución t", nos habilita para hacer inferencias sobre las medias poblacionales, que en este caso son de Zinc total. La distribución "t de Student apareada", de la misma manera que la distribución normal estandarizada, tiene forma de campana y media igual a cero, alrededor de la cual es simétrica. Se utiliza "t apareada" cuando la distribución de la muestra se extrae de una sola población, siendo que las determinaciones de Zinc total por ambos métodos es realizada en la misma muestra en suero de cada niño. Este análisis permite conocer la equivalencia de los dos métodos cuantificables de Zinc total (47).

1.6.2. Curva de Ajuste.

Para llegar a determinar una ecuación que relacione las variables, un primer paso que nos sirve de ayuda es la correlación de datos que muestran los correspondientes valores de las variables consideradas. En este trabajo X y Y denotan concentración de Zinc $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ y absorbancia respectivamente. El paso siguiente es representar los puntos $(X_1, Y_1), (X_2, Y_2), \dots, (X_n, Y_n)$ en un sistema de coordenadas rectangulares. El sistema de puntos resultantes se llama a veces diagrama de dispersión.

Con el diagrama de dispersión es posible representar frecuentemente una curva que se aproxime a los datos. Tal curva se llama curva de aproximación a los datos. Hay datos que se aproximan bien a una línea recta y se dice que entre las variables existe una relación lineal. Sin embargo, aunque existe una relación entre las variables, esta no es lineal y se dice que existe una relación no lineal.

1.6.2.1. Línea Recta.

El tipo más sencillo de una curva de aproximación es la línea recta, cuya ecuación puede escribirse:

$$Y = a_0 + a_1 X$$

ó

$$Y = b + m X$$

Dados dos puntos cualesquiera (X_1, Y_1) y (X_2, Y_2) de la línea, las constantes $b + m$ pueden ser determinadas. La ecuación resultante puede escribirse:

$$Y - Y_1 = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1} (X - X_1)$$

ó

$$Y - Y_1 = m (X - X_1)$$

donde $m = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$ es la pendiente de la línea resultan

te y representa el cambio de Y dividido por el correspondiente cambio de X . Los valores son $m =$ pendiente, b es el valor de Y cuando $X = 0$, se llama intersección de Y .

(48)

1.6.3. Teoría de la Correlación.

En este punto se considera el problema de la correlación ó el grado de relación entre las variables, que se estudian para determinar en que medida una ecuación lineal ó de otro tipo describe ó explica de una forma adecuada la relación entre variables. Cuando se trata de dos

variables solamente, se habla de correlación simple y de regresión simple. En la correlación lineal Y tiende a incrementarse cuando se incrementa X, la correlación se dice positiva ó directa y viceversa se dice correlación negativa ó indirecta (48).

1.6.3.1. Coeficiente de Correlación.

La razón de la variación explicada a la variación total se llama coeficiente de determinación. Si la variación explicada es cero, es decir, la variación total es toda no explicada, esta razón es cero. Si la variación no explicada es cero, es decir, la variación total es toda explicada, la razón es uno. En los demás casos la razón se encuentra entre cero y uno. Puesto que la razón es siempre no negativa, se denota r^2 . La cantidad r se llama coeficiente de correlación y esta dado por:

$$r = \pm \sqrt{\frac{\text{variación explicada}}{\text{variación total}}} = \pm \sqrt{\frac{(Y_{\text{est.}} - \bar{Y})^2}{(Y - \bar{Y})^2}}$$

Nótese que r es una cantidad sin dimensiones, es decir, no depende de las unidades empleadas. Así, pues, r es una medida muy buena de la correlación lineal entre dos variables. El coeficiente de determinación generalmente se denota en % y marca la eficiencia del método empleado.

Los valores de absorbancia y sus correspondientes concentraciones son sometidos a análisis de regresión simple (48,49).

$$\text{Coeficiente de determinación} = r^2 \times 100$$

1.6.4. Análisis de Regresión Múltiple.

El análisis de regresión múltiple es de gran utilidad en el estudio de las relaciones entre grupos de variables, el cual es probablemente, uno de los métodos estadísticos más usados en la práctica.

En el análisis de regresión se tienen dos grupos de variables: las explicativas y las de respuesta. Como su nombre lo indica, las primeras se usan para tratar de explicar el comportamiento de la segunda, y esta explicación se efectúa mediante un modelo lineal. En nuestro trabajo se utiliza un modelo de Regresión Múltiple, tomando como variable dependiente al Zinc no-ultrafiltrable y como variables independientes a las proteínas y a la edad. El objeto del análisis es describir el porcentaje de variación con respecto al Zinc no-ultrafiltrable aportan las proteínas y la edad y conocer así cual de todas las variables afectan el Zinc no-ultrafiltrable. En este análisis se calcula los coeficientes de correlación múltiple lineal de X_1 (Zinc no-ultrafiltrable) sobre $X_2, X_3 \dots, X_n$ (proteínas y edad). Una ecua-

ción de regresión es una ecuación para estimar una variable dependiente, por ejemplo, X_1 a partir de las variables independientes X_2, X_3, \dots, X_n y se llama ecuación de regresión de X_1 sobre X_2, X_3, \dots, X_n . Con su notación funcional a veces se escribe esto brevemente como:

$$X_1 = F(X_2, X_3, \dots) \quad (48).$$

Para este análisis y para el análisis de regresión lineal simple, los cálculos se realizaron empleando una computadora Modelo B7800 y el paquete de programas: SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Zinc es un metal que tiene un papel esencial en diversas funciones bioquímicas y de distribución y es por esto que se ha administrado en estados de deficiencia humana, tanto en adultos como en niños (1,50). Los niveles de Zinc total y Zinc no-ultrafiltrable encontrados en niños recién nacidos a término completo resultaron ser más bajos que en infantes mayores hasta dos años y que en adultos (44,51).

Se desconoce la influencia de la distribución del Zinc ultrafiltrable y no-ultrafiltrable sobre el nivel de Zinc sérico total y su relación con las fracciones proteicas. El presente estudio plantea evaluar la concentración de Zinc total, Zinc ultrafiltrable y Zinc no-ultrafiltrable y su influencia con la concentración de proteínas en suero de niños normales menores de un año hasta 15 años de edad, los cuales no han sido determinados.

3. OBJETIVOS

- 3.1. Determinar si hay diferencias en la cuantificación simultánea de Zinc total en suero por los métodos de cenizas de fluídos y por precipitación de proteínas.
- 3.2. Determinar los niveles séricos de Zinc total, Zinc ultrafiltrable y Zinc no-ultrafiltrable en una población de niños normales menores de un año hasta 15 años de edad y determinar si la edad es un factor influyente en estos niveles séricos de Zinc.
- 3.3. Determinar la concentración de proteínas totales y la concentración de las fracciones protéicas que incluyen a la Albúmina, Alfa-1, Alfa-2, Beta, Gama y Transferrina y determinar su asociación con el Zinc no-ultrafiltrable.

4. HIPOTESIS

Se considera que los cambios de Zinc ultrafiltrable y Zinc no-ultrafiltrable en suero están relacionados con las proteínas séricas, y que la fracción de Zinc ultrafiltrable que influye en el aprovechamiento del metal es independiente a la cantidad de Zinc total existente.

5. METODOS

Se estudian un total de 128 niños masculinos y femeninos clínicamente sanos entre menores de un año hasta los 15 años de edad que acuden a la consulta externa del Laboratorio Central provenientes de los Servicios Oído, Nariz y Garganta (O.N.G.), Cirugía reconstructiva, Ortopedia y Oftalmología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional, I.M.S.S. La toma de la muestra se hace en ayunas de 7:30 a 8:30 de la mañana (28). Se necesitan 10 ml de sangre coagulada y el suero que se obtiene se coloca en un tubo limpio y libre de metal y se guarda a -20°C hasta el día del ensayo (44).

5.1. Determinaciones de Zinc

5.1.1. Determinación de Zinc en suero desproteínizado.

Se utiliza el método de Davies y colaboradores (52). En un tubo cónico de vidrio se coloca 1 ml de suero, y se agrega un volumen igual de ácido tricloroacético al 25%. El tubo se tapa y se agita vigorosamente en el Vortex, se deja reposar por 10 minutos. El tubo y su contenido se centrifugan a 3000 revoluciones durante 10 minutos, el sobrenadante se transfiere con una pipeta pasteur a un tubo limpio para posteriormente ser aspirado en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica (E.A.A.) y cuantificar el Zinc

presente en el filtrado.

El ácido tricloroacético al 25% se prepara de la siguiente manera: disolver 250 gr. de ácido tricloroacético en agua deionizada y aforar a 1000 ml.

5.1.2. Determinación de Zinc en suero llevado a cenizas.

En un crisol de porcelana se coloca 1 ml de suero. El crisol se mete a la mufla a una temperatura de 500°C por 48 horas. Las cenizas se resuspenden con 1 ml de agua deionizada y 1 ml de ácido tricloroacético al 25%. El sobrenadante se transfiere con una pipeta pasteur a un tubo limpio para posteriormente cuantificarle el Zinc mediante E.A.A.

5.1.3. Determinación de Zinc ultrafiltrable y no-ultrafiltrable.

Para la estimación de Zinc ultrafiltrable en suero se usa la técnica de Farese y colaboradores (53) con algunas modificaciones.

Preparación de las Membranas Cono Centriflo[®]. Se usan membranas cono para ultrafiltración Centriflo[®], tipo CF50A las cuales impiden significativamente el paso de metales ligados a proteínas de peso molecular aproximado a 50 000 ó mayores, mientras que los de menor peso pasan a través

de la membrana (54).

Para asegurar un fluido uniforme en las membranas, éstas se dejan remojar en agua deionizada por lo menos 48 horas antes de usarse cuando son nuevas. Cuando las membranas son reutilizadas se dejan remojar por lo menos 1 hora en agua deionizada antes de usarlas. Los soportes tipo CS1A se enjuagan con abundante agua deionizada. La membrana se coloca en el soporte y éste se rota en sentido contrario a las manecillas del reloj, empujando la membrana hacia abajo firmemente hasta que la punta ó extremidad sobresalga uniformemente y la membrana esté firmemente puesta en el soporte. Hay que tener precaución de no raspar ni plegar el interior de la membrana. El soporte se empuja dentro del tubo colocando la pestaña sobre el mismo. A cada membrana se le agrega 5 ml de agua deionizada y se centrifuga a 500xg, 30 minutos, haciéndolo por duplicado. Para eliminar el exceso de agua de las membranas, éstas se centrifugan a 1000xg, 55 minutos a temperatura ambiente.

Después de la preparación de las membranas, se coloca 1 ml de suero a cada una. El suero se ultrafiltra por centrifugación a 1000xg, 55 minutos a temperatura ambiente. Cuando se obtiene el suero ultrafiltrado se toma una alícuota de 0.5 ml y se le agrega 0.5 ml de ácido tricloroacético al 25%. La estimación de Zinc en éste fluido

final se determina por E.A.A. Los cálculos para el Zinc no ultrafiltrable son mediante la resta de los valores que se obtienen del Zinc total menos los valores que se obtienen de Zinc ultrafiltrable.

Las membranas con residuos de suero son lavadas a presión con abundante agua deionizada. Posteriormente se les agregan 2 ml de agua deionizada a cada membrana y se centrifugan a 500xg, 20 minutos a temperatura ambiente por duplicado quedando así listas para ser reutilizadas.

5.2. Curva de Calibración

En este método es necesario preparar una serie de disoluciones a partir de la disolución patrón. Se miden las absorbancias y se grafican contra las concentraciones respectivas.

5.2.1. Disolución Patrón de Zinc.

Se disuelven 100 mg de Zinc metálico granular en 4.5 ml de ácido clorhídrico grado reactivo y se afora a 500 ml con agua deionizada resultando una concentración final de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

5.2.2. Disolución de trabajo de ajuste de Zinc con una concentración de 200 $\mu\text{g}/100$ ml.

Se diluye 1 ml de disolución Patrón y se afora a

100 ml con agua deionizada. El contenido se pasa a un matraz Erlenmeyer de 250 ml. El matraz aforado utilizado se vuelve aforar con ácido tricloroacético al 25% y se transvasa al Erlenmeyer con los 100 ml antes puestos, el contenido se agita y se tapa.

5.2.3. Estándares de Zinc.

200 $\mu\text{g}/100$ ml	Diluir 1 ml de disolución Patrón y aforar a 100 ml con agua deionizada.
150 $\mu\text{g}/100$ ml	Diluir 0.75 ml de disolución Patrón y aforar a 100 ml con agua deionizada.
100 $\mu\text{g}/100$ ml	Diluir 0.5 ml de disolución Patrón y aforar a 100 ml con agua deionizada.
50 $\mu\text{g}/100$ ml	Diluir 0.5 ml de disolución Patrón y aforar a 200 ml con agua deionizada.
40 $\mu\text{g}/100$ ml	Diluir 20 ml de la disolución de 50 $\mu\text{g}/100$ ml y aforar a 25 ml con agua deionizada.
30 $\mu\text{g}/100$ ml	Diluir 15 ml de la disolución de 50 $\mu\text{g}/100$ ml y aforar a 25 ml con agua deionizada.
20 $\mu\text{g}/100$ ml	Diluir 10 ml de la disolución de 50 $\mu\text{g}/100$ ml y aforar a 25 ml con agua deionizada.

- 10 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Diluir 5 ml de la disolución de 50 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ y aforar a 25 ml con agua deionizada.
- 5 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Diluir 5 ml de la disolución de 50 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ y aforar a 50 ml con agua deionizada.

De cada disolución estándar de Zinc emplear 10 ml y agregar 10 ml de ácido tricloroacético al 25%. El blanco que se utiliza se prepara con 10 ml de agua deionizada y 10 ml de ácido tricloroacético al 25%. Es indispensable que para preparar las disoluciones se utilice agua deionizada. Los estándares de bajas concentraciones deben prepararse en el momento de usarse a partir de una disolución patrón, la cual se conserva en recipientes de polietileno para evitar la adsorción por el vidrio.

5.3. Análisis por Espectrofotometría de Absorción Atómica

5.3.1. Condiciones del Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

Las condiciones del Espectrofotómetro de absorción atómica son las siguientes (55): Lámpara de cátodo hueco específica para Zinc; rango U.V.; longitud de onda de 213.9 nm; presión de aire de 30 lb/sq in ($2.1 \text{ kg}/\text{cm}^2$); presión del acetileno de 10 lb/sq in ($0.7 \text{ kg}/\text{cm}^2$); quemador de 3-ranuras; altura del quemador de 9 mm; orientación

del quemador de 2.5 mm; rendija de 3 y corriente de la lám para de 18 mAmp.

5.3.2. Estimación del Zinc.

Establecidas las condiciones que son constantes en cada determinación, mientras el blanco es aspirado, se abre el digital poniendo en "cero" con el control de "auto cero". Posteriormente se aspira la disolución de trabajo de Zinc de 200 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ y se registra la absorbancia. Se aspiran los estándares de 5,10,20,30,40,50,100,150 y 200 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, para verificar la calibración exacta y la linealidad de desempeño del Espectrofotómetro. Después de la calibración las muestras se agitan y se aspiran obteniéndose los resultados sobre la pantalla digital apareciendo en unidades de absorbancia con un promedio de 10 lecturas. El blanco es aspirado entre muestra y muestra y la disolución de trabajo (200 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) es aspirada después de cada 10 muestras. Si hay alguna variación en la absorbancia, se reajusta el Espectrofotómetro antes de aspirar la siguientes muestras. A la mitad de la cantidad total de las muestras aspiradas se pasan de nuevo los estándares para verificar la calibración. Una vez terminada la cuantificación de Zinc de todas las muestras, se registra de nuevo la absorbancia de los estándares y de la disolución de trabajo para asegurarse de que las condiciones fueran constantes

durante toda la labor (39).

5.4. Determinación de Proteínas

5.4.1. Proteínas totales.

Las proteínas totales séricas se analizan por Refractometría. El refractómetro se estandariza con un suero control hidratado diariamente y con una concentración protéica conocida.

5.4.2. Proteínas por Electroforesis.

La determinación de proteínas por electroforesis se realiza mediante el método de Helena (56). El buffer de Tris-barbital-sodio barbital se disuelve en 750 ml de agua. La membrana de acetato de celulosa se humedece en el buffer durante 5 minutos, se saca quitándole el exceso de buffer con dos papeles secantes.

La membrana se coloca en la celda electroforética previamente llenada con buffer hasta la marca y se le pasa una corriente de 4.5 mAmp. por 5 minutos. La fuente de poder se apaga y se aplican las muestras (máximo 7 por membrana), La celda se tapa y se le pasa nuevamente una corriente de 4.5 mAmp. durante 20 minutos. La membrana se retira de la celda y se pasa a la charola que contiene el colorante rojo de Ponceau durante 7 minutos. La membrana se lava con ácido acético al 5% hasta que la disolución de la

vado salga incolora. Así lavada, se pasa a la membrana a una disolución de alcohol etílico al 95% durante 1 minuto e inmediatamente después se pasa a la disolución de ácido acético (20 ml) y alcohol metílico (80 ml) por 15 segundos. La membrana se saca y se coloca sobre una placa de vidrio de tamaño apropiado. La placa se coloca en una plancha del equipo Helena. Una vez lista la membrana se mete en la mica y así se grafica en el Densitómetro Quick Scan. Las fracciones que aquí se separan son: albúmina, alfa-1, alfa 2, beta y gama.

5.4.3. Determinación de Transferrina.

La técnica que se utiliza para la cuantificación de transferrina es la de Inmunodifusión radial. En cada placa M-Partigen[®]- Transferrina se monta una curva patrón con estándares de concentración conocida de transferrina (69.6, 34.8 y 17.4 mg/100 ml) y estas concentraciones de transferrina se grafican con sus tamaños de diámetro correspondiente. Del diámetro de la muestra en estudio se calcula por medio de la gráfica la concentración. Las muestras aplicadas en los pozos se diluyen 1:10. El anillo de precipitación se deja de 48 a 72 horas de difusión, midiendo después el diámetro del anillo.

5.4.4. Proteínas por Biuret al suero ultrafiltrado.

Las proteínas en el suero ultrafiltrado se determinan por el método de Biuret que a continuación se describe:

- 1° Disolución de Hidróxido de sodio 0.2N. Pesar 8.24gr. de hidróxido de sodio y aforar a 1000 ml con agua destilada.
- 2° Disolución Patrón. Disolver 4.5gr. de tartrato de sodio y potasio en 40 ml de hidróxido de sodio 0.2 N y agregar 1.5 gr. de sulfato de cobre penta-hidratado y agitar vigorosamente, agregar 0.5 gr. de ioduro de potasio y la mezcla se diluye a 100 ml con hidróxido de sodio 0.2 N, Guardar en un frasco cobscuro a temperatura ambiente.
- 3° Solución de Dilución. Pesar 5 gr. de ioduro de potasio y disolverlo en hidróxido de sodio 0.2 N llevándolo a 1000 ml con la misma disolución.
- 4° Reactivo de Biuret. Disolver 20 ml de la disolución patrón con la solución de dilución hasta 100 ml. Guardar a temperatura ambiente.
- 5° Cloruro de Sodio 0.9% (0.5M).
- 6° Disolución Estándar ó suero comercial estándar.

El método se realiza como se esquematiza a continuación:

	Muestra	Estándar	Blanco
Reactivo de Biuret	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Cloruro de sodio (0.9%)	-	-	0.1
Muestra	0.1	-	-
Estándar	-	0.1	-

Esperar 30 minutos y leer contra agua a 546 nm en el Espectrofotómetro Coleman Junior II. Los mg/100 ml se calculan de la siguiente forma:

$$\text{mg/100 ml} = \frac{\text{D.O. muestra} - \text{D.O. blanco}}{\text{D.O. estándar} - \text{D.O. blanco}} \times \text{concentración de estándar.}$$

6. RESULTADOS

Se estudian un total de 128 niños clínicamente sanos, de ambos sexos de menores de un año hasta 15 años de edad, agrupándose en 8 niños por edad. Los niños se encuentran sin ningún padecimiento en el momento de estudio. Se utiliza sangre venosa y se eliminan las muestras hemolizadas.

Los resultados se analizan estadísticamente por los métodos de la prueba "t de Student apareada", análisis de Regresión lineal simple y análisis de Regresión múltiple (47,48,49).

6.1. Curva de Calibración

Las condiciones estándar de trabajo son las mismas para todas las determinaciones incluyendo los estándares.

En el análisis de absorción atómica los estándares y/o muestras son aspirados por una boquilla y el nebulizador introduce las soluciones a la flama a una velocidad constante convirtiéndola en una fina niebla de tamaño de gota uniforme. El rayo luminoso de 213.9 nm de longitud de onda producido por la lámpara de cátodo hueco, se dirige a través del eje longitudinal de la flama hacia un espectrofotómetro, al mismo tiempo las soluciones dispersa-

das en forma de niebla pasan a la flama, donde se evaporan secando la sal, el vapor de ésta se disocia en los átomos de Zinc, los cuales absorben parte de la luz emitida por la lámpara. Dicha absorbancia se mide y se relaciona con la concentración.

Se prepara una serie de disoluciones concentradas de Zinc, las cuales cada una contiene 200µg/ml de Zinc. A partir de estas disoluciones se preparan los estándares para la curva que cubre el intervalo de concentraciones adecuadas (5 a 200 µg/100 ml). Se miden las absorbancias y se grafican contra las concentraciones correspondientes en coordenadas lineales (ver Tabla N° 1).

La curva de calibración conserva su linealidad en el nivel de dichas concentraciones. La lectura de absorbancia es directamente proporcional a la concentración y de acuerdo al análisis de Regresión lineal simple, el Coeficiente de Correlación es de 0.9987, observándose una alta correlación y midiendo así la bondad de ajuste de la ecuación supuesta a los datos (Figura N° 1).

De la absorbancia de las muestras en estudio se calcula por medio de las Gráficas, las concentraciones respectivas de Zinc.

6.2. Valores Normales

En este estudio se cuantifican en cada uno de los 128 niños sanos las siguientes determinaciones: Zinc total, Zinc ultrafiltrable, Zinc no-ultrafiltrable séricos, proteínas totales séricas, albúmina, alfa-1, alfa-2, beta, gama, transferrina y proteínas en suero ultrafiltrado. En la Tabla N° 2 se muestran las concentraciones medias ± 1 D.S. de los 128 niños sanos sin tomar en cuenta la edad.

6.3. Equivalencia de los Métodos de Cuantificación de Zinc total.

La estimación de la concentración de Zinc total en 128 sueros se realiza mediante dos métodos: el primero es llevando el suero a cenizas y el segundo por el método de Davies (52). La cuantificación de Zinc por ambos métodos es por E.A.A.

Para evaluar si ambos métodos son equivalentes, sin tomar en cuenta la edad, se toma un criterio estadístico utilizando el "método de la prueba t apareada". Los resultados que se obtienen se presentan en la Tabla N° 3.

La hipótesis nula propuesta es que ambos métodos son equivalentes y la hipótesis alterna marca que ambos métodos son diferentes. De acuerdo a la t_d y a la t_{tablas} se muestra que los dos métodos son equivalentes, dado que la distribución $t_d < t_{tablas}$ ($p \geq 0.05$) (ver Tabla N° 4), y a la

vez existe una correlación significativa de $r = 0.70$ ($p < 0.01$) Figura N° 2.

6.4. Valores de Zinc

La concentración media de Zinc total, Zinc ultrafiltrable y Zinc no-ultrafiltrable de cada una de la 16 edades estudiadas se muestran en la Tabla N° 5. La concentración media de Zinc total en suero de los niños menores de un año que se estudian en este trabajo, no es significativamente mayor a los niveles de Zinc previamente reportados ($97.75 \pm 16.1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de 8 infantes menores de un año de 4 a 9 meses de edad; $81 \pm 9 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de 8 infantes menores de un año normales; $83 \pm 3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de 15 infantes); pero en el resto de los niños estudiados se obtiene que los niveles de Zinc en suero están significativamente aumentados con respecto a los niveles previamente reportados ($p < 0.01$) ($115.9 \pm 13.8 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de 120 niños normales de uno hasta 15 años de edad; $91.5 \pm 12.7 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de 32 niños de uno a 16 años de edad; $92 \pm 18 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ en 82 adultos normales). Los valores de Zinc total séricos aquí obtenidos no marcan alguna dependencia o cambio referente a la edad ($r = 0.12$ $p < 0.01$).

La concentración media en suero de Zinc no-ultrafiltrable no es significativamente diferente en los niños menores de un año con respecto a los niños estudiados por

Henkin ($74.3 \pm 16.86 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ en infantes de 4 a 9 meses; $56 \pm 5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ en 15 infantes menores de un año; $80 \pm 5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ en niños de 5 meses a 1 año 9 meses de edad) y los valores de Zinc no-ultrafiltrable resultan ser significativamente mayores a aquellos observados en adultos y recién nacidos ($p < 0.01$) ($92.33 \pm 17.2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ en 128 niños normales de menores de 1 año hasta 15 años de edad; $77 \pm 4 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ en 24 sujetos normales, 10 masculinos y 14 femeninos de 18 a 40 años de edad. Los valores de Zinc no-ultrafiltrable con respecto a la edad en conjunto, no marcan algún cambio de correlación ($r=0.14$ $p < 0.01$).

La concentración media de Zinc ultrafiltrable en suero no es significativamente diferente a la obtenida en infantes recién nacidos hasta 21 meses de edad ($23.73 \pm 4.13 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ en infantes menores de 1 año; $27 \pm 4.15 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ en infantes a término; $21 \pm 7.4 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ en infantes de 5 a 21 meses), pero si se obtiene una diferencia significativa ($p < 0.01$) en adultos y recién nacidos ($22.4 \pm 6.2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ en 128 niños menores de 1 año hasta 15 años; $19 \pm 10 \mu\text{g}/\text{dl}$ en 24 adultos). Los valores que se obtienen de Zinc ultrafiltrable tampoco se ven alterados con respecto a algún cambio en las diferentes edades que se estudian en este trabajo, ni se correlacionan con el Zinc total en sus valores ($r=-0.05$ y $r=0.05$ respectivamente $p < 0.01$) (ver Tabla N°6).

La distribución de Zinc total y Zinc ultrafiltrable en las diferentes edades que se estudian, se encuentra ilustrada en la Figura N° 3, comparada a los valores obtenidos previamente en 24 sujetos normales (10 masculinos y 14 femeninos de 18 a 40 años de edad). La Figura N° 4 muestra la distribución de Zinc no-ultrafiltrable comparada con los mismos 24 sujetos normales.

A partir de los valores que resultan de este estudio, se obtiene una matriz de correlaciones lineales. De esta matriz se señalan aquellas correlaciones que presentan una significancia de $p < 0.01$ (ver Tabla N° 7).

6.5. Proteínas

Para estudiar las relaciones que presentan las proteínas que se miden en nuestro estudio con el Zinc no ultrafiltrable, se realiza un análisis de Regresión Múltiple.

Se encuentra como resultado que la edad no influye en los valores que se observan de Zinc, y todas las proteínas en conjunto explican el 8.31% de la variabilidad que se observa en el Zinc unido a proteínas (ver Tabla N° 8).

Tabla N° 1

Estimación de la Absorbancia de los estándares de Zinc por E.A.A.									
n	Concentración $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$								
	200	150	100	50	40	30	20	10	5
1	.201	.151	.100	.050	.040	.030	.020	.010	.005
2	.210	.157	.103	.050	.040	.028	.018	.008	.005
3	.202	.152	.102	.050	.040	.030	.020	.010	.005
4	.200	.152	.103	.055	.045	.035	.026	.016	.011
5	.205	.154	.102	.051	.041	.031	.020	.010	.005
6	.205	.154	.102	.051	.041	.030	.020	.010	.005
7	.211	.158	.106	.053	.042	.032	.021	.011	.005
8	.219	.164	.109	.055	.043	.032	.021	.011	.005
9	.195	.148	.100	.050	.041	.031	.022	.012	.007
10	.195	.146	.098	.049	.040	.030	.020	.010	.005
11	.204	.153	.102	.051	.041	.031	.020	.010	.005
Total = 11	2.247	1.689	1.127	.565	.454	.340	.228	.118	.063
\bar{X}	.204	.153	.102	.051	.041	.030	.020	.010	.005

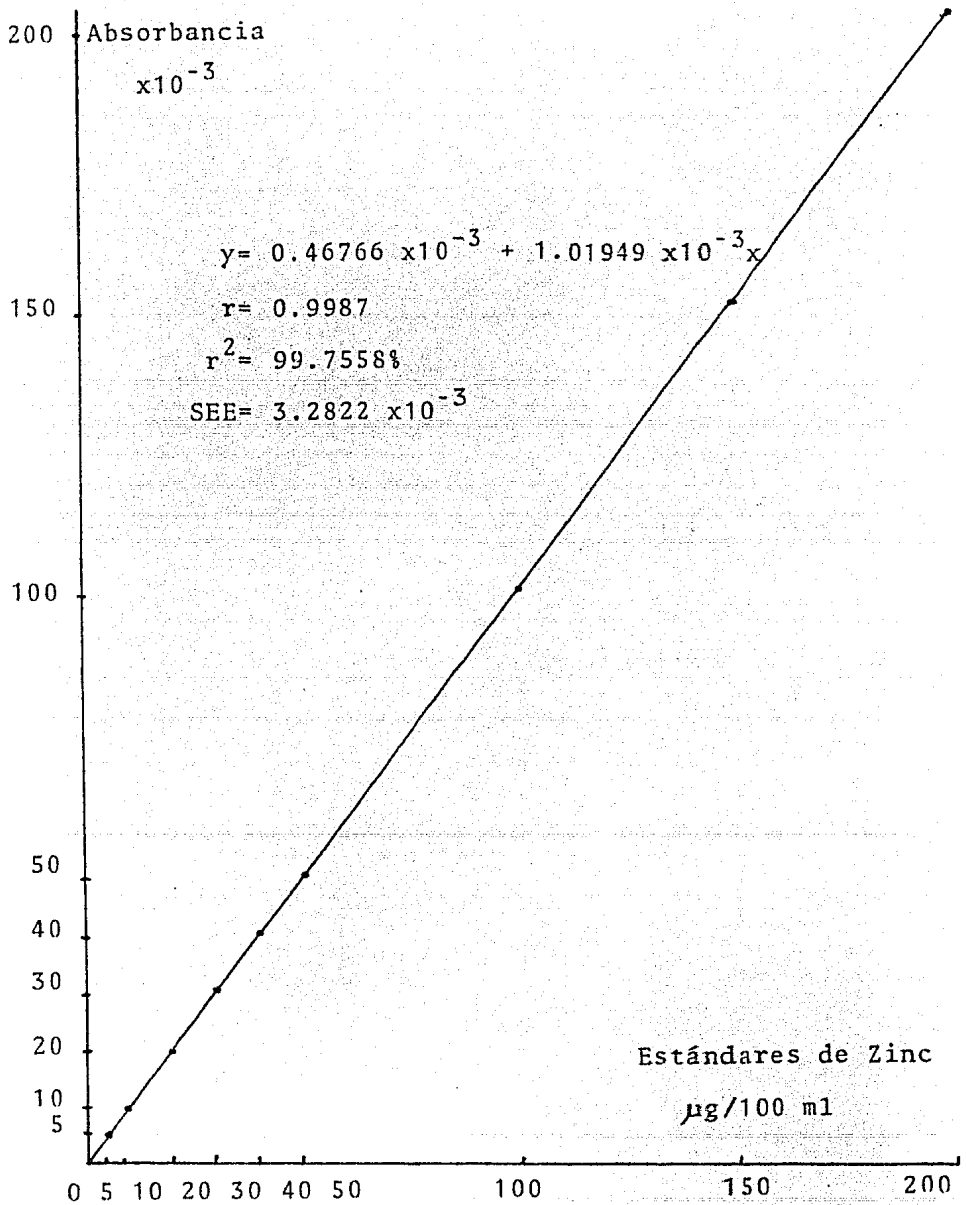


Figura N° 1. Curva de calibración de Zinc.
Estándares de 5 a 200 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de Zinc.

Tabla N° 2

Concentración sérica de Zinc total, Zinc ultrafiltrable, Zinc no-ultrafiltrable, proteínas totales séricas, albúmina, alfa-1, alfa-2, beta, gama, transferrina y proteínas totales en suero ultrafiltrado en niños normales de menores de un año hasta 15 años de edad.			
Determinaciones	\bar{X}	± 1 D.S.	n
1. Zinc total $\mu\text{g}/100\text{ml}$ (llevando el suero a cenizas)	115.7891	15.1495	128
2. Zinc total $\mu\text{g}/100\text{ml}$ (método de Davies)	114.7734	16.2724	128
Zinc ultrafiltrable $\mu\text{g}/100$ ml	22.4375	6.2768	128
Zinc no-ultrafiltrable (Zinc total ₁ - Zinc ultrafiltrable) $\mu\text{g}/100$ ml	93.3516	16.4113	128
Zinc no-ultrafiltrable (Zinc total ₂ - Zinc ultrafiltrable) $\mu\text{g}/100$ ml	92.3359	17.1217	128
Proteínas totales séricas g/ 100 ml	7.4798	0.5678	128
Albúmina g/ 100 ml	4.0822	0.3502	128
Alfa-1 g/ 100 ml	0.2619	0.0478	128
Alfa-2 g/ 100 ml	0.8898	0.1769	128
Beta g/ 100 ml	0.9845	0.1605	128
Gama g/ 100 ml	1.2615	0.2892	128
Transferrina mg/100 ml	325.6016	57.9132	128
Prot. en ultrafiltrado * mg/100 ml	39.6359	15.3391	128

Tabla N° 3

Estimación de Zinc total en 128 sueros de niños normales por el método de suero llevado a cenizas y el método de Davies (52). Ambos determinados por E.A.A.			
	Método de suero llevado a cenizas (M ₁)	Método de Davies (52) (M ₂)	"t" Apareada M ₁ - M ₂
n	128	128	128
\bar{X} $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$	115.7891	114.7734	1.14063
$\pm 1 \text{ D.S.}$	15.1495	16.2724	11.9208
C.V. %	13.0837	14.1778	

69

Tabla N° 4

Fuente de variación	"t" calculada	"t" tablas	Regla de decisión	Conclusión
Método	1.083	1.96	Si $t_d < t_{\text{tablas}}$ no se puede rechazar la hipótesis nula	$p \geq 0.05$ La evidencia muestra que los dos métodos son equivalentes

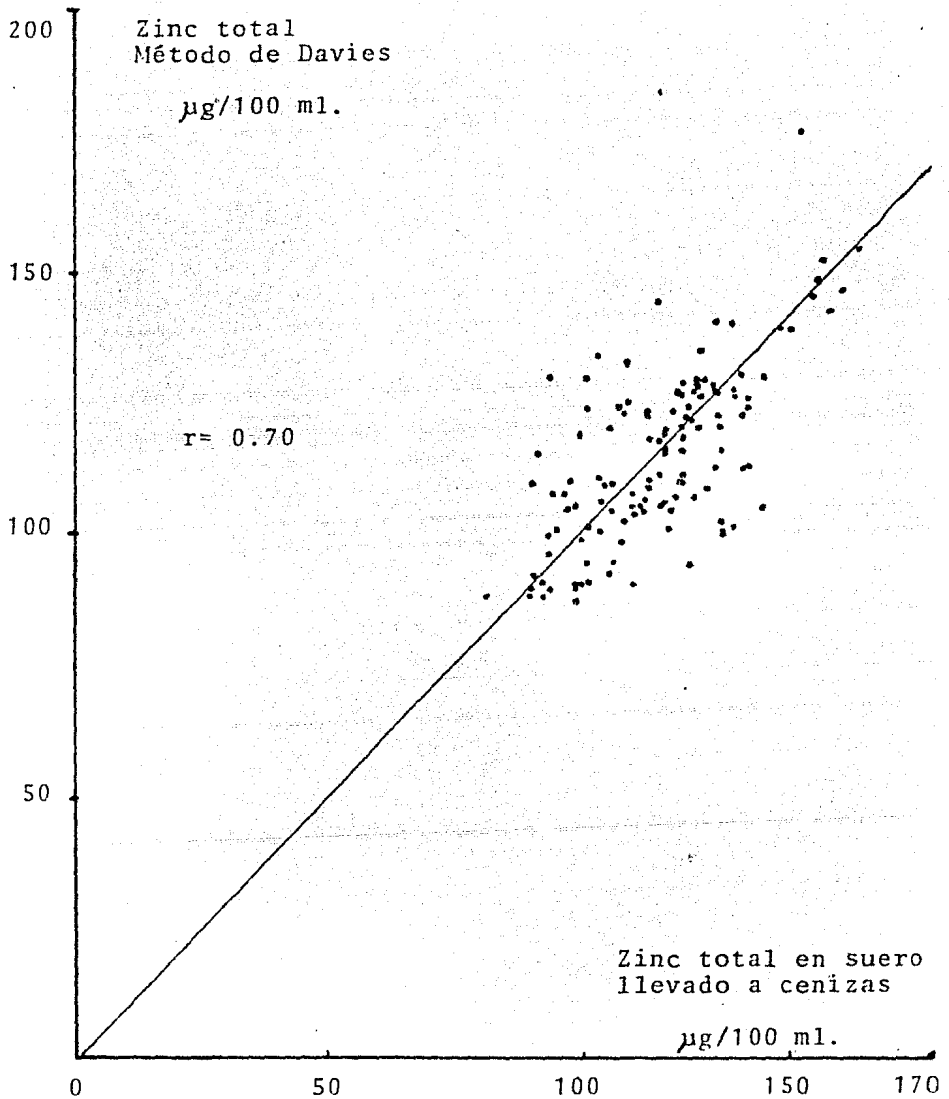


Figura N° 2. Diagrama de dispersión denotando las determinaciones de Zinc total en 128 sueros de niños normales por dos métodos en un sistema de coordenadas .

Tabla N° 5

Valores de Zinc total, Zinc ultrafiltrable y Zinc no-ultrafiltrable séricos en niños normales agrupados por edades ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$).

Edades	Zn total suero en cenizas	Zn total método Davies	Zn ultrafiltrable	Zn no-ultrafilt. cenizas	Zn no-ultrafilt. (Davies)
Menores de 1 año n=8	102.37	97.75	23.37	79	74.37
1 año n=8	120.75	112.5	21	99.75	91.5
2 años n=8	122.87	124.5	26.5	96.37	98
3 " "	106.62	114.87	20.75	85.87	94.12
4 " "	111.75	116.5	24.62	87.12	91.87
5 " "	106.75	105	16	90.75	89
6 " "	127.25	123.25	26.25	101	97
7 " "	123.25	119.25	20.75	102.5	98.5
8 " "	116	109	25.75	90.25	83.5
9 " "	115.75	112	22.25	93.50	89.75
10 " "	123	121.75	19.75	103.25	102
11 " "	117.5	112.75	25.37	92.12	87.37
12 " "	109.25	113	25.25	84	87.75
13 " "	114.25	114.25	20.25	94	94
14 " "	121.12	124	18	103.12	106
15 " "	114.12	115.75	23.12	91	92.62

Tabla N° 6

Valores normales de Zinc					
	EDAD (años)	CONCENTRACION Media+ 1 D.E. $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$	EDAD (años)	CONCENTRACION Media +1 D.E. $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$	NIVEL DE SIGNIFI- CANCIA
Zinc total	<1	97.75 \pm 16.1* (8)	<1	81 \pm 9 ^a (8)	N.S.
			<1	83 \pm 3 ^b (15)	N.S.
	1-15	115.9 \pm 15.8* (120)	1-16	91.5 \pm 12.7 ^a (32)	p < 0.01
		adultos	92 \pm 18 ^{b,c} (82)	p < 0.01	
Zinc no-ul- trafil- trable	<1	74.3 \pm 16.86* (8)	<1	56 \pm 5 ^b (15)	N.S.
	<1-15	92.33 \pm 17.12* (128)	<1-<2	80 \pm 5 ^c (?)	N.S.
			18-40	77 \pm 4 ^c (24)	p < 0.01
Zinc ultra- filtra- ble	<1	23.73 \pm 4.13* (8)	<1	27 \pm 4.15 ^b (15)	N.S.
			<1-<2	21 \pm 7.4 ^c (?)	N.S.
	<1-15	22.4 \pm 6.2* (128)	18-40	19 \pm 10 ^c (24)	p < 0.01

(n)= Número de personas sanas.

*= Valores normales obtenidos en este trabajo (Laboratorio de Gastroenterología, Hospital de Pediatría, C.M.N., I.M.S.S., 1984.)

a= Sánchez, L.F., Tesis recepcional de Post-grado, Hospital de Pediatría, C.M.N., I.M.S.S., 1977.

b= Henkin, R.I., et al., Am.J.Obstet.Gyneco., 110:131, 1971.

c= Henkin, R.I., et al., J.Pediatr., 82:831, 1973.

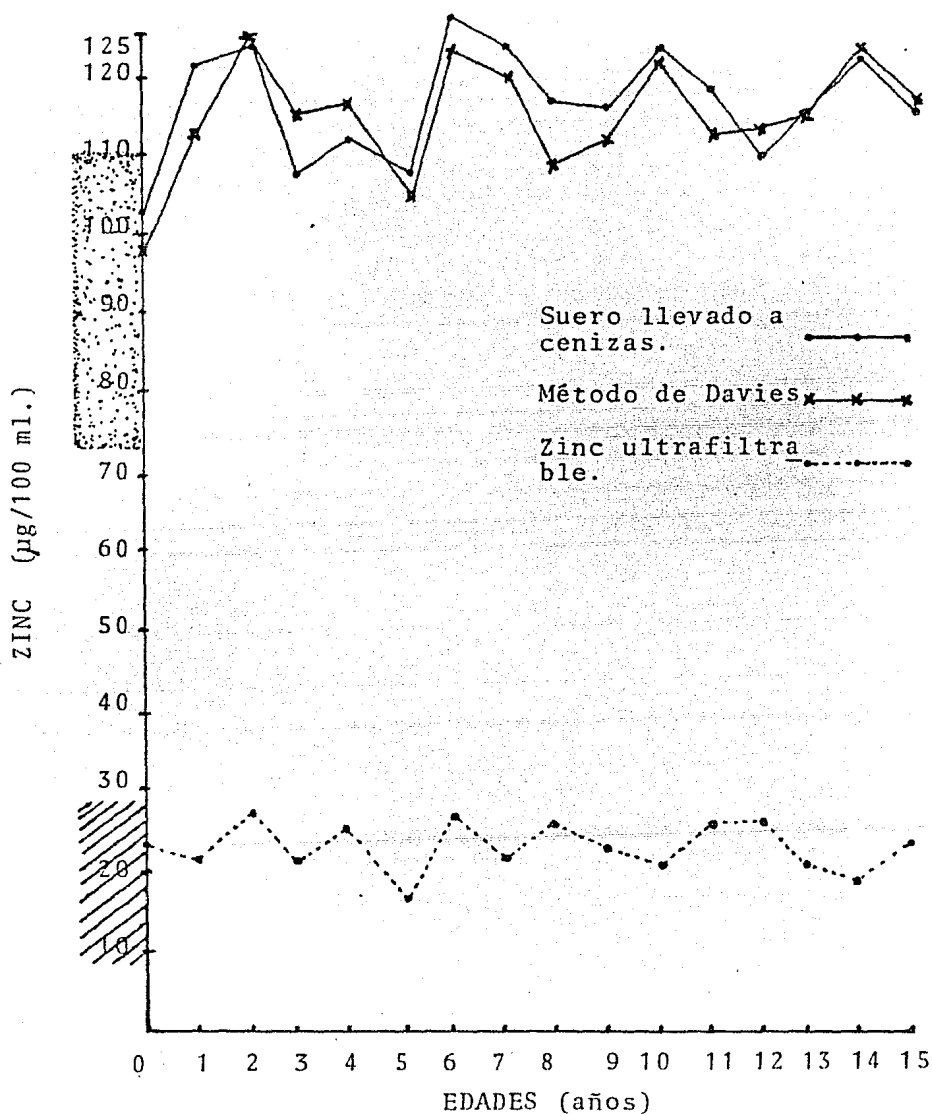


Figura N° 3. Concentración media de Zinc total y Zinc ultrafiltrable sérica en 128 niños normales menores de 1 año hasta 15 años, agrupados en 8 niños por edad. Los valores normales de Zinc total y ultrafiltrable séricos son 92 ± 18 y 19 ± 10 $\mu\text{g}/100$ ml respectivamente, como se muestra en el área sombreada sobre las abscisas.

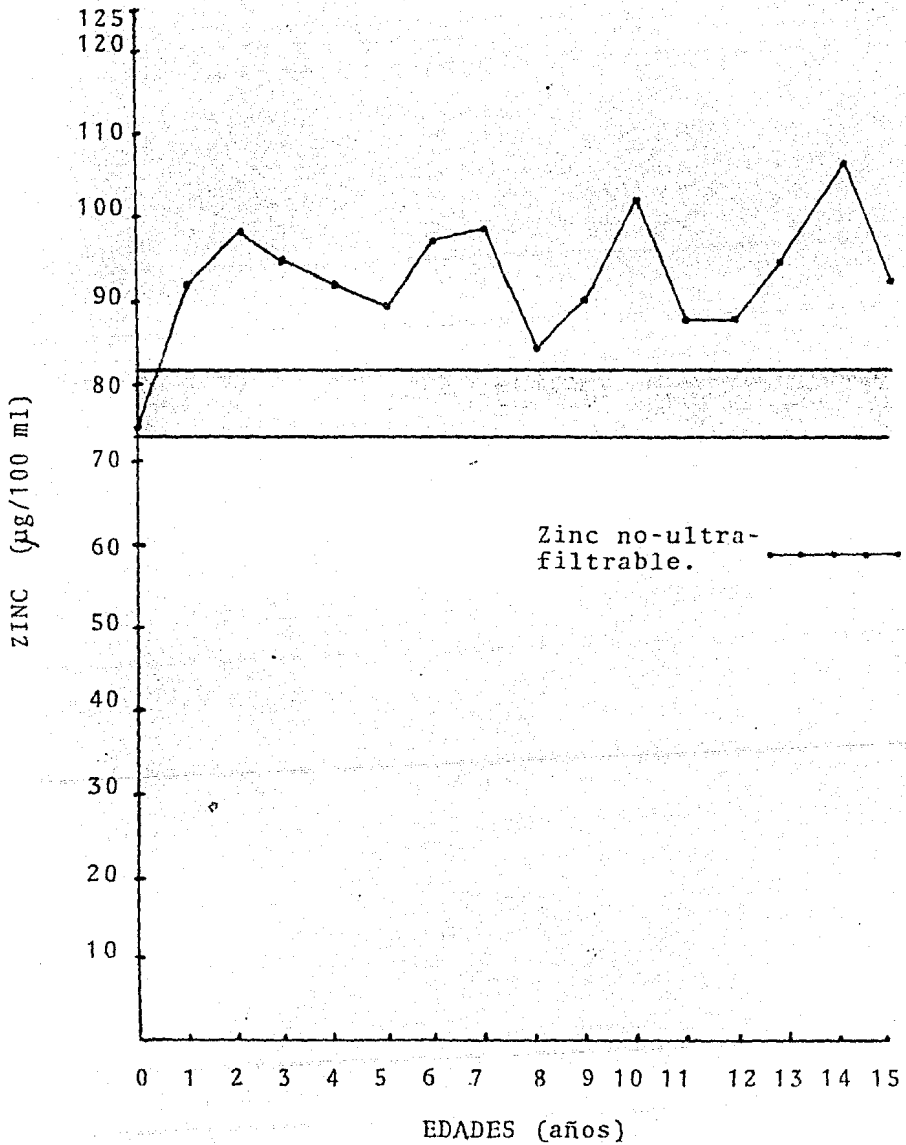


Figura N° 4. Concentración de Zinc no-ultrafiltrable durante los primeros 15 años de vida. El área sombreada indica los niveles normales en adulto (77 ± 4 µg/100 ml).

Tabla N° 7

Variables cuyas correlaciones son significativas para $p < 0.01$	
Parámetro	Se correlaciona con:
Zinc total por el método de suero llevado a cenizas.	Zinc total (Davies) $r=0.70$ Zinc no-ultrafiltrable (Davies) $r=0.669$ Zinc no-ultrafiltrable (cenizas) $r=0.92$
Zinc total por el Método de Davies. (52)	Zinc no-ultrafiltrable (Davies) $r=0.93$ Zinc no-ultrafiltrable (cenizas) $r=0.62$
Proteínas totales séricas	Albúmina $r= 0.60$ Globulina $r= 0.78$ Gama globulinas $r= 0.64$

Tabla N° 8

Variabilidad de Zinc no-ultrafiltrable explicado por las proteínas que se incluyen en el Análisis de Regresión Múltiple.	
Variab ^l es	Porcentaje de variabilidad explicada
Edad	0 %
Albúmina	2.9 %
Globulinas	1.5 %
Transferrina	2.8 %
Proteínas en el suero ultrafiltrado	1.1 %
	Total= 8.3 %

7. DISCUSION

El creciente interés desarrollado en las últimas 4 décadas por la significancia del Zinc en la nutrición de los seres vivos (1) y su especial importancia en la práctica Pediátrica (7), nos guió para la realización de este trabajo y el deseo de contribuir y de integrar nuestros propios resultados de investigación con los dados por otros autores.

El análisis de pequeñas cantidades ó cantidades traza de iones metálicos en varias sustancias por Espectro fotometría de Absorción Atómica ha llegado a ser una técnica útil y ha sido a la vez un método de elección para la rutina en la determinación de Zinc en medicina clínica. Esta técnica se ha usado para la estimación de aproximadamente 70 elementos en los que se incluye el Zinc, el cual ha sido determinado en varios fluídos biológicos. Las pequeñas cantidades de este ion presente en los fluídos ha necesitado de un gran estudio en la preparación de muestras para obtener un radio satisfactorio en la señal. La preparación de las muestras que se utilizan en este estudio para el Zinc incluye: cenizas de fluídos, precipitación en suero de proteínas (52) y ultrafiltración de suero (53,54). Debido que se trabaja con una población pediátrica, las membranas Centriflo[®] de Amicon permiten utilizar pequeños

volúmenes de suero para el Zinc ultrafiltrable (45).

El método comúnmente empleado para la determinación cuantitativa de los elementos por Espectrofotometría de Absorción Atómica es el de Curvas de Calibración. En este trabajo se encuentra que el Zinc obedece a la ley de Lambert y Beer en el rango de las concentraciones de 5 a 200 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ e indica que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración. La curva de calibración conserva su linealidad, sensibilidad e inclinación durante todo su estudio, obteniendo así una eficiencia del método del 99.75%. La desviación de la linealidad continuamente se mide por la inclusión del blanco entre muestra y muestra, y la solución de trabajo por cada 10 muestras. Los estándares son registrados al inicio, a la mitad y al final de las determinaciones. Este procedimiento tiene la ventaja de que los cambios en la linealidad pueden ser registrados a lo largo de una serie de análisis. Para evitar interferencias tanto en las muestras, como en los estándares, éstos deben cumplir las mismas características físicas y químicas. Este método tiene la ventaja de cuantificar Zinc a un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo.

Los resultados que se obtienen en la estimación simultánea de Zinc total sérico por los dos métodos que aquí se presentan, indican que no hay diferencias consis-

tentes en la concentración de Zinc por alguno de los dos métodos que se describen.

De los resultados que se obtienen la mayor fracción de Zinc sérico está unido a proteínas (80.53%) y el resto se considera como Zinc disponible (19.46%). El Zinc protéico está presente en dos formas: el Zinc ligado fuertemente a globulinas, y el Zinc unido débilmente a la albúmina (20,27). Este Zinc enlazado corresponde a la fracción Zinc-macromolecular ó Zinc no-ultrafiltrable. Se ha considerado que el Zinc ultrafiltrable ó Zinc disponible para cualquier actividad fisiológica, está libre y/ó unido a aminoácidos, debido a que esta fracción no muestra electroforéticamente la presencia de proteínas séricas, pero sí manifiesta la presencia de enlaces peptídicos que pueden ser aminoácidos u otras especies en el suero ultrafiltrado. El Zinc ultrafiltrable tiene un papel biológico de gran importancia en la absorción, transporte y metabolismo del metal. Dada su condición "iónica" (libre) y que difunde fácilmente a través de las membranas capilares, ésta es la fracción disponible para cualquier requerimiento necesario del organismo. De los resultados correspondientes a esta fracción se obtiene que el Zinc ultrafiltrable es independiente a la cantidad de Zinc total existente e independiente a su relación con las proteínas. Se ha asociado que el Zinc puede perderse en la orina cuando la por

ción de Zinc ultrafiltrable se encuentre alterado en suero, manteniendo así un equilibrio.

Se observa que las concentraciones medias de Zinc total y Zinc no-ultrafiltrable en niños normales se encuentran por arriba de los valores normales obtenidos en plasma por Henkin y colaboradores (42,44) y por debajo de los valores obtenidos por Chawla (1983) en una población de personas sanas de 10 a >45 años y resultándole un promedio de $143.78 \pm 8.26 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ en suero (57). Se ha argumentado que las determinaciones de Zinc en muestras de plasma deben de preferirse a las muestras de suero, porque el Zinc puede liberarse de los elementos de la sangre durante el proceso de coagulación y separación del suero. Sin embargo, Kosman y colaboradores (1979) no encontraron diferencias entre las concentraciones de Zinc en muestras de suero y muestras de plasma de las mismas personas (28). Las diferencias de estos valores con los obtenidos por los otros autores se pueden atribuir a las variaciones en los hábitos alimenticios de la población, al contenido de Zinc en los diferentes alimentos, en el tipo de suelo de cada región, en el agua y en los diferentes métodos empleados para la estimación de este elemento. También se encuentra una alta correlación entre el Zinc total y el Zinc no-ultrafiltrable, lo que demuestra que existe una dependencia entre ambos valores de Zinc semejante a la obtenida por

Henkin (44), la cual puede asociarse a lo siguiente: primero es que la determinación de Zinc no-ultrafiltrable está dada por la diferencia del Zinc total y el Zinc ultrafiltrable la cual marca cierta dependencia y segundo es que exista un mecanismo por el cual dependiendo de la cantidad de Zinc total existente aumente ó disminuya la afinidad de enlace de Zinc-macromoléculas por el Zinc. También se observa que la concentración de Zinc no-ultrafiltrable está tempranamente disminuída en los infantes menores de un año lo que puede deberse a que el Zinc se encuentre participando en la estabilización de la estructura de macromoléculas, ácidos nucléicos y proteínas ya que indirectamente afectan a su función. Los valores que se obtienen en la concentración media de Zinc ultrafiltrable en niños normales menores de 1 año (4 a 9 meses) y hasta 15 años de edad son semejantes a los valores de referencia reportados previamente (44). La concentración de Zinc total, Zinc ultrafiltrable y Zinc no-ultrafiltrable no dependen de la edad en este estudio, aunque existe controversia acerca de la dependencia de la concentración de Zinc en suero con respecto a la edad (52,57). Estos resultados demuestran un patrón normal específico sin cambios en la concentración de Zinc en suero durante la infancia y adolescencia. Se observa que no hay alteraciones ni cambios en los niveles de Zinc en suero, lo que puede deber-

se al reflejo que alcanza el equilibrio en la actividad de varios sistemas enzimáticos dependientes de Zinc necesarios para el crecimiento normal y desarrollo del hombre. Por lo tanto, la concentración de Zinc libre y Zinc enlazado a proteínas en hígado parece quedar regularmente constante del nacimiento hasta la vida de adulto.

Se evalúa la influencia de las proteínas séricas sobre los valores de Zinc, dado por el análisis de asociaciones entre el Zinc no-ultrafiltrable sérico y los valores séricos de proteínas totales, albúmina, globulinas (alfa-1, alfa-2, beta, gama y transferrina) y proteínas en la fracción ultrafiltrada. Esto se hace con el fin de determinar si la concentración sérica de Zinc ultrafiltrable y Zinc no-ultrafiltrable debieran estar relacionadas a las concentraciones séricas de estas proteínas. Se encuentra que el más alto porcentaje de variabilidad explicado está dado con la concentración de Zinc no-ultrafiltrable sérico y las proteínas totales, albúmina y transferrina. Esto explica en cierta forma que la albúmina y la transferrina compiten por los sitios de enlace del Zinc para su transporte (16,18,20). Sin embargo, esta poca asociación no favorece la hipótesis de que la concentración de Zinc no-ultrafiltrable sérico deba ser rectificado y relacionado a las variaciones en las proteínas totales séricas, albúmina ó transferrina a fin de reducir la variación biológica

(referente a los valores) de Zinc sérico. Esto indica que la concentración sérica de Zinc ultrafiltrable y Zinc no-ultrafiltrable está principalmente determinado por otros factores que los dados por los niveles séricos de albúmina/proteínas totales. En general los valores de Zinc total, Zinc ultrafiltrable y Zinc no-ultrafiltrable no mostraron cambios ni relaciones con la edad y con los valores de proteínas totales, albúmina, alfa-1, alfa-2, beta, gama y transferrina.

8. CONCLUSIONES

- 8.1. La comparación de los dos métodos que se presentan para la determinación de Zinc total, estudiado en un fluido de suero, indica que no hay diferencias consistentes en la concentración de Zinc estimado por cualquiera de los dos métodos que se describen. Dada la condición equivalente de ambos métodos, el filtrado que se obtiene de la precipitación de proteínas en suero es un método de elección en la Química Clínica, más rápido y de fácil manejo.
- 8.2. Los niveles séricos de Zinc total, Zinc ultrafiltrable y Zinc no-ultrafiltrable presentan un patrón específico normal sin cambios en las diferentes edades que se estudian. La edad no es un factor que influye en estos niveles séricos de Zinc.
- 8.3. Se determinan los niveles séricos de proteínas totales, albúmina, alfa-1, alfa-2, beta, gama, transferrina y proteínas al suero ultrafiltrado en esta población pediátrica y se presenta que sus valores no afectan ni se asocian con el Zinc unido a macromoléculas ó Zinc no-ultrafiltrable.
- 8.4. Actualmente los elementos traza han adquirido impor-

tancia considerable en la nutrición pediátrica y pre-natal. Se han identificado síndromes de deficiencia específicos para Zinc y otros metales en una gran variedad de circunstancias y es probable que la deficiencia de otros elementos traza que sean necesarios para el desarrollo y crecimiento normal sean reconocidos en el futuro.

- 8.5. Los Pediatras deben de estar de acuerdo en la importancia práctica de estos micronutrientes y de las circunstancias en las cuales la deficiencia específica del Zinc ó de otros elementos traza llegan probablemente a ocurrir, a fin de que esto pueda ser prevenido, reconocido y tratado apropiadamente.
- 8.6. En general las mediciones y estudios del Zinc son de gran ayuda y apoyo para la Medicina Clínica.

9. BIBLIOGRAFIA

- 9.1. Underwood, E.J.: "Trace elements in human and animal nutrition", Chapter 8: Zinc, 4rd. Edition, Academic Press. New York, London, 1977.
- 9.2. Burch, R.E., Hahn, H.K.J., and Sullivan, J.F.: Newer Aspects of Roles of Zinc, Manganese, and Copper in Human Nutrition, Clin.Chem., 21:501, 1975.
- 9.3. Vallee, B.L.: Biochemistry, Physiology and Pathology of Zinc, Physiol.Rev., 39:443, 1959.
- 9.4. Fernández, J., Iñiguez, C., y Carreras, J.: Metabolismo del Zinc y su significado biológico, Rev.Clin.Española, 151:1, 1978.
- 9.5. Parisi, A.F., Vallee, B.L.: Zinc metalloenzymes: Characteristics and significance in Biology and Medicine, Amer.J.Clin.Nutr., 22:1222, 1969.
- 9.6. Dreosti, I.E., and Hurley, L.S.: Depressed thymidine kinase activity in Zinc-deficient rat embryos, Exp. Biol.Med., 150:161, 1975.
- 9.7. Hambidge, K.H.: The role of Zinc and other trace metals in Pediatric Nutrition and health, Ped.Clin.N.Am., 24:95, 1977.
- 9.8. Kelsay, J.L., Jacob, R.A., and Prather, E.S.: Effect of fiber from fruits and vegetables on metabolic responses of human subjects. III Zinc, copper, and

- phosphorous balances, *Am.J.Clin.Nutr.*, 32:2307, 1979.
- 9.9. Oberleas, D., Prasad, A.S.: Growth as affected by Zinc and protein nutrition, *AmJ.Clin.Nutr.*, 22:1304, 1969.
- 9.10. Miller, W.J., Blackman, D.M., Gentry, R.P., Pitts, W.J., and Powell, G.W.: Absorption, excretion, and retention of orally administered Zinc-65 in various tissues of Zinc-deficient and normal goats and calves, *J.Nutrit.*, 92:71, 1967.
- 9.11. Neathery, M.N., Lassiter, J.W., Miller, W.J., and Gentry, R.P.: Absorption, excretion, and tissue distribution of natural organic and inorganic Zinc-65 in the rat, *Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.*, 149:1, 1975.
- 9.12. Seal, C.J., and Heaton, F.W.: Chemical factors affecting the intestinal absorption of Zinc in vitro and in vivo, *Br.J.Nutr.*, 50:317, 1983.
- 9.13. Edwards, H.H.: The availability to chicks in various compounds and ores, *J.Nutr.*, 69:306, 1959.
- 9.14. Van Campen, D.R.: Copper interference with the intestinal absorption of Zinc-65 by rats, *J.Nutr.*, 97:104, 1969.
- 9.15. Emes, J.H., Arthur, D.: The site of Zinc absorption in the rat small intestine; *Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.*, 148:86, 1975.
- 9.16. Evans, G.W., Grace, C.I., and Votava, H.J.: A proposed

- mechanism for Zinc absorption in the rat, *Amer.J. Physiol.*, 228:501, 1975.
- 9.17. Hahn, C., and Evans, G.W.: Identification of a low molecular weight ^{65}Zn complex in rat intestine, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 144:793, 1973.
- 9.18. Evans, G.W.: Transferrin function in Zinc absorption and transport, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 151:775, 1976.
- 9.19. Parr, W.H.: Distribution of protein-bound Zinc in normal and Zinc-deficient lamb plasma, Second European Nut. Conference Munich, 1976. *Nut. Metab.* 21 Suppl., 1:48, 1977.
- 9.20. Prasad, A.S., Oberleas, D.: Binding of Zinc to amino acids and serum proteins in vitro, *J. Lab. Clin. Med.*, 76:416, 1970.
- 9.21. Bartholomew, M.E., Tupper, R., and Wormall, A.: Incorporation of Zn^{65} in the sub-cellular fractions of the liver and spontaneously occurring mammary of mice after injection of Zinc-Glycine containing Zn^{65} , *Biochem. J.*, 73:256, 1959.
- 9.22. Rosoff, B., and Martin, C.: Influence of gonadotrophins on Zn-65 uptake and organ weights in rats, *Amer. Soc. Exp. Biol.*, 2:316, 1966.
- 9.23. Petering, H.G., Yeager, D.W., and Whitherup, S.O.: Trace metal content of hair I. Zinc Copper content of

human hair in relation to age and sex, Arch. Environ Health, 23:202, 1971.

- 9.24. Koo, S.I., and Turk, D.E.: Effect of Zinc deficiency on the ultrastructure of the pancreatic acinar cell and intestinal epithelium in the rat, J. Nutr., 107:896, 1977.
- 9.25. Feinglos, M.N., Jegasothy, B.V.: "Insulin" allergy due to Zinc, The Lancet, 1:22, 1979.
- 9.26. Foley, B., Johnson, S.A., Hackley, B., Smith, J.C., and Halsted, J.A.: Zinc content of human platelets, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 128:265, 1968.
- 9.27. Song, M.K., and Adham, N.F.: Determination of native Zinc content of alpha-2-macroglobulin in normal, hyperzincemic and hipozincemic sera by sucrose density gradient centrifugation, Clin. Chim. Acta., 99:13, 1979.
- 9.28. Kiilerich, S., Christensen, M.S., Naestoft, J., and Christiansen, C.: Determination of Zinc serum and urine by Atomic Absorption Spectrophotometry: relationship between serum levels of Zinc and proteins in 104 normal subjects, Clin. Chim. Acta., 105:231, 1980.
- 9.29. Fujioka, M., and Liberman, L.: A Zinc requirement for synthesis of deoxyribonucleic acid by rat liver, J. Biol. Chem., 239:1164, 1964.

- 9.30. Fosmire, G.J., Sandstead, H.H.: Effects of Zinc deficiency on compositional development and protein synthesis in liver, heart, and kidney of the suckling rat, *Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.*, 154:351, 1977.
- 9.31. Chesters, J.K.: The role of Zinc ions in the transformation of lymphocytes by phytohaemagglutinin, *Biochem.J.*, 130:153, 1972.
- 9.32. Scrutton, M.C., Wu, C.W., and Golthawait, D.A.: The presence and possible role of Zinc in RNA polymerase obtained from *Escherichia coli*, *Proc.Acad.Sci.*, 68:2497, 1971.
- 9.33. Coleman, J.E.: Carbonic anhydrase: Zinc and mechanism of catalysis, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429:29, 1984.
- 9.34. Vallee, B.L., and Neurath, H.: Carboxypeptidase, a Zinc metalloenzyme, *J.Biol.Chem.*, 217:253, 1955.
- 9.35. Vallee, B.L., Wacker, W.E.C., Bartholomay, A.F., and Hoch, F.L.: Zinc metabolism in hepatic dysfunction, *N.Engl.J.Med.*, 257:1055, 1957.
- 9.36. Coello, R.P., and Díaz, B.S.: "Clinical disorders in Pediatrics nutrition", Chapter 14: Zinc deficiency in malnutrition, Department of Gastroenterology, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional, Ins-

tituto Mexicano del Seguro Social, Mexico city.
Lifphis, Firma, 1982.

- 9.37. Walraven, P.A.: Nutritional importance of Copper and Zinc in neonate and infants, *ClinChem.*, 29:185, 1980.
- 9.38. Makino, T., and Takahara, K.: Direct determination of plasma Copper and Zinc in infants by Atomic Absorption with discrete nebulization, *Clin.Chem.*, 27:1445, 1981.
- 9.39. Meret, S., and Henkin, R.I.: Simultaneous direct estimation by Atomic Absorption Spectrophotometry of Copper and Zinc in serum, urine, and cerebrospinal fluid, *Clin.Chem.*, 17:369, 1971.
- 9.40. Hackley, B.M., Smith, J.C., Halstead, J.A.: A simplified method for plasma Zinc determination by Atomic Absorption Spectrophotometry, *Clin.Chem.*, 14:1, 1969.
- 9.41. Watly, B.M.: "Química Analítica", Capítulo 25: Espectroscopía de Absorción Atómica, 1a. Edición, Edit. Alhambra Mexicana, S.A., México, 1982.
- 9.42. Henkin, R.I., Marshall, J.R., and Meret, S.: Maternal-fetal metabolism of Copper and Zinc at term, *Am.J. Obstet.Gynec.*, 110:131, 1971.
- 9.43. Henkin, R.I., and Smith, F.R.: Zinc and Copper metabolism in acute viral hepatitis, *Am.J.Med.Sci.*, 264:410, 1972.

- 9.44. Henkin, R.I., Schulman, J.D., and Schulman, C.B.: Changes in total, nondiffusible, and diffusible plasma Zinc and Copper during infancy, *J. Pediatr.*, 82:831, 1973.
- 9.45. Whitehouse, R.C., Prasad, A.S., and Cossack, Z.T.: Determination of ultrafiltrable Zinc in plasma by flameless Atomic Absorption Spectrophotometry, *Clin. Chem.*, 29:1974, 1983.
- 9.46. Rose, G.A.: A simple and rapid method for the measurement of plasma ultrafiltrable and ionized calcium, *Clin. Chim. Acta.*, 37:342, 1971.
- 9.47. Daniel, W.W.: "Estadística con aplicaciones a las ciencias sociales y a la educación", Capítulo 4: Distribuciones muestrales, 1a. Edición, McGraw Hill de México, 1981.
- 9.48. Spiegel, M.R.: "Estadística", Capítulos 13, 14, 15: Curva de ajuste y método de mínimos cuadrados, Teoría de la correlación y Correlación Múltiple y parcial, 1a. Edición, Mc Graw Hill de México, 1983.
- 9.49. Arredondo, J.L., Hernández, A., Ochoa, R.M., y Ponce, J.: "Aplicaciones de Técnicas del Análisis multivariado en el estudio de embalses temporales", Instituto de Investigaciones en Matemáticas aplicadas y en sistemas, U.N.A.M., 300, 1982.
- 9.50. Coello, R.P.: Acrodermatitis enteropathica treated

- with with Zinc sulfate, Biol.Med.Hosp.Inf. (Méx), 34:331, 1977.
- 9.51. Sánchez, L.F.: Determinación de Zinc sérico en niños sin desnutrición y desnutridos con y sin infección, Tesis recepcional de Post-grado, Hosp. de Pediatría, U.N.A.M., México, D.F., 1977.
- 9.52. Davies, I.J.T., Musa, M., and Dormandy, T.L.: "Principles and technics", Determination of Zinc serum. Method of Davies modified, Second Edition, Ed. Richard J. Henry, 1974.
- 9.53. Farese, G., Mager, M., and Blatt, W.F.: A membrane ultrafiltration procedure for determining diffusible Calcium in serum, Clin.Chem., 16:226, 1970.
- 9.54. Farese, G., and Mager, M.: Protein-free filtrates obtained by membrane ultrafiltration, Clin.Chem., 16:280, 1970.
- 9.55. Davies, I.J.T., Musa, M., and Dormandy, T.L.: Measurements of plasma Zinc. Part I. In health and disease, J.Clin.Path., 21:359, 1968.
- 9.56. Helena Laboratories: Serum protein Electrophoresis procedure. February, 1979.
- 9.57. Chawla, L.S., Verman, P.N., and Puri, V.K.: Study of trace elements (Zinc, Iron, Copper) and Magnesium in normal healthy population, J.Assoc.Physicians, 31:141, 1983.

- Colorante Ponceau	Lab. Helena
- H.R. Buffer	Lab. Helena
- Suero Humano Estándar 69.6 mg/dl de Transferrina	Laboratorios Behringwerkw A.G Malbur.
- Acido Acético Glacial (R.A.)	Merck
- Alcohol Metílico (R.A.)	Merck
- Alcohol Etilico (R.A.)	Merck
- Acido Clorhídrico (R.A.)	Monterrey
- Hidróxido de Sodio (R.A.)	Monterrey
- Tartrato de Sodio y Potasio (R.A.)	Mallinckrodt
- Sulfato de Cobre 5.H ₂ O (R.A.)	Merck
- Ioduro de Potasio (R.A.)	Mallinckrodt

A.3. Material de vidrio con lavado especial*.

- Tubos de ensayo de:
 - 12 x 75 mm
 - 12 x 100 mm
- Tubos cónicos con tapón esmerilado de 15 ml.
- Matraces aforados de 25, 50, 100, 200, 250 y

de 500 ml.

- Matraces Erlenmeyer de 125, 250, 500 y 100 ml.
- Pipetas volumétricas de 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15 y 20 ml.
- Pipetas gravimétricas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Pipetas pasteur.
- Crisoles de porcelana de 100/40.

* Lavado especial del material de vidrio.

El tratamiento de lavado especial de este material de vidrio consiste en: lavado con jabón de bajo contenido en metales, especial para vidriería. Se enjuaga 5 veces con agua destilada. Este material de vidrio se deja remojar en ácido nítrico al 50% durante 48 horas procurando que el ácido ocupe las partes internas de los tubos, pipetas, matraces, etc. Pasando las 48 horas el material se enjuaga de 3 a 5 veces con agua deionizada y se seca.

Las precauciones que se tienen con este material de lavado especial con ácido nítrico en cuanto a su manejo son las siguientes:

- Se tiene cuidado de no contaminar con las manos la boca de los tubos, matraces, vasos, etc., cuando se utiliza el material seco.
- No se toca con los dedos la parte del papel parafilm que se pone en contacto con la boca de tubo

que contiene la muestra.

A.4. Equipos.

- Jeringas de plástico desechables de 20 ml.
- Agujas de 20x38 mm (1 1/2).
- Túbos Cónicos de 25ml CT1 Amicon
(policarbonato) Corporation
1-122F
- Soporte Cónico Amicon
(polietileno) Corporation
1-122F
- Membranas Cono Centriflo[®] Amicon
Tipo CF50A (inerte, polí- Corporation
mero no celuloso laminado 1-122F
y duro)
- Membranas de Acetato de Laboratorios
Celulosa para Electrofore- Helena
sis.
- Microdispensor de 5 ul.
- Placas de Inmunodifusión M-Partigen[®]
Radial. Transferrina.
- Tubos Capilares. Lab. Helena

A.5. Material Biológico.

- 128 niños clínicamente sanos menores de 1 año
hasta 15 años de edad, masculinos y femeninos.
- 10 ml de sangre coagulada.

- 4 a 4.5 ml de suero.