



11-2
280

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFECTO DEL ZINC SOBRE LA HIPERSENSIBILIDAD TARDIA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MONICA ALICIA AGUIRRE RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Inmunodeficiencias.....	3
2.1.1 Inmunodeficiencias primarias.....	4
2.1.2 Inmunodeficiencias secundarias.....	7
2.1.3 Desgaste.....	10
2.2 Desnutrición e inmunidad.....	14
2.3 Zinc.....	21
2.3.1 Generalidades.....	21
2.3.2 Consecuencias de la deficiencia de zinc.....	22
2.3.3 Zinc y Sistema Inmunitario.....	24
2.4 Hipersensibilidad tardía.....	37
3. Objetivos e Hipótesis.....	41
4. Diseño del experimento.....	43
5. Material.....	44
5.1 Material biológico.....	44
5.2 Reactivos.....	44
6. Metodología.....	46
6.1 Inducción del desgaste.....	46
6.2 Administración de zinc al animal desgastado.....	46
6.3 Inducción y medición de la hipersensibilidad tardía.....	46
6.4 Absorción atómica.....	46
6.5 Estadística.....	47
7. Resultados.....	48
7.1 Desgaste.....	48
7.2 Hipersensibilidad tardía en el animal desgastado.....	48
7.3 Concentración intratímica de zinc en el animal desgastado.....	49
7.4 Relación entre la concentración intratímica de zinc zinc y la intensidad de las reacciones de hipersensibilidad tardía.....	49
7.5 Hipersensibilidad tardía después de la suplementación con Zinc en el animal desgastado.....	50
7.6 Concentración intratímica de zinc en el animal desgastado suplementado con zinc.....	50
7.7 Hipersensibilidad tardía en el animal sano suplementado con zinc.....	51

7.8 Evaluación de la concentración de zinc en tejido no linfoide.....	51
7.9 Gráficas.....	53
8. Discusión de Resultados.....	62
9. Conclusiones.....	71
10. Resumen.....	73
11. Tablas.....	75
12. Apéndice.....	80
13. Bibliografía.....	83

En los últimos años, se han realizado diversos trabajos cuyos resultados han permitido ampliar el campo de la inmunología, con el fin de establecer nuevas terapéuticas a enfermedades para las cuales, hasta el momento, no hay tratamiento o éste resulta agresivo y/o con reacciones secundarias.

Los trabajos realizados, en que se han empleado diversos micronutrientes reportan que éstos poseen propiedades tanto estimulantes como supresoras sobre diversos componentes de el sistema inmunitario.

Uno de estos micronutrientes es el zinc, el cual ha cobrado gran importancia por su capacidad inuncestimulante, ampliamente comprobada en múltiples trabajos que demuestran su participación como cofactor de muchas metaloenzimas, así como su asociación con elementos del sistema inmunitario.

Este trabajo se ha dedicado a investigar un aspecto más del efecto inuncestimulante del zinc sobre una inmunodeficiencia, empleando para ello, un modelo experimental que representa una

inmunodeficiencia secundaria de carácter transitorio, desarrollado en el Laboratorio de Inmunología de el Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM.

Este modelo experimental se induce en ratones recién nacidos mediante inoculaciones IP de estafilococos. A lo largo del período de tratamiento los ratones van presentando un deterioro físico paulatino y particularmente, un desgaste inmunológico. Es exactamente sobre este desgaste inmunológico que vamos a observar el efecto inmunoestimulante del zinc, para determinar su posible utilidad como terapéutico a futuro.

Es importante resaltar que este modelo experimental por su carácter transitorio y por el tipo de trastornos inmunológicos que produce, parece reproducir las complicaciones y/o consecuencias de infecciones graves que se presentan en el humano, condición que representa un gran problema a nivel mundial por el número tan alto de niños desnutridos, y por consiguiente, susceptibles padecer diversas enfermedades.

El trabajo consiste en evaluar la inmunidad celular, mediante reacciones de hipersensibilidad tardía, primero en ratones desgastados y después en ratones desgastados suplementados con zinc, para probar su efecto inmunoestimulante reflejado en un incremento en la intensidad de las reacciones de hipersensibilidad tardía.

2.1 INMUNODEFICIENCIAS

El sistema inmunitario ayuda al individuo en la defensa contra el ataque de agentes infecciosos, mediante las interacciones (1), principalmente de:

- La inmunidad mediada por anticuerpos (células B)
- La inmunidad mediada por células (células T)
- Fagocitosis y
- Complemento

Bajo ciertas condiciones, inherentes a la condición fisiológica del individuo, el sistema inmunitario puede fallar provocando alteraciones en la respuesta inmunológica (2) como son:

- a) Reacción anormal contra lo propio (autoinmunidad)
- b) Reacción neoplásica (mielomas, leucemias, etc.)
- c) Reacción contra antígenos no patógenos (alergias)
- d) Depósito de complejos inmunes
- e) Falta de respuesta adecuada (inmunodeficiencias)

Esta clasificación resulta de utilidad para agrupar las principales enfermedades inmunológicas (3).

Las inmunodeficiencias son desordenes originados por diversas causas (4) dando como resultado un incremento en la

susceptibilidad a infecciones.

Las inmunodeficiencias se pueden clasificar en primarias o secundarias de acuerdo a su origen. Las inmunodeficiencias primarias (4) son las que se originan a partir de desordenes genéticos principalmente, mientras que las secundarias (4) evolucionan como consecuencia de alguna enfermedad principal.

2.1.1 INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

Las inmunodeficiencias primarias se originan, como ya se mencionó, por diversos desordenes genéticos los cuales incluyen (4):

- Defectos en la diferenciación celular. Se han observado defectos, inclusive, desde el desarrollo de la célula madre provocando profundas deficiencias tanto de células B como de células T. Puede haber alteraciones en diversas etapas de diferenciación, que solo afecten la maduración y funcionalidad de células T o la conversión de células pre-B en células B maduras.
- Deficiencias enzimáticas. Una producción deficiente de ciertas enzimas puede provocar la acumulación de productos tóxicos para los linfocitos, como desoxirribonucleótidos que no se metabolizan por la ausencia de la enzima adenosín deaminasa.
- Síntesis defectuosa de alguna proteína en particular. Un número importante de inmunodeficiencias se atribuyen a la falta de alguna proteína específica, como IgG₂ o algún componente del complemento. Puede suceder que exista la proteína pero, que no sea

funcional.

- Anormalidades cromosómicas. Una gran parte de las inmunodeficiencias primarias contempla este defecto como causa principal de su aparición. Muchas se asocian a genes recesivos, aunque hay una serie de síndromes o enfermedades que no siguen un patrón determinado en la herencia de las anormalidades.

Las inmunodeficiencias primarias se pueden clasificar, también, por los trastornos que originan, en (1):

a) Enfermedades por inmunodeficiencias de anticuerpos. Los trastornos por inmunodeficiencias de anticuerpos comprenden un espectro de enfermedades con las inmunoglobulinas disminuidas que fluctúa entre la ausencia total de todas las clases hasta la deficiencia selectiva de una sola clase de inmunoglobulina (1).

Las infecciones más comunes en este tipo de inmunodeficiencias suelen ser causadas por microorganismos gram positivos, en su mayor parte, del tipo oportunista (5).

La sintomatología hallada en enfermos con este tipo de trastorno varía de acuerdo al grado de la deficiencia de anticuerpos (1) y la mayoría responde en forma razonada al tratamiento con inmunoglobulinas.(5)

b) Enfermedades por inmunodeficiencia celular. Estos trastornos pueden ocasionarse debido a defectos congénitos (6) aunque

también se asocia con ciertas anomalías en la inmunidad de las células B por la estrecha relación que existe entre ambas debido a las interacciones que se llevan a cabo para responder ante un antígeno (1).

c) Enfermedades por inmunodeficiencias combinadas. Estas enfermedades varían en etiología y gravedad, resultando en una inmunidad defectuosa, parcial o total, tanto de células T como B.

d) Disfunción fagocitaria. Los trastornos de las células fagocíticas pueden deberse a defectos extrínsecos e intrínsecos (1). Los primeros incluyen supresión del número total de fagocitos por agentes inmunosupresores, interferencia de la fagocitosis por glucocorticoides, quimiotaxia anormal de neutrófilos debido a deficiencias en el complemento. Los trastornos intrínsecos se relacionan con deficiencias enzimáticas en la vía metabólica básica para la destrucción de los microorganismos.

e) Anormalidades del complemento, que se refiere básicamente a la deficiencia de las moléculas que lo componen:

- C1q, C1r, C1s
- C2
- C3 (tipo I, tipo II)
- C4.....C9

2.1.2 INMUNODEFICIENCIAS SECUNDARIAS

Las alteraciones en la función inmunológica y un aumento en la susceptibilidad a infecciones pueden ser el resultado de diversas enfermedades sistémicas (4). Estas formas secundarias de inmunodeficiencias son más comunes que las primarias.

Puede haber pacientes, con alguna enfermedad primaria, cuyo sistema inmunitario esté intacto, pero, a medida que evoluciona la enfermedad, sus defensas se vuelven transitoria o permanentemente anormales.

Con frecuencia, estas deficiencias se asocian con alteraciones en la inmunidad celular, más que con la inmunidad humoral (3) y, en conjunto, son menos graves que las inmunodeficiencias primarias. Sin embargo, es posible que su efecto sea de gran importancia para las enfermedades a las cuales se asocian, ya sea porque modifican la sintomatología y/o evolución de las mismas.

Toda una gama de padecimientos están asociados con las inmunodeficiencias secundarias (1). En algunos, como se mencionó anteriormente, la inmunodeficiencia puede ser transitoria y desaparecer con el tratamiento adecuado de la enfermedad primaria, como en el caso de diversas infecciones. En otros, la inmunodeficiencia puede ser de carácter permanente como en los pacientes que padecen de rubeola congénita.

Muchas de las inmunodeficiencias secundarias pueden deberse a factores relacionados a la enfermedad primaria más que a ésta principalmente, como sucede en ciertos casos de neoplasia, en que la inmunodeficiencia es secundaria al tumor, a la desnutrición o a la terapéutica.

En otros casos, las inmunodeficiencias pueden ser secundarias a enfermedades que producen y acumulan metabolitos inmunosupresores (6). Por ejemplo, pacientes con el síndrome de Cushing , secretan en exceso cortisona y cortisol. Ambas hormonas, en concentraciones elevadas, actúan como potentes agentes supresores, pues lisan células T y células B directamente y disminuyen la cantidad de monocitos periféricos. Por ello, estas personas se vuelven susceptibles a infecciones, particularmente las provocadas por antígenos controlados por la inmunidad celular.

Entre las enfermedades primarias asociadas a las inmunodeficiencias secundarias, encontramos (1,4):

INFECCIONES:

- Rubeola Congénita
- Exantemas virales (varicela, sarampión, etc.)
- HIV
- Citomegalovirus
- Mononucleosis infecciosa
- Enfermedades parasitarias

- Coccidioidomicosis

NEOPLASIAS:

- Enfermedad de Hodgkin
- Leucemia aguda
- Leucemia crónica
- Mieloma

ENFERMEDADES HEREDITARIAS Y METABOLICAS:

- Anormalidades cromosómicas (Síndrome de Down)
- Diabetes mellitus
- Enteropatía con pérdida de proteínas
- Uremia

AUTOINMUNIDADES:

- Lupus eritematoso sistémico
- Artritis reumatoide
- Hepatitis crónica activa

OTROS:

- Desnutrición
- Quemaduras
- Cirrosis alcohólica
- Envejecimiento
- Tratamiento con inmunosupresores
- Anestesia

2.1.3 SINDROME DEL DESGASTE

Las primeras observaciones que se hicieron acerca de la relación existente entre algún tipo de inmunodeficiencia y un consecuente desgaste físico, fueron hechas al final de la década de los 50.

Billingham, en 1957, fue el primero en realizar un trasplante de linfocitos peritoneales alogénicos en ratones (7). Este trasplante provocó al cabo de un mes, aproximadamente, un retardo en el crecimiento, lesiones en la piel y necrosis de tejido hepático en los animales.

Algunos años después, en 1962, Gowans y col. mostraron en sus trabajos, que, los linfocitos del injerto eran los responsables del ataque al huésped, denominando este fenómeno injerto contra huésped (GVH por sus siglas en inglés) (7).

Estudios posteriores mostraron que al extirpar el timo de ratones recién nacidos se manifestaba un desgaste similar al observado en los ratones que recibían las inoculaciones de linfocitos alogénicos (8).

Simonsen, en 1962, propuso que debía llamarse encanijamiento al deterioro de los animales recién nacidos al ser timectomizados o al provocarseles reacción GVH. Este deterioro incluye la pérdida de peso en el animal así como una deficiencia inmunológica. También propuso que el término desgaste se emplee para el caso de animales adultos en los que hay pérdida de peso, pero, no hay

retardo en el crecimiento (9).

Al observar los síntomas del encanijamiento o desgaste se propusieron diversas hipótesis para explicar el deterioro físico e inmunológico. Algunos autores opinaban que la aparición del síndrome se relacionaba al proceso de inducción (timectomía e inyección IP de linfocitos). Otras opiniones se inclinaban en favor de microorganismos oportunistas como causantes de la enfermedad (10).

Tiempo después se encontraron otras formas de inducir el desgaste en ratones, como la inoculación de bacterias muertas o sus endotoxinas (11).

Hoy en día se sabe, como se ha mencionado en trabajos anteriores (12,13), que el síndrome del desgaste puede inducirse en ratones recién nacidos a base de tratamientos diversos, entre otros (11,15): acetato de cortisol, estradiol, múltiples productos bacterianos como LPS, timectomía, e inoculaciones con suspensiones de estafilococos del grupo A.

El modelo murino experimental del desgaste se caracteriza por ser una enfermedad con tres manifestaciones principales:

- 1) Retraso en el desarrollo de los animales.
- 2) Depresión en las respuestas celular y humoral.
- 3) Susceptibilidad a infecciones provocadas por microorganismos oportunistas.

El síndrome del desgaste también provoca una gama de lesiones que dañan temporal o permanentemente, de acuerdo al tratamiento

empleado, a la vía de inoculación, a la edad y sexo del animal. Algunas de las lesiones (12,16) encontradas en ratones desgastados, son:

1.- Daños corporales:

a) Daño en la mucosa del tubo digestivo, provocado por la liberación de Factor de Necrosis Tumoral (TNF por sus siglas en inglés) de los macrófagos al ser estimulados con endotoxinas.

b) Retraso en el crecimiento.

c) Pelo ralo.

d) Adelgazamiento de la piel.

2.- Daños en Sistema Inmunitario:

a) Alteración de la interrelación de los sistemas inmunitario y neuroendocrino, considerando que la interrelación anormal entre el timo y las diferentes glándulas del sistema endocrino dan lugar a algunas manifestaciones del síndrome (14).

b) Atrofia del timo.

c) Atrofia de ganglios linfáticos.

d) Esplenomegalia con zonas de necrosis.

3.- Alteraciones sexuales:

a) Ausencia de caracteres sexuales secundarios en animales de sexo masculino.

b) Esterilidad en ambos sexos.

4.- Otros:

- a) Osteoporosis
- b) Diarreas hemorrágicas.
- c) Tumoraciones (7).

2.2 DESNUTRICION E INMUNIDAD

La respuesta inmunitaria es una compleja serie de transmisión de señales, activadas por la presencia de un antígeno en el organismo, que provocan en las células en reposo una serie transformaciones que las llevan a desarrollar una respuesta en contra de dicho antígeno (17).

Para llevar a cabo esta serie de eventos, se requiere la presencia de sustratos a partir de los cuales se origine la energía necesaria para realizar las transformaciones.

Así pues, la nutrición es un factor determinante (18) de la inmunocompetencia y por tanto del riesgo de padecer diversas enfermedades infecciosas.

Esto se ha demostrado en diversos estudios, los cuales reportan que la desnutrición provoca alteraciones, tanto a nivel de inmunidad celular, como humoral (19).

Entre las alteraciones de la inmunidad celular más importantes (19) se encuentra una disminución en el tamaño del timo, el cual histológicamente presenta pérdida córticomédular (18), lo que conlleva a consecuencias severas como: disminución en la población intratímica de linfocitos y por tanto, una disminución en la cantidad de linfocitos circulantes; también se encuentra una reducción de las áreas timo-dependientes de los órganos linfoides secundarios como bazo y ganglios linfáticos.

Este desarreglo de los órganos responsables de la maduración y funcionalidad de linfocitos T, se refleja en depresión de la respuesta de hipersensibilidad tardía, baja respuesta proliferativa a diversos mitógenos, respuesta anormal de complemento, disminución del número de células T₄, etc.

Respecto a las alteraciones en la inmunidad humoral se encuentra un fuerte problema a nivel de producción de inmunoglobulinas (19) de secreción, en particular IgA, lo cual disminuye las defensas en mucosas y por tanto facilita el desarrollo de infecciones en los sistemas respiratorio y digestivo; no así en los niveles séricos de inmunoglobulinas, los cuales incluso se pueden encontrar ligeramente elevados debido probablemente a que aumenta la susceptibilidad a infecciones.

Por otro lado, también se reportan alteraciones en la producción de interferón gamma (18), en la capacidad para fagocitar y llevar a cabo la bacteriolisis (en casos severos, pues en casos moderados, se ve incrementada) (19).

La desnutrición en el humano se deriva, generalmente, de la deficiencia de diversos nutrientes. Varios trabajos en animales de laboratorio, a los que se les privó de algún nutriente en particular, y las observaciones hechas en pacientes que por alguna causa no asimilan nutrientes (18) han confirmado la importancia de la ingestión adecuada de nutrientes tales como vitaminas y elementos traza.

VITAMINAS

Se ha reportado que la deficiencia de piridoxina, ácido fólico, vitamina A, vitamina C y vitamina E (20) afectan la respuesta celular y la humoral (18).

La deficiencia de vitamina B₆ provoca una baja respuesta linfoproliferativa a mitógenos como la PHA. También se ha encontrado que una suplementación de vitamina A incrementa la respuesta inmunitaria y proporciona protección parcial contra ciertos tumores en animales (18,20).

ELEMENTOS TRAZA.

Numerosos elementos que se encuentran en los seres vivos en muy pequeñas cantidades, conocidos como elementos traza, realizan diversas funciones en el organismo.

Se define un elemento esencial como aquel que es necesario para mantener la vida de un organismo y cuya falta ocasiona la muerte o un malfuncionamiento severo.

Se considera elemento traza esencial a aquellos que son requeridos en cantidades del orden de miligramos o menos.

Se han estudiado diversos elementos traza que se han clasificado como inmuoesenciales por su participación directa en las reacciones del sistema insunitario: cobre, hierro, selenio y zinc.

A continuación se presenta un breve resumen (20) de la actividad a nivel inmunológico de cada elemento, excepto del zinc que por tema central de este trabajo, se trata aparte con mayor profundidad.

1. Cobre.

La deficiencia de cobre se puede deber a trastornos genéticos o a una demanda mayor del elemento como sucede en el caso de la administración de D-penicilamina el cual es un agente quelante ávido de cobre. Respecto a la relación que existe entre cobre y sistema inmunitario no se ha estudiado tanto como otros elementos inmuoesenciales. Los pocos estudios realizados han dado a conocer lo siguiente:

La deficiencia de cobre altera la respuesta humoral ocasionando una depresión, debida a baja producción de anticuerpos; esto se puede explicar por la posibilidad que existe de que el cobre forme parte de las moléculas de inmunoglobulinas, como lo demuestran diversos estudios. La inmunosupresión es paralela a la aparición de los signos típicos de la deficiencia de cobre, como la disminución en el peso corporal, reducción de la actividad de la ceruloplasmina y reducción de la concentración de cobre en hígado.

En lo que concierne a la respuesta celular, se ha probado que la deficiencia de cobre altera la proporción de las diversas

subpoblaciones de linfocitos T y con ello su capacidad de responder al estímulo con mitógenos como PTH, Con A, etc.

En cuanto a su toxicidad se ha estudiado poco de las consecuencias de un exceso de cobre en mamíferos, aunque se conoce la enfermedad de Wilson en humanos, la cual se debe a una mala distribución del cobre en el organismo, debido a una baja concentración de ceruloplasmina (principal proteína que se une al cobre), redundando en acumulación excesiva en hígado y riñones y por tanto en daño hepático y tubular renal.

2. Hierro.

El hierro es necesario para una respuesta inmunitaria óptima, aunque se desconoce su mecanismo de acción a nivel molecular. La deficiencia de hierro se puede deber a una mayor demanda bajo ciertas condiciones como el embarazo y la menstruación, a una dieta deficiente en este elemento o a una mala absorción del mismo. Entre las alteraciones inmunológicas debidas a la falta de hierro, se encuentra una disminución en la cuenta de linfocitos T periféricos y con ello, una inhibición de la hipersensibilidad tardía, entre otros.

Con respecto a la inmunidad humoral, hay evidencias poco convincentes de la alteración en la producción de anticuerpos pues no se ha reportado una disminución en la intensidad de la

respuesta humoral en humanos pero, si en animales de laboratorio, en los que la restitución de hierro en la dieta dió como resultado un aumento en la producción de anticuerpos.

Se ha mencionado que la deficiencia de hierro posiblemente aumante la resistencia a infecciones bacterianas por haber una menor disponibilidad del metal para el desarrollo microbiano; hecho que se cuestiona al tener evidencia, por otros trabajos, que la deficiencia del hierro da lugar a una disfunción en la respuesta inmunitaria celular y humoral. Esto obliga a realizar investigaciones sobre el efecto de distintos grados de deficiencia, o exceso, de hierro en la resistencia a infecciones, pues también se ha encontrado relación entre los niveles de hierro y el aumento de la susceptibilidad a infecciones, lo que podría atribuirse a mayor disponibilidad del metal para los microorganismos y/o alteraciones del sistema inmunitario.

Respecto a la toxicidad del hierro encontramos un padecimiento denominado hemocromatosis, que es un síndrome de sobrecarga de hierro, debido a una absorción excesiva. Recibe este nombre por la pigmentación bronceada de la piel producida por la acumulación de hierro en sangre y otros tejidos.

3. Selenio.

El selenio presenta características inmunoesenciales, como se ha mostrado en diversos estudios. Participa en prácticamente todas

las funciones del sistema inmunitario: producción de anticuerpos, actividad de células fagocíticas, proliferación de linfocitos, producción de linfocinas, etc. Su adición a la dieta influye tanto en la inmunidad humoral (aumenta la producción de anticuerpos) como la celular (se han encontrado aumentos en pruebas de hipersensibilidad tardía).

Por otro lado, la deficiencia de selenio provoca depresión de la respuesta de anticuerpos y una reducción en el número y funcionalidad de linfocitos T. Se ha encontrado una disminución en la capacidad de responder a mitógenos como PHA, ConA, PWM, así como la capacidad de incorporar timidina tritiada. La deficiencia de selenio reduce la citotoxicidad mediada por células T sobre células de linfoma.

Otras funciones alteradas por la deficiencia de selenio son: los mecanismos inespecíficos de defensa (lisozima y complemento cuando es activado por vía alterna) y la actividad de células NK, que son capaces de matar células tumorales. Esto podría ser indicativo de que la deficiencia de selenio aumenta la incidencia de tumores, aunque no se ha comprobado.

La toxicidad del selenio también ha sido estudiada y se sabe que es común en animales por la ingestión de plantas que lo acumulan y en humanos, es principalmente por forma ocupacional.

2.3 ZINC

2.3.1 GENERALIDADES

El zinc es un elemento traza esencial en la nutrición de microorganismos, plantas y animales (21). Participa en el metabolismo de ácidos nucleicos, así como en la síntesis de proteínas (21), además forma complejos con la insulina e interviene en su almacenamiento, liberación y acción (15).

Numerosas enzimas son dependientes de zinc, llamadas metaloenzimas, o forman complejos enzima-zinc (22). Las metaloenzimas son enzimas catabólicamente activas que contienen cantidades estequiométricas del elemento traza. La función del zinc en las enzimas es, principalmente, mantener íntegra la estructura y/o participar directamente en la reacción enzimática. Con frecuencia, ambas funciones se combinan, aunque hay casos específicos de una u otra. Tal es el caso de las enzimas con múltiples subunidades, en las que el zinc participa solamente manteniendo la estructura.

Algunas metaloenzimas pueden funcionar al eliminar el zinc y sustituirlo con otro catión divalente. Un ejemplo es la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*, la cual funciona normalmente al sustituir el zinc por cobalto. Existen otras enzimas que pueden funcionar perfectamente aún en ausencia de zinc, como es la DNA

polimerasa I de *Escherichia coli*.

Los complejos enzima-zinc son enzimas que se sabe se activan o inhiben en presencia del zinc, pero, para las cuales no se ha determinado la cantidad específica del elemento traza que requieren.

Las metaloproteínas son proteínas que no necesariamente son enzimas pero tienen sitios de alta afinidad por el zinc combinándose con este.

La primera metaloenzima descubierta fue la anhidrasa carbónica, ahora se conocen mas como son, entre otras, aldolasa, fosfatasa alcalina, carboxipeptidasa, DNA polimerasa, deshidrogenasa málica, proteasa y superóxido dismutasa.

2.3.2 CONSECUENCIAS DE LA DEFICIENCIA DE ZINC

El zinc puede variar su concentración en el organismo alterando con ello diversas funciones metabólicas. Varios estudios muestran que el balance de zinc se modifica por condiciones que requieran mayor demanda de este elemento como el crecimiento, lactancia, y embarazo (23).

La deficiencia de zinc en el organismo tambien se atribuye a:

- Vejez, en cuyo caso aumenta la susceptibilidad a infecciones (24).
- Desnutrición, por consumo de dietas hipoprotéicas e

hipocalóricas (18,19,25).

- Mala absorción hereditaria, como es el caso de la acrodermatitis enteropática (24,26,27,28). Esta enfermedad se caracteriza por: crecimiento retardado, alopecia, lesiones en la piel, diarrea.

- La presencia de otros minerales que inhiben la absorción del zinc, por tres mecanismos propuestos (29,30):

a) competencia por los acarreadores.

b) bloqueo intestinal.

c) aumento de la secreción endógena de zinc o disminución de su absorción a nivel intestinal, ambas situaciones provocadas por la interacción con aluminio.

.. "Stress" provocado por infecciones agudas o shock post-operativo.

- Quemaduras

- Alcoholismo

- Trastornos renales

- Desordenes gastrointestinales (26)

- Alimentación parenteral (24,27,31)

La deficiencia de zinc origina diversos trastornos entre los que podemos mencionar (32):

-Enanismo

-Hepatoesplenomegalia

-Anorexia

-Hiperkeratosis

-Parakeratosis

-Trastornos hormonales, que se reflejan en: hipogonadismo, disminución de las reservas de la hormona adrenocorticotrópica pituitaria y, tolerancia anormal a la glucosa oral.

-Alteraciones de las funciones fisiológicas (formación, actividad y regulación) de las enzimas dependientes de zinc, como la alcohol deshidrogenasa y aldolasa en hígado, alcohol deshidrogenasa en riñón y carboxipeptidasa en páncreas.

-La deficiencia de zinc en el organismo tiene un efecto análogo a la intoxicación con ácido acetilsalicílico en ratonas embarazadas, al provocar, ambos, parto prolongado, sangrado excesivo y un marcado aumento de la mortalidad (33).

-La deficiencia de zinc también se ha asociado a la inmunosupresión en ratones haciéndolos susceptibles a parasitosis.

2.3.3. ZINC Y SISTEMA INMUNITARIO

La importancia de diversos nutrientes en el desarrollo y del sistema inmunitario es ahora ampliamente aceptado (26). El zinc, en particular, ha tomado gran interés en el ámbito clínico a raíz de múltiples trabajos que demuestran su participación directa en el desarrollo y funcionalidad del sistema inmunitario, así como, las alteraciones producidas en éste, a consecuencia de una deficiencia del elemento traza.

Efecto de la deficiencia de zinc sobre los componentes del sistema inmunitario.

La inmunidad celular participa en la destrucción de células infectadas con virus, bacterias y protozoarios, así como, de células tumorales (25).

Un mecanismo de destrucción involucra a las células citotóxicas que se unen a las células infectadas, destruyéndolas por la liberación de proteínas citotóxicas conocidas como perforinas (destruyen la membrana de la célula blanco provocando un desequilibrio iónico con la subsecuente ruptura osmótica) (25).

Otro mecanismo de destrucción es aportado por la liberación de interferón γ y linfotoxinas por células T activadas. Estos productos estimulan la actividad fagocítica de los macrófagos, los cuales, como los neutrófilos, participan en la destrucción de patógenos via degradación enzimática.

Las células NK participan en la destrucción de células tumorales, en la regulación de otras interacciones celulares por liberación de factores solubles (17).

La deficiencia de zinc altera todos los mecanismos arriba mencionados, pues afecta principalmente al timo, atrofiándolo (25,34). Esto provoca una disfunción en todo lo relacionado con la inmunidad celular, pues el timo es el órgano encargado de la maduración de células T (35).

Hay trabajos en los que se reporta el examen histológico realizado en células de timo atrofiado, encontrando que la glándula se deteriora gravemente y por tanto, sólo se compone de tejido conectivo, células epiteliales y unos cuantos timocitos funcionales (34). Por supuesto, también se reporta una disminución en el tamaño y peso de el timo (25,27,34).

La atrofia provoca, además de una disminución de las células T, una reducción en el número de esplenocitos y depresión en la respuesta a antígenos dependientes e independientes de células T.

Otras alteraciones en la inmunidad celular, debidas a la deficiencia de zinc:

- Linfocitopenia.
- Disminución en la cuenta de células T cooperadoras.
- Baja respuesta proliferativa a diversos mitógenos (36).
- Disminución en la actividad de células NK (17,25,27).
- Quimiotáxis defectuosa, lo que indica una disfunción en los neutrófilos (24,25).

La inmunidad humoral implica un complejo sistema de interacciones entre diversas células del organismo, incluyendo la producción de diversos factores solubles que participan en la respuesta inmunitaria humoral, como la IL-1 (25). Los macrófagos producen IL-1, la cual estimula a células T cooperadoras y,

además, estimula la maduración de células pre-B y la proliferación de células B maduras. Por otro lado, la IL-1 estimula la distribución de zinc plasmático a hígado, médula ósea y timo, sugiriendo, un mayor requerimiento del elemento traza durante la proliferación tanto de células T, como de células B. También se sabe que la producción y/o acción de citocinas necesarias para dicha proliferación (como la IL-2), es dependiente de zinc (25).

Hay trabajos que muestran alteraciones en células B, asociadas a una disminución en el número de células T cooperadoras funcionales, debido a la deficiencia de zinc (34). Dichas alteraciones se encuentran, principalmente, en la producción de IgG, la cual depende de las interacciones entre células B y células T cooperadoras. La deficiencia de zinc provoca una acumulación de células B inmaduras en el bazo, y con ello, una depresión en las respuestas primaria y secundaria de anticuerpos (por una disminución en el número de células de memoria) (25,27).

Respecto a la autoinmunidad, se ha encontrado, a través de los años, que, restringiendo ciertos componentes en la dieta, como: aminoácidos, calorías, proteínas y diversos elementos (como zinc), se pueden atenuar diversas enfermedades autoinmunes (25). Esto se maneja en cepas como la NZB (New Zealand Black), la cual presenta una tendencia a desarrollar una forma de lupus (27) y en la que, al restringir los niveles de zinc en la dieta, se

encuentra una significativa reducción de la anemia hemolítica autoinmune, asociada al lupus en el animal, así como un incremento en su período de vida.

Un mecanismo propuesto para este fenómeno, es que, siendo el zinc un elemento inmunoesencial, al haber una deficiencia de éste, se modifican las interacciones celulares que llevan a la producción de autoanticuerpos (por alteraciones en la activación policlonal de células B y/o en el desarrollo de la célula madre B) (25,34).

Otro mecanismo propuesto, se refiere a que una dieta deficiente de zinc induce anorexia, con la resultante restricción protéico-calórica. Esto se aúna al punto anterior, de manera que la falta de nutrientes en el organismo afecta las interacciones celulares que generan una respuesta inmunitaria (25).

Efecto de la deficiencia de zinc en el desarrollo del sistema inmunitario.

Se han propuesto diversas causas por las que la deficiencia de zinc afecta el desarrollo y/o la funcionalidad del sistema inmunitario, principalmente:

a) Elevación de la producción de corticoesteroides. Los resultados de Pasquale-Jardieu y Fraker (25,27) mostraron que la

deficiencia de zinc constituye un stress que activa el eje hipotálamo-pituitaria-hormona de crecimiento, con el consecuente incremento en la producción de corticoesteroides. Los corticoesteroides actúan como inmunosupresores en diversas formas (4):

- Inhiben la síntesis de proteínas o ácidos nucleicos, lo que ocasiona linfocitopenia.
- Interfieren en la liberación de precursores en la médula ósea, provocando, también linfocitopenia y monocitopenia. Suprimen la acumulación de leucocitos en sitios de inflamación.
- Disminuyen la cuenta de células T cooperadora.
- etc.

Esta razón no está plenamente aceptada aún, pues los autores reportan que al realizar adrenalectomías en animales deficientes en zinc, se previno la atrofia del timo, pero, no se recuperó por completo la funcionalidad de las células T.

b) Deficiencia de la enzima nucleosido fosforilasa. Esta enzima (NPasa), dependiente de zinc, participa en la vía catabólica de las purinas.

Al haber una deficiencia del elemento traza, no se produce NPasa, por que se acumulan nucleótidos tóxicos, como dGTP y GPT, en el linfocito. Estos nucleótidos afectan la síntesis de precursores de DNA, afectando la proliferación celular (28).

c) Se sabe que el zinc participa como cofactor en varias hormonas tímicas, como la timulina (17,25,27,31). Esta hormona, llamada anteriormente Facteur Thyrique Serique (FTS), requiere de zinc para expresar su actividad biológica (31). Esta interacción se ha comprobado directamente mediante análisis de cromatografía y resonancia magnética nuclear, demostrando que la conformación del péptido en ausencia de zinc corresponde a la forma biológicamente inactiva y viceversa. En diversos estudios realizados con el fin de evaluar la capacidad de diversos metales para activar la timulina, se reporta que, sólo el zinc es capaz de restaurar totalmente la actividad del péptido no funcional (27). Por tanto, la deficiencia del elemento traza altera la producción y la actividad de hormonas que participan directamente en el desarrollo y maduración de células T.

La deficiencia de zinc en el humano.

Se mencionó en el punto 2.3.2, algunas de las causas por las que puede haber una deficiencia de zinc. En este punto añadiremos ciertas condiciones patológicas que también alteran los niveles de zinc, así como, su relación directa con el sistema inmunitario.

a) Talasemia mayor (17). Los pacientes con β -talasemia requieren frecuentes transfusiones sanguíneas para la prevención de anemias. Estas transfusiones incrementan los niveles de hierro en el organismo. Además, en este padecimiento hay tendencia a

incrementar la absorción gástrica de hierro. Como el hierro normalmente no se excreta, se acumula en hígado, corazón y bazo, provocando alta morbilidad y mortalidad (20). Para prevenir esta situación, se emplean técnicas de quelación del hierro, para que sea eliminado del organismo. Esto afecta la concentración de zinc, por dos razones: el hierro, en exceso, inhibe la absorción de zinc y porque la deferoxamina forma complejos quelantes con el zinc. Así, tanto la enfermedad como el tratamiento, afectan los niveles corporales del zinc, redundando en una inmunidad celular anormal (afectando principalmente la actividad de las células NK) (17).

b) Cáncer. Se ha encontrado, en pacientes con cáncer pulmonar, que bajos niveles séricos y una elevada excreción de zinc por la orina, se asocian significativamente con una respuesta deprimida a fitohemaglutinina en cultivos de células T (24,25).

c) Síndrome de Down. Este síndrome se asocia frecuentemente con infecciones respiratorias y gastrointestinales crónicas, leucemia y alta incidencia de enfermedades autoinmunes (25,39). Recientemente se ha propuesto que las alteraciones inmunológicas se relacionan a bajas concentraciones de zinc, que se han encontrado en múltiples estudios hechos en niños que padecen el síndrome, aunado a una baja concentración de timulina.

Efectos de la suplementación con zinc.

Se ha demostrado en múltiples trabajos que la suplementación con zinc influye en la recuperación de la inmunidad en diversos padecimientos (17,24,25,26,32,33,34,39). Entre muchos efectos benéficos de la suplementación con zinc, resaltan:

a) Los pacientes con acrodermatitis enteropática presentan diversos desórdenes inmunológicos como: la atrofia del timo y, como consecuencia de ello, inmunidad celular anormal. Se ha encontrado que la suplementación de la dieta con zinc corrige dichas alteraciones inmunológicas (25,26,27,28).

b) Se ha observado que los niños desnutridos, que reciben únicamente suplementos de zinc, una franca recuperación de la inmunidad mediada por células (19,27).

c) En diversos pacientes con anemia sickle-cell, se encontró estados de anergia. Después de la suplementación con zinc, mostraron un incremento significativo en las reacciones DTH.

d) Vejez. Muchos estudios revelan que la suplementación con zinc en la dieta de personas de edad avanzada, aumenta su capacidad inmunológica para responder ante diversos agentes infecciosos. Se atribuye al hecho de que esta aumentada la concentración de linfocitos T circulantes y por tanto hay un incremento en la intensidad de las reacciones DTH hechas con PPD

(24,36).

e) La NFasa, cuya función es evitar la acumulación de nucleótidos tóxicos en células T, se ve afectada por la deficiencia de zinc. La suplementación con el elemento traza ayuda a normalizar la actividad de la enzima (28).

Existen casos en que la suplementación con zinc no ayuda a la recuperación de la inmunidad de personas con algún tipo de enfermedad. Tal es el caso de un estudio realizado en niños con síndrome de Down, a los que se les suplementó con zinc: se observó un incremento en los niveles séricos del microelemento, pero sin una mejoría evidente en la sintomatología del síndrome, indicando que la suplementación no previene las infecciones a las que están expuestos estos niños (39). Quizás más adelante, nuevos estudios muestren que una dosis por un periodo de tratamiento, diferentes a las utilizadas en este trabajo, si tengan algún efecto benéfico en personas con síndrome de Down.

Otro aspecto a considerar, son los casos en que una dieta deficiente en zinc es benéfica para la inmunidad: Se encontró que en ratones Balb/c, una dieta baja en contenido de zinc, resulta en una menor incidencia al Sarcoma de Maloney y a una disminución en el tamaño de los tumores (27).

Papel inmunológico del zinc in vitro.

Se ha encontrado que la adición de concentraciones definidas de sales de zinc a cultivos celulares pueden causar activación policlonal de los linfocitos (27). En el caso de cultivo de células esplénicas y de células de sangre periférica de humanos, se encontró que la blastogénesis inducida por zinc es tan potente, como la inducida por mitógenos como PWM y toxina diftérica en la producción de CFA.

También se ha encontrado que el zinc tiene efectos de adyuvante, aumentando la respuesta proliferativa ante diversos mitógenos como PHA, ConA y LPS.

Respecto a células de ratones envejecidos, se encontró que al cultivarlas con un suplemento de zinc, aumentan la capacidad de generar CFP contra GRC.

Así, el zinc es el único nutriente, que se conoce hasta ahora, con propiedades tanto de activador policlonal como de adyuvante, con efectos sobre la función inmunitaria (27).

Toxicidad del zinc.

Como todos los excesos, el de zinc no es la excepción para inducir daño en el organismo (38). Aunque se considera relativamente no tóxico, particularmente si se toma por vía oral, se conocen casos de intoxicación con zinc atribuidos al consumo de alimentos conservados en latas galvanizadas, las que liberan el

elemento traza por la acidez del elemento, aunado a un largo periodo de almacenamiento. Esto puede ocasionar nausea, vómito, dolor estomacal, letargia y fatiga.

Las ingestas consideradas excesivas por la FDA (Food and Drugs Administration) son del orden de 100-300 mg Zn/día que se emplean usualmente como dosis terapéuticas. Estas altas dosis provocan alteraciones como la deficiencia de cobre, caracterizada por: hipocupremia, anemia, leucopenia y neutropenia.

La deficiencia de cobre se puede corregir al cesar la suplementación con zinc, aunque la recuperación puede requerir de un tiempo prolongado, pues hay datos que indican que la excreción de zinc es lenta. Inclusive, hay casos en que se recurre a la administración IV de solución de cloruro de cobre para acelerar la recuperación.

Otro aspecto de la toxicidad del zinc se refiere a la alteración del perfil lipídico sanguíneo. Se ha asociado la ingesta excesiva de zinc con un aumento en las concentraciones de colesterol sérico, así como un aumento en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y una disminución en las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los triglicéridos y el colesterol total no se modifican.

Respecto a la respuesta inmunitaria se ha encontrado, en personas voluntarias que ingieren un exceso de zinc, una depresión en diversos índices inmunológicos como la estimulación linfocitaria, quimiotaxis, etc. También se ha encontrado que una cantidad de zinc por encima de los niveles normales, inhibe la cascada del complemento (27).

2.4 HIPERSENSIBILIDAD TARDIA.

La hipersensibilidad tardía es un fenómeno inmunológico dependiente de células T, que se manifiesta por una reacción inflamatoria en el sitio de deposición del antígeno (40). Dicha reacción de inflamación llega a su pico máximo de intensidad a las 24-48 horas de iniciada; esta característica sirve para diferenciar este tipo de hipersensibilidad, de la de tipo inmediato o de la reacción de Arthus, que depende de anticuerpos, y cuyos picos máximos de intensidad se alcanzan en cuestión de minutos u horas.

Existen diversos tipos de hipersensibilidad, los cuales podemos resumir en el siguiente cuadro (1,41):

TIPO	CLASICA	EN D JONES-NOTE	CONTACTO
tiempo de reaccion	16-48 hrs.	16-48 hrs	16-48 hrs
aparencia clinica	lesion por induccion, infiltrado	lesion eritematosa	lesion por induccion, infiltrado
aparencia histologica	monocitos macrofaeos linfocitos	basofilos linfocitos	linfocitos macrofaeos
antigeno	proteinas solubles	dosis bajas de proteinas solubles en solucion saline	epidermicas como hule, metales

* HCB = hipersensibilidad cutánea basofílica

Hipersensibilidad Clásica

El primer criterio básico para clasificar la hipersensibilidad tardía es que transcurran 12-48 hr para que la reacción local alcance su máxima intensidad (3). El examen histológico de la reacción inflamatoria muestra el infiltrado con predominio de células mononucleares, principalmente macrófagos, en la zona afectada. La inyección de un antígeno proteico en solución induce la formación de anticuerpos, pero no suele provocar una hipersensibilidad tardía duradera, a no ser que el antígeno se introduzca en forma de emulsión dentro del adyuvante completo de Freund (ACF).

Reacción de Jones-Mote o HCB

Puede obtenerse una hipersensibilidad tardía, inyectando antígenos proteicos en ausencia del adyuvante completo, si se recurre a inyecciones repetidas en bajas dosis, (μg), de la proteína purificada, o a inyecciones de proteínas desnaturalizadas por calor o modificadas químicamente mediante la fijación de grupos hapténicos.

Estas inyecciones deben aplicarse por vía intradérmica para evitar la formación de anticuerpos. La hipersensibilidad tardía

inducida de esta manera recibe el nombre de hipersensibilidad cutánea por basófilos o reacción de Jones-Mote, y se caracteriza por: transmitirse por linfocitos, no por suero; presencia de basófilos en la zona afectada; desaparece 1-4 semanas después de inducida (transitoria).

Hipersensibilidad Cutanea

Algunas sustancias de bajo peso molecular son susceptibles a formar enlaces covalentes con los grupos sulfhidrilos o aminados de las proteínas presentes en el recubrimiento cutáneo, sensibilizando así, a la persona. Esto da lugar, en un segundo contacto con el alérgeno, a una reacción de hipersensibilidad tardía que se conoce como dermatitis alérgica por contacto. Entre los alérgenos más comunes encontramos metales como níquel y cromo así como algunos tipos de elásticos empleados en la fabricación de ropa interior.

Mecanismo de la Hipersensibilidad Tardía (40)

Los linfocitos mediadores de la reacción de hipersensibilidad tardía probablemente encuentran al antígeno en el sitio de su deposición o, cerca de éste. El reconocimiento específico del antígeno resulta en la activación de las células y la subsecuente producción de un gran número de factores específicos, factores

inespecíficos y linfocinas. Algunas linfocinas son capaces de atraer otras células a las cercanías de la zona de deposición del antígeno, y activarlas. Estas células adicionales incluyen descendientes de la línea monocito-macrófago, así como neutrófilos. No hay un cambio en la permeabilidad vascular, por lo que la reacción se manifiesta con induración mas que en forma eritematosa.

Se considera que los monocitos y macrófagos no poseen la capacidad de tener especificidad inmunológica, sin embargo, son fundamentales para la respuesta inmunitaria: una vez acumulados en el sitio de la inflamación son activados mediante interacciones con el antígeno, con linfocitos activos y con linfocinas, por lo que tienden a causar daño tisular ya sea directamente o por liberación de monocinas. En muchas lesiones causadas por reacciones de hipersensibilidad tardía, se pueden observar infiltrados de células mononucleares alrededor de pequeños vasos. Puede ser que la reacción se extienda lo suficiente para que las monocinas provoquen daño, inclusive a los vasos circundantes, provocando con ello derrames en la zona afectada.

3. OBJETIVOS E HIPOTESIS

OBJETIVOS

Mostrar que los ratones CD₁ recién nacidos, tratados con estafilococos inactivados tienen deprimida la respuesta de hipersensibilidad tardía a la ovoalbúmina, como consecuencia de el síndrome del desgaste.

Probar que existe una correlación entre la concentración de zinc en timo y la respuesta de hipersensibilidad tardía, así como, que durante los efectos desgastantes hay una alteración de la concentración intratímica de zinc.

Mostrar que la administración de zinc previene la depresión de las reacciones de hipersensibilidad tardía a la ovoalbúmina en el ratón desgastado.

Conocer los efectos de la administración de zinc sobre la hipersensibilidad tardía en ratones normales.

HIPOTESIS

La administración IP de zinc, incrementa la intensidad de las reacciones de hipersensibilidad tardía a la ovoalbúmina en ratones con una inmunodeficiencia secundaria transitoria.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

GRUPO	TRATAMIENTO I.P.
I	ESTAFILOCOCOS
II	ESTAFILOCOCOS CON ACETATO DE ZINC
III	ACETATO DE ZINC
IV	SOLUCION SALINA ISOTONICA
V	SIN TRATAMIENTO

MEDICION DE LA DTH
EMPLEANDO OVA COMO ANTIGENO

DETERMINACION DE LA
CONCENTRACION INTRATIMICA
DE ZINC

5. MATERIAL

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

5.1.1 Ratones. Se emplearon ratones de la cepa CD1, mantenidos desde su nacimiento, y durante el período experimental, en el Bioterio de la Facultad de Química.

5.1.2 *Staphylococcus aureus*. Consultar apéndice para la preparación de la suspensión.

5.1.3 *Staphylococcus aureus* combinado con acetato de zinc. Consultar apéndice para la preparación de la suspensión.

5.2 REACTIVOS.

5.2.1 Solución de acetato de zinc. $Zn(C_2H_3O_2)_2 \cdot H_2O$, Mallinckrodt. Disuelta en SSI a una concentración de 2.5 mg/dl.

5.2.2 Ovoalbúmina. SIGMA, preparada en SSI a una concentración de 6.6 mg/ml.

5.2.3 HNO_3 .

5.2.4 H₂SO₄.

5.2.5 Solución Salina Isotónica. Preparada al 0.85%.

6.1 INDUCCION DEL DESGASTE. Se administra por vía IP, a ratones recién nacidos, entre las dos horas posteriores al nacimiento, 0.1 ml de la suspensión de estafilococos inactivados. El tratamiento se repite cada tercer día durante cuatro semanas.

6.2 ADMINISTRACION DE ZINC A ANIMALES DESGASTADOS. Se aplica el mismo esquema de tratamiento para inducir el síndrome, pero, en este caso, se inocula la mezcla de *S. aureus* inactivado y solución de acetato de zinc.

6.3 INDUCCION Y MEDICION DE LA HIPERSENSIBILIDAD TARDIA. Se utilizó la técnica descrita por Titus (1) y Strobel et al (2), detallada en el apéndice, en la cual se emplea un tornillo micrométrico para medir la zona de inflamación en el cojinete plantar provocada por la reacción de hipersensibilidad.

6.4 ABSORCION ATOMICA. Se emplea este análisis espectrofotométrico para determinar las concentraciones de zinc presentes en tejido linfóide, tejido no linfóide y suero de los ratones empleados en

este trabajo experimental. El fundamento de la técnica se detalla en el apéndice.

6.5 ESTADISTICA. Se realizó una selección aleatoria de las mediciones de hipersensibilidad tardía para fijar el número de éstas a $n = 10$. En el caso de las determinaciones de concentración de zinc en timo e hígado, la n varía en cada grupo porque la técnica requiere un cierto peso de tejido para llevar a cabo el análisis. Por último, se determinó la media y desviación estándar tanto de las mediciones de hipersensibilidad tardía como de las concentraciones de zinc en timo e hígado.

7.1 DESGASTE

Los animales inoculados con *Staphylococcus aureus* por vía IP, durante cuatro semanas, sufrieron un evidente deterioro presentando las características típicas del síndrome del desgaste, como son: crecimiento retardado, debilidad general, anorexia, irritabilidad (principalmente a la tercera semana de tratamiento) y evacuaciones diarreicas, lo que lleva a que algunos animales no sobrevivan.

Al cabo de cuatro semanas se suspendió el tratamiento con lo que vino un periodo de recuperación progresiva, entre 1 y 10 días después de terminadas las inoculaciones, en el cual los animales ganaron peso, aumentaron de tamaño, desapareció la debilidad y la irritabilidad disminuyó considerablemente.

7.2 HIPERSENSIBILIDAD TARDIA EN EL ANIMAL DESGASTADO.

En cada grupo trabajado se hizo una selección aleatoria de las determinaciones realizadas, para ajustar la $n = 10$ en cada uno.

Al término del tratamiento se evaluó la inmunidad celular de todos los animales. Se encontró que, en las dos semanas

posteriores al tratamiento, los animales desgastados presentaron una depresión prolongada, es decir, una disminución en la intensidad de las reacciones de hipersensibilidad, en comparación a los resultados obtenidos en los animales normales.

Gráfica No. 1.

7.3 CONCENTRACION INTRATIMICA DE ZINC EN EL ANIMAL DESGASTADO.

La gráfica No. 2 representa la concentración intratímica de zinc en animales desgastados y animales normales, mostrando que el animal con el síndrome del desgaste tiene la concentración de zinc elevada en tino respecto al grupo de animales normales, habiéndolo en ambos casos una disminución prolongada a lo largo del período post-tratamiento.

7.4 RELACION ENTRE CONCENTRACION INTRATIMICA DE ZINC E INTENSIDAD DE LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD TARDIA.

Se determinó la relación existente entre la concentración intratímica de zinc y la intensidad de las reacciones de hipersensibilidad mediante el cálculo de una correlación estadística entre las concentraciones de zinc en tino, encontradas a lo largo del período post-tratamiento y la intensidad de las reacciones de hipersensibilidad obtenido en el mismo período, en

animales desgastados y en normales. Encontramos que, en los animales normales existe una correlación negativa (-0.991) mientras que en el grupo de animales desgastados la correlación es positiva (0.953)

Gráficas No. 3 y No. 4.

7.5 HIPERSENSIBILIDAD TARDIA DESPUES DE LA SUPLEMENTACION CON ZINC.

Al término del tratamiento se evaluó la intensidad de las reacciones de hipersensibilidad en los animales desgastados suplementados con zinc, encontrándose que aumentó respecto a la de los animales desgastados sin suplemento del elemento traza.

Gráfica No. 5.

7.6 CONCENTRACION INTRATIMICA DE ZINC EN EL ANIMAL DESGASTADO SUPLEMENTADO CON ZINC.

También se determinó la concentración del elemento traza en el timo de animales desgastados suplementados con zinc. Se encontró que la concentración intratimica se altera, disminuyendo respecto a la encontrada en los ratones desgastados. Esta concentración se mantiene constante a lo largo del periodo post-tratamiento.

Gráfica No. 6.

7.7 HIPERSENSIBILIDAD TARDIA EN EL ANIMAL NORMAL SUPLEMENTADO CON ZINC.

Otro aspecto de la suplementación de zinc es conocer su efecto sobre la hipersensibilidad tardía de animales normales. Se encontró que la intensidad de estas reacciones aumenta, respecto a la de los animales normales sin suplemento, a lo largo de las dos semanas posteriores al tratamiento.

Gráfica No. 7.

7.8 EVALUACION DE ZINC EN TEJIDO NO LINFOIDE.

Con el objeto de tener parámetros de la concentración de zinc en tejido no linfóide, se determinó la concentración de zinc en hígado, el cual es un reservorio del elemento traza en el organismo, y en suero de los ratones.

Se encontró que, en el animal desgastado, la concentración de zinc en hígado es mayor a la encontrada en el ratón normal, con tendencia a aumentar al paso de los días post-tratamiento. En el animal desgastado, suplementado con zinc, la concentración de zinc en el hígado disminuye aunque mantiene la tendencia a aumentar al paso del período de post-tratamiento.

Gráficas No. 8 y 9.

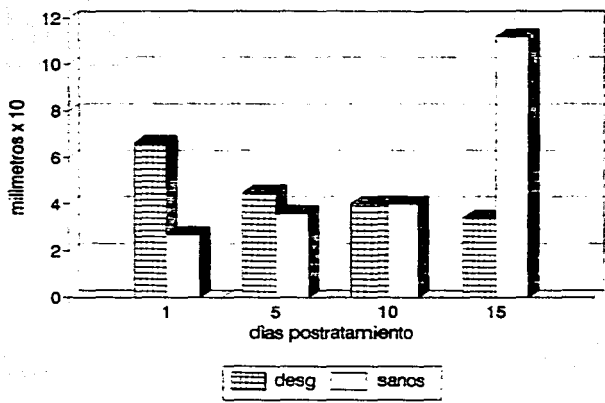
Por otro lado, las determinaciones de zinc en suero no mostraron algún dato significativo acerca de posibles cambios en

niveles séricos de zinc a lo largo del experimento, en los diferentes grupos trabajados.

NOTA: Los resultados expresados en las gráficas se encuentran en el capítulo 11 (Tablas), así como su media y desviación estándar.

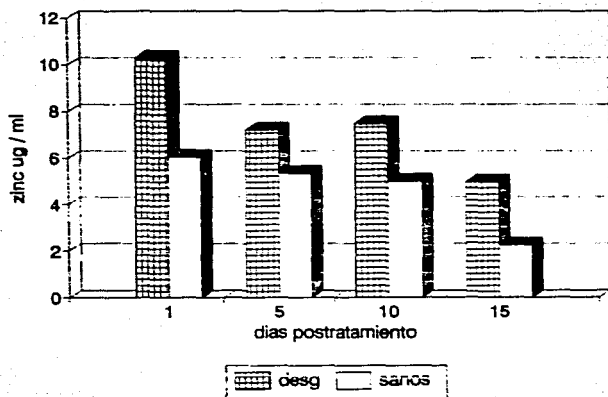
GRAFICA No.1

reacciones DTH



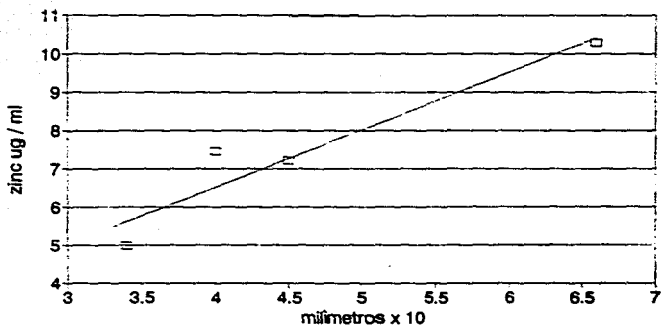
GRAFICA No.2

zinc en tino



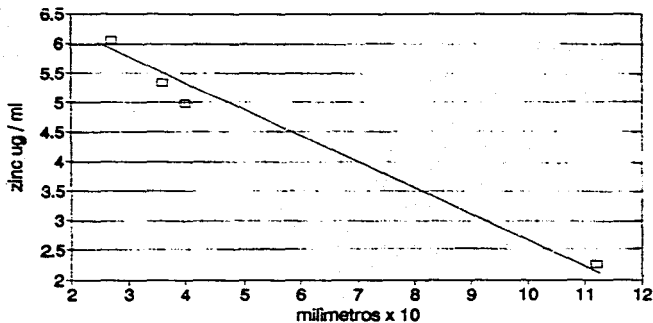
GRAFICA No.3

correlación Zinc vs DTH
ratones desgastados



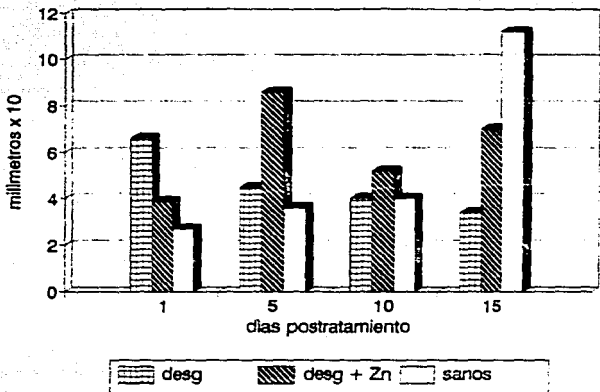
GRAFICA No.4

Correlación Zinc vs DTH ratones sanos



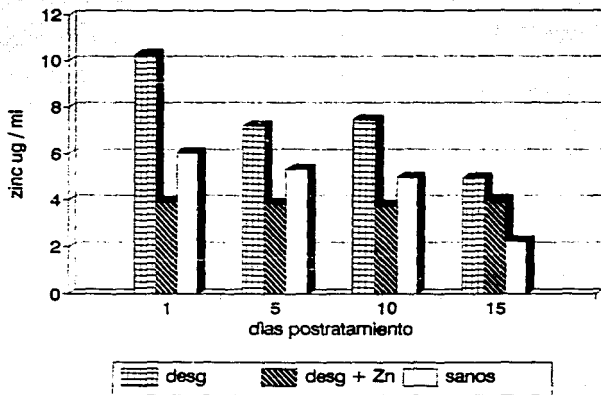
GRAFICA No.5

reacciones DTH



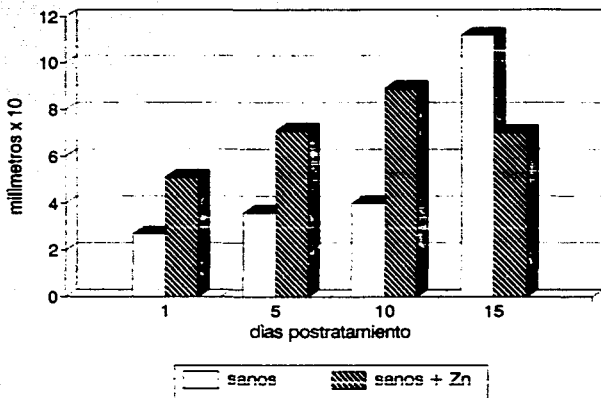
GRAFICA No.6

Zinc en timo



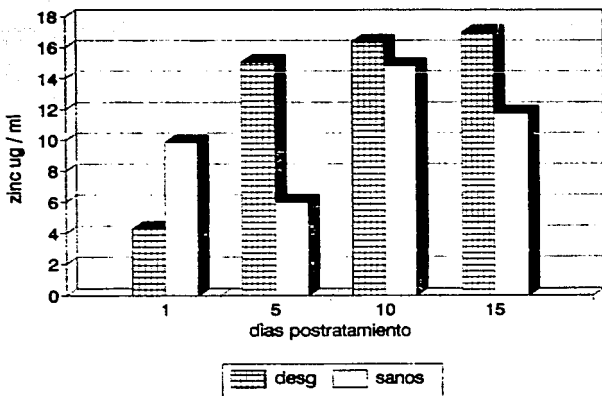
GRAFICA No.7

reacciones DTH



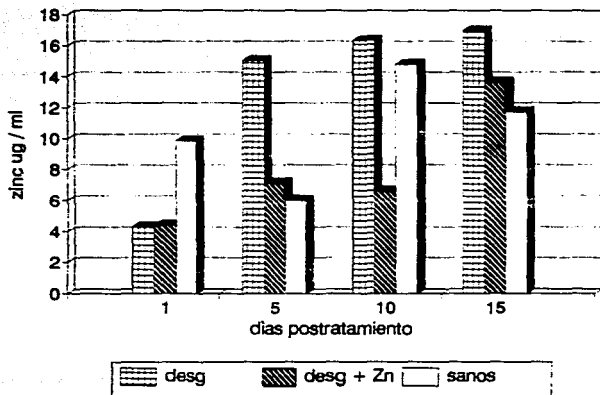
GRAFICA No.8

Zinc en hígado



GRAFICA No.9

zinc en hígado



8. DISCUSION DE RESULTADOS.

Los resultados observados indican que las inyecciones IP de estafilococos inactivados provocan en los ratones, alteraciones físicas e inmunológicas evidentes, como es la pérdida de peso, irritabilidad e, inmunológicamente, una depresión en la respuesta celular evaluada mediante reacciones de hipersensibilidad tardía durante las dos semanas posteriores al tratamiento, excepto el primer día después de terminadas las inoculaciones, en el que observamos que la intensidad de la respuesta de hipersensibilidad en los ratones desgastados es mayor a la de los ratones sanos debida, probablemente, a una sobre-estimulación de su sistema inmunitario ejercida por la continua aplicación de productos bacterianos en su organismo.

La pérdida de peso se atribuye principalmente a la franca disminución en el consumo de alimento, administrado ad libitum, ocasionada por la anorexia que provoca el síndrome del desgaste (11).

La disminución en la ingesta del alimento lleva a una desnutrición en el ratón, condición que se agrava a lo largo del período de tratamiento. Algunos animales se debilitan tanto que, inclusive fallecen.

Así, el estado general de deterioro en los animales se debe a los siguientes factores, principalmente:

1) La desnutrición, de la cual se conoce su relación directa con el sistema inmunitario en el humano (18,42) y que se ha demostrado provoca una inmunodeficiencia.

2) La liberación de caquectina o Factor de Necrosis Tumoral (TNF) por los macrófagos peritoneales estimulados con endotoxinas. Se sabe que el TNF puede actuar como inductor o estimulante de la inmunidad celular (10), así como depresor de las funciones de linfocitos B. La liberación prolongada de TNF de los macrófagos también se considera responsable de las anormalidades inmunológicas encontradas en los ratones con el síndrome del desgaste (10,15,43).

3) Los puntos anteriores tienen como consecuencia la depresión de la inmunocompetencia del animal y como resultado, la diseminación de bacterias comensales del intestino así como infecciones por parte de diversos microorganismos oportunistas, que agravan el

deterioro del animal (43,44).

Respecto a la depresión de la hipersensibilidad tardía, la podemos asociar a hechos demostrados como:

1.- Los estafilococos administrados IP, saturan a los macrófagos peritoneales deprimiendo sus funciones como células presentadoras de antígeno. Se ha demostrado que esto mismo sucede cuando los macrófagos fagocitan carbón o partículas de látex o silicón (45).

2.- La desnutrición provoca una inmunodeficiencia ampliamente conocida (18,19). Por tanto, si el animal no se alimenta adecuadamente, no recibe los nutrientes necesarios para llevar a cabo una buena respuesta inmunitaria (17).

Si nos referimos a la desnutrición, per se, como causa de la inmunodeficiencia, podemos hablar de la deficiencia en la dieta de zinc como factor clave en la depresión de la respuesta inmunitaria celular.

Se han publicado muchos artículos en los que se ha demostrado que el zinc es un elemento clave para un buen funcionamiento del sistema inmunitario, al interactuar directamente con los diversos componentes necesarios para una respuesta competente como son: hormonas tiroideas y enzimas.

La mayoría de los trabajos se refieren a las consecuencias de

una deficiencia de zinc (17,26,35,46), y todos coinciden en que ésta, provoca depresión tanto en la respuesta humoral como en la respuesta celular, así como que la suplementación del elemento traza favorece la normalización de muchas de las funciones inmunológicas.

Se ha encontrado en múltiples estudios que la deficiencia de zinc afecta la respuesta inmunitaria desde la producción de las células que intervienen en ella, hasta la funcionalidad de las mismas (18).

Hay trabajos que reportan que la deficiencia de zinc en ratones se caracteriza por síntomas similares a los encontrados en los animales desgastados con estafilococos, como: alopecia, pérdida de peso, postura encorvada y un aumento en la tasa de mortalidad (42). Esto nos lleva a pensar que quizás la deficiencia de zinc, provocada por la ingesta insuficiente de alimento, se combina con el tratamiento desgastante para agravar la condición de los ratones.

Podemos observar la relación directa entre el zinc y el sistema inmunitario en los resultados obtenidos al evaluar las reacciones de hipersensibilidad tardía y determinar la concentración intratímica de zinc en los ratones.

Los ratones desgastados presentan una depresión prolongada en las reacciones de hipersensibilidad tardía, en el período

post-tratamiento, mientras que los ratones sanos tienden a aumentar progresivamente la respuesta contra el mismo antígeno, en el mismo periodo (Gráfica No. 1).

Por otro lado, al determinar la concentración de zinc en el timo de los animales, encontramos que los ratones desgastados presentan niveles elevados del elemento traza, respecto a los ratones sanos, aunque la concentración del microelemento, en ambos grupos, presenta una clara tendencia a disminuir a lo largo de las dos semanas posteriores al tratamiento (Gráfica No. 2).

Así, tenemos una clara correlación entre la concentración de zinc en timo y la intensidad de las reacciones de hipersensibilidad tardía representada en las gráficas No. 3 y No.4.

En el grupo de animales desgastados suplementados con el elemento traza, el deterioro físico fué menor al de los animales que no recibieron el suplemento. Estos animales mostraron menor irritabilidad y menor retraso en el crecimiento así como, una ingesta mayor del alimento administrado.

También encontramos, en el grupo de animales desgastados que recibieron un suplemento de zinc, un incremento en la respuesta de hipersensibilidad, respecto al ratón desgastado que no recibe el suplemento, en las dos semanas posteriores al tratamiento (Gráfica No.5). En esta misma gráfica se observa, al quinto día de

post-tratamiento, una marcada elevación en la intensidad de la hipersensibilidad que podemos atribuir a posibles errores en la experimentación o quizá a algún cambio metabólico del zinc que se lleva a cabo en el ratón al cumplir esa determinada edad.

En este mismo grupo de animales, observamos que los niveles del elemento traza en timo elevados en los ratones desgastados, disminuyen a lo largo de el período de post-tratamiento (Gráfica No. 6). Esto posiblemente está relacionado con una alteración en el metabolismo intratímico de zinc durante el síndrome del desgaste y a una posible recuperación después de la suplementación.

Los cambios observados en el animal desgastado, suplementado con zinc, quizá se pueden explicar con base en que el animal, al mismo tiempo que recibe un tratamiento desgastante, se le administra un suplemento de un elemento inmunoesencial, ayudándole a resistir tanto la inoculación de bacterias inactivadas, como su efecto desgastante, por acción directa del zinc sobre el sistema inmunitario, de manera que el animal puede protegerse de el ataque de microorganismos oportunistas o bacterias comensales que translocalizan a otros órganos. Se han publicado diversos trabajos que muestran que ratones tratados con zinc antes, o durante, la inoculación de endotoxinas por vía IP, disminuyen su tasa de mortalidad (47). Este trabajo señala que este efecto se asocia a una inhibición de la absorción de la endotoxina en la cavidad peritoneal. Por lo que parece que los efectos benéficos del zinc

se deben, en primera instancia, a una inmovilización química de la toxina más que a efectos inmunoestimulantes.

Esta idea no es compartida por muchos otros autores que sostienen que el efecto benéfico del zinc se debe exclusivamente a su carácter inmunoesencial. Pamela Fraker y col. (34) realizaron un experimento en el que dividieron ratones en grupos a los que se suministraron dietas con diferentes concentraciones de zinc, sin ser tratados con endotoxinas. Los resultados mostraron que los ratones que recibieron mayor cantidad de zinc, tuvieron una producción mayor de células formadoras de anticuerpos (CFA).

Por otro lado, hay autores que mencionan la posibilidad de que este efecto benéfico del zinc, se debe más bien a una compensación del mismo en el organismo, más que un efecto inmunoestimulante (36). De cualquier manera, una compensación significa niveles normales de zinc en el organismo para el funcionamiento adecuado de los componentes del sistema inmunitario.

Como parte de este trabajo, y formando parte del control del experimento, administramos acetato de zinc a ratones sanos, para observar la influencia del microelemento sobre su inmunidad celular.

En este grupo de animales encontramos un aumento en la intensidad en las reacciones de hipersensibilidad tardía, comparado con los

animales sanos que no recibieron el suplemento de zinc (Gráfica No.7).

NOTA: Se emplearon los resultados del grupo de ratones sin tratamiento como control del experimento indistintamente del grupo que recibió inoculaciones de SSI, ya que ambos dieron resultados similares tanto en las mediciones de hipersensibilidad tardía, como en las determinaciones de las concentraciones de zinc.

Así pues, tenemos dos grupos de animales sanos mantenidos en las mismas condiciones: mismas cantidades de agua y comida; por lo que, se supone que no les hace falta ningún nutriente y, por tanto, no hace falta compensar nada en el organismo. Pero, encontramos un aumento en la respuesta inmunitaria celular lo cual, de alguna manera, sugiere un efecto estimulante del elemento traza sobre el sistema inmunitario. Claro, que entre este experimento y el antes mencionado, se emplean especies y metodologías diferentes lo cual puede explicar, en cierto modo, la diferencia de resultados.

Existen además, múltiples trabajos que demuestran diferentes aspectos de la participación del zinc sobre el sistema inmunitario. Se sabe que el microelemento favorece la activación policlonal de linfocitos *in vitro* ; en células B esplénicas provoca blastogénesis, tan potente como "pokeweed" o derivados

proteicos purificados; también tiene efecto tipo adyuvante al aumentar la respuesta proliferativa a diversos mitógenos como concanavalina A o fitohemaglutinina, por lo que es el único nutriente con efectos de activador policlonal y adyuvante; es cofactor de múltiples enzimas que participan en la respuesta inmunitaria, además de ser esencial para la actividad biológica de ciertas hormonas tímicas, como la timulina.

Como complemento a este trabajo, se analizó la concentración del zinc en el hígado. Los datos revelan un aumento en la concentración del microelemento en el tejido hepático durante el período de post-tratamiento así como un cambio en los niveles del zinc, después de la suplementación con el mismo, indicando la posibilidad de una alteración del metabolismo hepático durante el período desgastante. Gráficas No. 8 y No. 9.

También se analizó la concentración de zinc en suero de los diferentes grupos de ratones sin encontrar datos representativos; además, se reporta en la literatura (31,48) que la concentración sérica de zinc no representa fielmente si existe o no una deficiencia del mismo en el organismo. Estos autores sugieren que la concentración de zinc en células como plaquetas, linfocitos y granulocitos resulta un mejor índice de los niveles del elemento traza en el organismo.

Este trabajo experimental, como otras investigaciones realizadas en el Departamento de Biología de la Facultad de Química, muestra que el modelo murino de desgaste inducido por inoculaciones de estafilococos inactivados suspendidos en solución salina isotónica, da resultados satisfactorios para el estudio del deterioro del sistema inmunitario. Esto es de gran utilidad pues la enfermedad del desgaste deriva en manifestaciones clínicas que se presentan en enfermedades inmunológicas padecidas por los humanos (SIDA, cáncer, desnutrición, etc.).

Los resultados obtenidos al aplicar un suplemento de zinc simultáneo al tratamiento desgastante, confirman la utilidad del micronutriente como un elemento inmunomodulador.

Cabe mencionar que estos resultados son el principio de una larga investigación para establecer, a futuro, terapéuticas que empleen el zinc como base. Para ello se cuenta en la actualidad con nuevas y diversas técnicas, como la empleada en el presente trabajo: espectrofotometría de absorción atómica, que poco a poco permitirán conocer aspectos metabólicos del zinc en el organismo,

y con ello establecer vías de administración, concentración y dosis del microelemento, adecuadas a los diversos trastornos inmuológicos que puedan normalizarse con la aplicación de zinc.

El presente trabajo tiene como objetivo principal conocer los efectos del zinc sobre la inmunidad celular de ratones desgastados, con el fin de determinar su posible uso como agente profiláctico o terapéutico en enfermedades con características clínicas similares a las encontradas en el síndrome del desgaste.

La primera parte del experimento consiste en la inducción del desgaste en ratones de la cepa CD₁, mediante inoculaciones de *Staphylococcus aureus* inactivado, para posteriormente, evaluar la inmunidad celular mediante reacciones de hipersensibilidad tardía. Se analizan, también, los niveles intratímicos de zinc, mediante análisis de espectrofotometría de absorción atómica, para observar si hay alguna alteración de aquéllos durante el período desgastante.

En esta parte del trabajo encontramos que los ratones inoculados con *S. aureus* presentan una depresión prolongada en las reacciones de hipersensibilidad tardía a la ovoalbúmina, así como un aumento en los niveles de zinc en tìmo.

Al continuar el experimento otro grupo de ratones recibe un

suplemento de zinc al mismo tiempo que se aplica el tratamiento desgastante, para observar el efecto del elemento traza sobre su sistema inmunitario y determinar si hay cambios en los niveles intratímicos de zinc.

Los resultados muestran que la administración de zinc ejerce un efecto estimulante pues la intensidad de las reacciones de hipersensibilidad tardía aumenta a lo largo del período de post-tratamiento en el animal desgastado que recibe el elemento traza. Así mismo, encontramos que los niveles de zinc en timo, elevados en el ratón desgastado, disminuyen a lo largo de las dos semanas posteriores al tratamiento.

Por otro lado, en ratones sanos, que reciben el suplemento de zinc, se observa el mismo efecto, es decir, incremento en la intensidad de las reacciones de hipersensibilidad tardía.

Estos resultados muestran que existe una correlación entre la concentración de zinc y la respuesta inmunitaria, siendo la participación del oligoelemento de carácter esencial.

Por lo tanto, se considera de suma importancia que sigan los estudios sobre el zinc para conocer todos los aspectos del zinc, a nivel inmunológico, con el fin de poder emplearlo, a futuro, como terapéutico en enfermedades con características clínicas similares a las que presenta el síndrome del desgaste.

GRAFICA No. 1.

DIA	GRUPO	N	\bar{x}	SD	GRUPO	N	\bar{x}	SD
1	DESG	10	6.6	4.2	SANOS	10	2.7	2.1
5	DESG	10	4.5	3.4	SANOS	10	3.6	2.2
10	DESG	10	4.0	1.7	SANOS	10	4.0	1.5
15	DESG	10	3.4	3.5	SANOS	10	11.1	9.4

GRAFICA No. 2

DIA	GRUPO	N	$\mu\text{g Zn TOTALES}$	\bar{x}	SD
1	DESG	14	10.28	3.4	4.6
5	DESG	13	7.21	1.8	1.2
10	DESG	14	7.45	2.5	1.7
15	DESG	13	4.97	1.7	0.3
1	SANOS	11	6.05	3.0	2.0
5	SANOS	10	5.33	2.7	1.8
10	SANOS	10	4.99	1.7	1.6
15	SANOS	10	2.28	1.1	0.3

GRAFICA No. 5

DIA	GRUPO	N	\bar{x}	SD
1	DESG	10	6.6	4.2
5	DESG	10	4.5	3.4
10	DESG	10	4.0	1.7
15	DESG	10	3.4	3.5
1	DESG/Zn	10	3.9	2.7
5	DESG/Zn	10	8.6	6.0
10	DESG/Zn	10	5.2	2.4
15	DESG/Zn	10	7.0	3.5
1	SANOS	10	2.7	2.1
5	SANOS	10	3.6	2.2
10	SANOS	10	4.0	1.5
15	SANOS	10	11.1	9.4

GRAFICA No. 6

DIA	GRUPO	N	$\mu\text{g Zn TOTALES}$	\bar{x}	SD
1	DESG	14	10.28	3.4	4.6
5	DESG	13	7.21	1.8	1.2
10	DESG	14	7.45	2.5	1.7
15	DESG	13	4.97	1.6	0.3

GRAFICA No. 6 (CONTINUACION)

DIA	GRUPO	N	µG ZN TOTALES	\bar{x}	SD
1	DESG/ZN	10	4.0	1.3	0.7
5	DESG/ZN	13	3.8	1.2	0.7
10	DESG/ZN	11	3.77	1.2	1.7
15	DESG/ZN	14	4.0	1.0	0.8
1	SANOS	11	6.05	3.0	2.0
5	SANOS	10	5.33	2.6	1.8
10	SANOS	10	4.99	1.7	1.6
15	SANOS	10	2.26	1.1	0.3

GRAFICA No. 7

DIA	GRUPO	N	\bar{x}	SD
1	SANOS	10	2.7	2.1
5	SANOS	10	3.6	2.2
10	SANOS	10	4.0	1.5
15	SANOS	10	11.1	9.4
1	SANOS/ZN	10	6.8	3.5
5	SANOS/ZN	10	7.1	2.2
10	SANOS/ZN	10	8.9	4.6
15	SANOS/ZN	10	7.0	3.7

GRAFICA No. 8

DIA	GRUPO	N	µg Zn TOTALES	\bar{x}	SD
1	DESG	14	4.32	1.4	0.9
5	DESG	13	15.03	3.7	1.7
10	DESG	14	16.33	5.4	3.4
15	DESG	13	16.9	5.6	2.8
1	SANDS	11	9.89	4.9	1.0
5	SANDS	10	6.0	3.0	1.2
10	SANDS	10	14.78	4.9	3.9
15	SANDS	10	11.75	5.8	4.5

GRAFICA No. 9

DIA	GRUPO	N	µg Zn TOTALES	\bar{x}	SD
1	DESG	14	4.32	1.4	0.9
5	DESG	13	15.03	3.7	1.7
10	DESG	14	16.33	5.4	3.4
15	DESG	13	16.94	5.6	2.8
1	DESG/Zn	10	4.42	1.4	0.6
5	DESG/Zn	13	7.14	2.3	1.4
10	DESG/Zn	11	6.62	2.2	1.3
15	DESG/Zn	14	13.64	3.4	2.3

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

GRAFICA No. 9 (CONTINUACION)

DIA	GRUPO	N	µG ZN TOTALES	\bar{x}	SD
1	SANOS	11	9.89	4.9	1.0
5	SANOS	10	6.0	3.0	1.2
10	SANOS	10	14.78	4.9	3.9
15	SANOS	10	11.75	5.8	4.5

A) Preparación de la suspensión de *Staphylococcus aureus*. Se emplea la cepa ATCC 6538, la cual se propaga en medio BHI, con agitación (400 rpm) a 37 °C, durante 18 horas. Después se cosecha el desarrollo bacteriano y se lava con SSI estéril, para continuar con la inactivación en autoclave a 15 lbs. durante 60 minutos, a 121 °C. El siguiente paso es la recolección de las bacterias por centrifugación y se hace el ajuste de la suspensión a 5×10^7 células/ml de SSI. El ajuste se hace por nefelometría, empleando la curva estándar según McFarland (49).

B) Preparación de la Suspensión de *Staphylococcus aureus* combinado con Acetato de zinc. La suspensión de bacterias se prepara como en el punto anterior, a una concentración de 10×10^9 de manera que al mezclarla con la solución de acetato de zinc, de doble concentración, se logre la concentración adecuada.

C) Medición de la hipersensibilidad tardía (50,51). Se inmuniza a los ratones inoculándolos con 15 μ l de ovoalbumina (100 μ g) mezclado con adyuvante completo de Freund (15 μ l), en el cojinete plantar. Una semana después se toma la medida basal de el cojinete

de la otra pata, empleando para ello un tornillo micrométrico, para proceder a desafiar al animal mediante otra inoculación del mismo antígeno, en la misma dosis. Con el mismo tornillo micrométrico se mide la inflamación de el cojinete a las 24 y 48 horas de realizada la prueba, para determinar la intensidad de las reacciones de hipersensibilidad en los ratones.

D) Fundamento de la espectrofotometría de absorción atómica. Esta técnica se refiere al estudio de la absorción de energía radiante por átomos. Como proceso analítico, implica la conversión de elementos a átomos y, posteriormente, la absorción de energía por éstos (52).

El análisis se realiza mediante el uso de un espectrofotómetro que consta de las siguientes partes:

- Fuente de luz. Se emplean lámparas de cátodo hueco que emiten la luz como un haz, condición requerida para poder ser absorbida por los átomos, de la longitud de onda específica del elemento a analizar (52).

- Atomizador. Los atomizadores en general son quemadores cuya función es aspirar la muestra y disociarla de ión o molécula a átomos, evaporando el disolvente (53).

Si el atomizador es de flama la muestra debe ser líquida. -

- Modulador. Su función es, básicamente, eliminar interferencias en el haz de luz, debidas entre otros, a variaciones en la lámpara.

- Monocromador. Este colecta la luz proveniente del atomizador y

la dirige al detector, en forma de una sola línea del espectro generado por el elemento analizado (53).

- Detector. Se usan fotomultiplicadores como detectores, los cuales constan de una serie de electrodos que amplifican la luz emitida, transformándola en señales eléctricas.

La absorción medida es la diferencia entre I_0 , la intensidad de la luz emitida inicialmente, e I_1 , la intensidad de la luz después de el paso a través de los átomos del elemento analizado.

La lectura refleja entonces la absorbancia, y por tanto, empleando la Ley de Lambert-Bear, podemos conocer la concentración de dicho elemento (53).

El análisis de las muestras de éste trabajo experimental se realizó en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer, modelo 2380.

13. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Stites, Daniel P.
Inmunología Basica y Clinica
El Manual Moderno
México, 1983.
- 2.- Rojas, William.
Inmunología
Fondo Educativo Interpanamericano
Colombia, 1983.
- 3.- Bach, Jean-Francoise.
Inmunología
Editorial Limusa
México, 1986.
- 4.- Stiehm, Richard.
Immunologic Disorders in Infants and Children
W.B. Saunders Co.
USA, 1989.
- 5.- Pérez Tamayo, Ruy.
Principios de Patología
Editorial Médica Panamericana
México, 1990.
- 6.- Hood, Leroy; Weissmann, Irving.
Immunology
The Benjamin/Cumming Pub. Co.
USA, 1984.
- 7.- Keast, D.
Role of Bacterial Endotoxin in the Graft-versus-Host Syndrome
J. Infect. Dis., 1873, 128, suppl.1: S104.

- 8.- Miller, J.F.A.P.; HOWARD, J.G.
Effect of Thymectomy on the Immunological Responsiveness of the Mouse
 Proc. R. Soc. London (B), 1962, 156: 415.
- 9.- Simonsen, M.
The mechanism of Runt Disease. En: Mechanism of Cell and Tissue Damage Produced by Immune Reactions
 Editores: Grabar, P. y Miescher, P.
 Benno & Schwabe Co. Publishers
 Suiza, 1962.
- 10.- Bonifaz Alfonso, Laura C.
Utilidad de las sales de tetrazolium para estudiar la proliferacion de linfocitos en ratones desgastados
 Tesis para obtener el Titulo de Q.F.B.
 Facultad de Química, UNAM, México, 1991.
- 11.- Jutila, John W.
Etiology of the Wasting Diseases
 J. Infect. Dis., 1973, 123 suppl: S99.
- 12.- Fierro Gaxiola, Leonel.
Estudio de la tolerancia inmunologica oral en ratones recién nacidos tratados con Staphylococcus aureus
 Tesis para obtener el Titulo de Q.F.B.
 Facultad de Química, UNAM, México, 1990.
- 13.- Gracia, Raúl.
Actividad biológica del antígeno común de enterobacterias en ratones recién nacidos
 Tesis para obtener el Titulo de Q.F.B.
 Facultad de Química, UNAM, México, 1991.
- 14.- García Tamayo, Fernando; Ocampo, Angélica.
Interacciones entre los Sistemas Inmunitario y Gonadal
 Ciencia, 1991, 42: 155.
- 15.- Ekstedt, R.D.; Hayes, L.L.
Runt Disease Induced by non-living Bacterial Antigens
 J. Immunol., 1967, 98: 110.

- 16.- González Macouzet, Eduardo.
Efecto de la administración de zinc sobre la inmunocompetencia de ratones CDI con el síndrome del desgaste
 Tesis para obtener el Título de Q.F.B.
 Facultad de Química, UNAM, México, 1991.
- 17.- Cunningham-Rundles et al
Physiological and Pharmacological Effects of Zinc on Immune Response
 Ann. N.Y. Acad. of Sci., 1990,
- 18.- Chandra, R.K.
Nutritional Regulation of Immunity and Risk of Illness
 Indian J. Pediatr., 1989, 56: 607.
- 19.- García Tamayo, Fernando.
Desnutrición, Infecciones y Subdesarrollo
 Biotiquimia, 1991, 26 (62): 14.
- 20.- Espinosa Arciniega, Enrique.
Influencia de 8 elementos químicos en la respuesta inmunitaria
 Revisión monográfica para obtener el Título de Q.F.B.
 Facultad de Química, UNAM, México, 1989.
- 21.- Hambidge, K. et al
Low Levels of Zinc in Hair. Anorexia. Poor Growth and Hypogeusia in Children
 Pediatr. Res., 1972, 6: 868.
- 22.- Cunnane, Stephen
Zinc: Clinical and Biochemical Significance
 CRC Press Inc.
 USA, 1988.
- 23.- Turnbull, A.J.; Blakeborough, P.
The Effects of Dietary Ligands on Zinc Uptake at the porcine Intestine brush-border Membrane
 British Journal of Nutrition, 1990, 64: 733.

- 24.- Bogden, John D. et al
Zinc and Immunocompetence in the elderly: Baseline data on Zn Nutrition and Immunity in Unsupplemented Subjects
Am. J. Clin. Nutr., 1987, 46: 101.
- 25.- Keen, Carl; Gershwin, Eric.
Zinc Deficiency and Immune Function
Ann. Rev. Nutr., 1990, 10: 415.
- 26.- Pekarek, Robert et al
Abnormal Cellular Immune Responses During Acquired Zinc Deficiency
Am. J. Clin. Nutr., 1979, 32: 1466.
- 27.- Fraker, Pamela; Gershwin, Eric; Prasad, Ananda.
Interrelationships Between Zinc and Immune Function
Fed. Proc., 1986, 45 (5): 1474.
- 28.- Meftah, Sheila; Prasad, Ananda.
Nucleotids in Lymphocytes of Human subjects with Zinc Deficiency
J. Lab. Clin. Med., 1989, 114 (2): 114.
- 29.- Solomons, Noel et al
Studies on the Bioavailability of Zinc in Humans: Intestinal Interaction of Tin and Zinc
Am. J. Clin. Nutr., 1983, 37: 566.
- 30.- Johnson, Mary Ann; Greger, J.L.
Absorption, Distribution and Endogenous Excretion of Zinc by Rats fed Various Dietary Levels of Inorganic Tin and Zinc
J. Nutr., 1984, 114: 1843.
- 31.- Prasad, Ananda et al
Serum Thymulin in Human Zinc Deficiency
J. Clin. Invest., 1988, 82: 1202.
- 32.- Prasad, Ananda; Oberleas, Donald.
Zn: Human Nutrition and Metabolic Effects
Ann. Int. Med., 1970, 73 (4): 631.

- 33.- O'Dell, Boyd; Reynolds, Genevieve; Reeves, Phillip.
Analogous Effects of Zinc Deficiency and Aspirin Toxicity in the Pregnant Rat
 J. Nutr., 1977, 107: 1222.
- 34.- Fraker, Pamela; Haas, Suzanne; Luecke, Richard.
Effect of Zinc Deficiency on the Immune Response of the Young Adult A/J Mouse
 J. Nutr., 1977, 107: 1889.
- 35.- Golden, Michael et al
Zn and Immunocompetence in Protein-Energy Malnutrition
 Lancet, 1978, 1: 1226.
- 36.- Duchateau, Jean et al
Beneficial Effect of Oral Zn Supplementation on the Immune Response of Old People
 Am. J. Med., 1981, 70: 1001.
- 37.- Lockitch, Gillian et al
Infection and Immunity in Down Syndrome: A Trial of Long-term Low Oral Doses of Zinc
 J. Pediatr., 1989, 114: 781.
- 38.- Fosmire, Gary.
Zinc Toxicity
 Am. J. Clin. Nutr., 1990, 51: 225.
- 39.- Fenwick, Paul et al
Zinc Deprivation and Zinc Repletion: Effect on the response of Rats to Infection with Strongyloides ratti
 Am. J. Clin. Nutr., 1990, 52: 173.
- 40.- Green, Mark; Shatten, S.; Bronsberg, J.
Delayed Hypersensitivity: Fundamental Immunology
 Raven Press
 USA, 1984.

- 41.- Roitt, Ivan et al
Immunology
 Blackwell Scientific
 USA, 1984.
- 42.- Faulk, W. Page; Demaeayer, E.M.
Some Effects of Malnutrition on the Immune Response in Man
 Am. J. Clin. Nutr., 1974, 27: 638.
- 43.- Moreno Tovar, Juan Manuel.
Grado de susceptibilidad al desgaste inmunologico en ratones CD1 y C3HeB/FeJ tratados con Staphylococcus aureus
 Tesis para obtener el Título de Q.F.B.
 Facultad de Q.F.B., Universidad Veracruzana, 1991.
- 44.- Casales L., Alberto.
Translocalizacion bacteriana en ratones CD1 con el sindrome del desgaste
 Tesis para obtener el Título de Q.F.B.
 Facultad de Química, UNAM, México, 1991.
- 45.- Zimmermann, B.T. et al
Silica decreases Phagocytosis and Bacterial Activity of both Macrophages and Neutrophils in vitro
 Immunology, 1986, 59: 521.
- 46.- Moulder, K.; Steward M.W..
Experimental Zinc Deficiency: Effects on Cellular Responses and the Affinity of Humoral Antibody
 Clin. Exp. Immunol., 1989, 77: 269.
- 47.- Chesters, J.K.; Will, Marie.
Measurement of Zn Flux through Plasma in Normal and Endotoxin-stressed pigs and the Effects of Zinc Supplementation during Stress
 Br. J. Nutr., 1981, 46: 119.
- 48.- Milne, David; Ralston, Nick.
Zinc content of Blood Cellular Components and Lymph Node and Spleen Lymphocytes in Severely Zinc Deficient Rats
 J. Nutr., 1985, 115: 1073.

- 49.- Campbell, Dan; Garvey, Justine.
Methods in Immunology
W.A. Benjamin Inc.
USA, 1974.
- 50.- Titus, Richard; Chiller, Jacques.
A Simple and Effective Method to Assess Murine Delayed Type Hypersensitivity to Proteins
J. Immunol. Meth., 1981, 45: 65.
- 51.- Strobel, S.; Mowat, A.; Ferguson, Anne.
Prevention of Oral Tolerance Induction to Ovalbumin and enhanced Antigen Presentation during a Graft-vs Host Reaction in Mice
Immunology, 1985, 56: 57.
- 52.- Robinson, James.
Atomic Absorption Spectroscopy
Dekker Marcel Inc.
USA, 1966.
- 53.- Slavin, Morris.
Atomic Absorption Spectroscopy
John Wiley and Sons
USA, 1978.