



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

RESPUESTA INMUNOLOGICA

"IN VITRO" EN PRESENCIA DE ZINC



T E S I S

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

Que para obtener el Título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

Alejandro Camacho Cruz



México, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1994



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.

**Jurado asignado:**

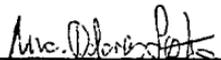
Presidente.....Prof. : Andrea Gabayet Martin  
Vocal.....Prof. : Ma. Dolores Lastra Azpilicueta  
Secretario.....Prof. : Ana Esther Aguilar Cárdenas  
1er. Suplente.....Prof. : Patricia Elvira Berron Ruiz  
2o. Suplente.....Prof. : Roxana Pelayo Camacho

**Sitio donde se desarrollo el tema:**  
**Laboratorio de Investigación en Inmunología**  
**Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM**

**Asesor del tema:**  
**Q.F.B. Ana Esther Aguilar Cárdenas**

  
\_\_\_\_\_

**Supervisor Técnico:**  
**M en C Ma. Dolores Lastra Azpilicueta**

  
\_\_\_\_\_

**Sustentante:**  
**Alejandro Camacho Cruz**

  
\_\_\_\_\_

**Con cariño a mis padres  
Francisco y Rosa**

**A mis hermanas  
Sandra Luz , Mercedes y Rosa Aurora**

## A Cecilia

Quando a gente se encontra, eu me lembro de você.

Quando a gente se encontra, eu me lembro de você.

Quando a gente se encontra, eu me lembro de você.

Quando a gente se encontra, eu me lembro de você.

## **Agradecimientos**

**A Anita por sus valiosos consejos, asesoría, amistad brindada durante mi permanencia en el Laboratorio de investigación en inmunología. gracias**

**A Rodolfo Pastelin por amistad y consejos, gracias Prof.**

## INDICE

1	Introducción	1
2	Antecedentes	4
	2.1 Sitios de almacenamiento	6
	2.2 Función biológica del zinc	6
	2.3 Evaluación del <i>status</i> de zinc	11
	2.4 Absorción de zinc	12
	Asimilación celular de zinc en el intestino	
	Transporte plasmático	
	Influencia del estado fisiológico sobre la absorción de zinc	
	2.5 Excreción de zinc	20
	Excreción fecal	
	Excreción urinaria	
	Excreción y distribución en leche	
	2.6 Zinc y metalotioneínas	23
	Biosíntesis de metalotioneínas	
	Funciones de las metalotioneínas	
	2.7 Zinc y embarazo	29
	2.8 Deficiencia de zinc	33
	Zinc y sistema inmunitario	
	Efecto sobre los tejidos y células linfoides	
	Efecto sobre el número de linfocitos	
	Efecto sobre la inmunidad humoral	

Efecto sobre la inmunidad mediada por células  
Efecto sobre la hipersensibilidad tardía  
Efecto sobre la función de células fagocíticas  
Patogénesis de la deficiencia de zinc  
Diagnóstico de la deficiencia de zinc  
Terapia de la deficiencia de zinc

2.9	Suplementación con zinc	44
2.10	Exceso de zinc	48
2.11	Zinc <i>in vitro</i>	51
3	Objetivo	59
4	Material y Métodos	60
5	Resultados	67
6	Discusión	85
	Anexos	96
	Bibliografía	99

## 1 INTRODUCCION

El gran interés por conocer el papel que desempeñan los elementos traza en los sistemas biológicos de los seres vivos se ha visto incrementado en los últimos años, debido a que se ha encontrado que estos elementos resultan esenciales para su desarrollo y funcionamiento; se ha encontrado que un exceso o una disminución en la ingesta de estos micronutrientes puede provocar alteraciones que resultarían dañinas, estas consecuencias han sido observadas tanto en seres humanos como en animales de experimentación.

Un elemento esencial puede definirse como aquel que resulta necesario para mantener la vida de un organismo y cuya falta puede ocasionar la muerte o un mal funcionamiento del mismo. Estos elementos se encuentran en los seres vivos en pequeñas cantidades, por lo que son conocidos como elementos traza. Un elemento traza esencial, es aquel que se requiere en cantidades del orden de miligramos o menores.

Entre los elementos traza esenciales podemos citar al: manganeso, níquel, zinc, fierro, cobre, entre otros; los cuales resultan importantes para el metabolismo de las células debido a que funcionan principalmente como cofactores de numerosas enzimas.

El zinc en particular, juega un papel primordial en una gran variedad de sistemas metabólicos. Es cofactor esencial de enzimas relacionadas con la proliferación celular como es el caso de la DNA y RNA polimerasas, así como de enzimas que intervienen en la síntesis y degradación de metabolitos como la anhidrasa carbónica, fosfatasa alcalina, deshidrogenasa alcohólica, etc. Es un elemento importante para la ontogenia y funcionamiento del sistema inmunológico e incluso puede actuar como inmunomodulador.

Ahora bien se ha encontrado que la adición "*in vitro*" de este micronutriente a cultivos de células esplénicas de animales y células de sangre periférica en humanos incrementa la respuesta a mitógenos. También se ha visto que este metal por si solo resulta ser mitogénico.

Otra consecuencia de la suplementación "*in vitro*" es el incremento en la respuesta primaria de anticuerpos encontrado en los cultivos de células de animales seniles, asimismo los niveles de Interleucina-1 (IL-1) y la actividad de la Interleucina-4 (IL-4) se ven favorecidos con la presencia del metal. Se ha visto que estos efectos inmunoestimulantes del zinc parecen ser independientes de la producción de Interleucina-2 (IL-2).

Es importante hacer notar que durante las diferentes etapas del desarrollo como son la gestación, la lactancia y el postdestete, se presentan inmunodeficiencias fisiológicas transitorias, en donde se han observado niveles bajos de zinc, por lo que se propone que este elemento como inmunomodulador, podría reforzar el sistema inmunológico en estos periodos.

Existen además algunas controversias entre los datos provenientes de estudios administrando zinc "*in vivo*" e "*in vitro*", por lo que resulta de interés constatar el efecto de la administración del metal "*in vitro*" a células procedentes de animales suplementados "*in vivo*" con el micronutriente.

## 2 ANTECEDENTES

La nutrición es un determinante crítico en la inmunocompetencia y la susceptibilidad a infecciones, los niños con malnutrición protéico-energética presentan morbilidad y mortalidad aumentadas debido en gran parte a enfermedades infecciosas. Estos cambios inmunológicos aunados a otros factores de desventaja observados en sociedades poco privilegiadas, conducen a más infecciones las que a su vez provocan cambios fisiológicos que empeoran el *status* nutricional (11).

Actualmente se considera que varios minerales y elementos traza intervienen en las funciones biológicas de los seres vivos, las cuales tienen cierto impacto sobre los mecanismos de defensa y el sistema inmunológico del hospedero. Los elementos traza sirven como constituyentes importantes de metaloenzimas, las que son requeridas para el mantenimiento de la viabilidad y función celular e incluyen aquellas que sirven para mantener los mecanismos de resistencia del huésped. Los cationes divalentes como fierro, zinc, magnesio y selenio, han recibido especial atención debido a la importancia que tienen sobre el sistema inmunológico y otros mecanismos de defensa (3,12).

Durante la última década el zinc y sus propiedades inmunorreguladoras han sido objeto de un interés considerable, alimentado por las observaciones concernientes acerca de la influencia de la suplementación con zinc sobre la ontogenia y función del sistema inmunitario en animales de experimentación y por los numerosos reportes clínicos que sugieren una asociación directa entre las deficiencias marginales de zinc y la inmunocompetencia deprimida en poblaciones de seres humanos.

Los primeros reportes acerca de los requerimientos de zinc en los sistemas biológicos aparecieron hace más de 100 años cuando Raulin reportó que el zinc es un metal indispensable para el adecuado crecimiento del hongo *Aspergillus niger*. Los reportes posteriores describen la presencia y el carácter esencial del zinc tanto en bacterias y plantas, como en animales inferiores y superiores. El elemento zinc, no sólo es un micronutriente esencial para los sistemas metabólicos, sino que es fundamental para el sistema inmunológico y otros mecanismos de defensa inespecíficos de los seres vivos (8).

## *2.1 Sitios de almacenamiento de zinc en el organismo*

El contenido total de zinc en el cuerpo de un adulto sano es de aproximadamente 30 mg, de los cuales una gran cantidad se almacena principalmente en músculo y médula ósea, aunque en esta última el zinc no se encuentra disponible para ser movilizado. La concentración de zinc en plasma varía de 10 a 24  $\mu\text{mol/l}$ ; mientras que en los eritrocitos esta concentración es 10 veces mayor que la del plasma; por su parte los leucocitos contienen 25 veces más cantidad de zinc que los eritrocitos. En el plasma este metal se encuentra unido principalmente a la albúmina, una cantidad remanente se une a la  $\alpha_2$ -macroglobulina y una pequeña cantidad se encuentra unida a aminoácidos en forma de quelatos (4,29).

## *2.2 Función biológica del zinc*

El zinc es un bioelemento cuyas características químicas lo hacen sumamente versátil para ser empleado en múltiples procesos bioquímicos, por una gran cantidad de sistemas biológicos. Se ha descrito que este metal participa en la mayoría de los procesos de síntesis y degradación de gran cantidad de moléculas gracias a su función como cofactor enzimático y activador químico. Aunque la característica del zinc de ser esencial para el crecimiento, desarrollo

y diferenciación celular ha sido establecida perfectamente, los mecanismos bioquímicos por los cuales este metal ejerce su efecto aún se desconocen.

Este micronutriente forma parte de por lo menos 300 metaloenzimas, además interviene en muchas reacciones bioquímicas que realizan los linfocitos. En la replicación celular, el zinc juega un papel muy importante debido a que se requieren enzimas que contienen este metal para la síntesis de ácidos nucleicos; como por ejemplo: DNA Y RNA polimerasas, transcriptasa reversa y nucleósido fosforilasa. Asimismo se ha visto que la administración de este metal en bajas concentraciones incrementa la actividad de la enzima convertidora de angiotensina, encontrándose que es una enzima dependiente de zinc (4).

Actualmente se han descrito 12 enzimas cuya estructura cristalina es conocida y corresponden a estándares de referencia para sitios del zinc estructurales y catalíticamente activos. En estas enzimas el átomo de zinc estructural se coordina a 4 cisteínas; mientras que los átomos de zinc localizados en sitios catalíticamente activos se encuentran unidos a 3 aminoácidos (histidina, ácido glutámico y ácido aspártico o cisteína) y una molécula de agua, completa la esfera de coordinación tetraédrica (8).

Dado que la replicación celular es clave para el funcionamiento del sistema inmunológico, la participación del zinc en este evento es primordial. Sin embargo el mecanismo por el cual el zinc influye en el sistema inmunológico no sólo se limita a funciones enzimáticas sino que resulta más complejo.

El zinc modifica y estabiliza las membranas celulares, ésto tal vez se deba a que puede formar mercáptidos con los grupos tiol de las proteínas o interactuando con grupos fosfato de los fosfolípidos y con grupos carboxilo de los ácidos siálicos. Se ha visto que este elemento puede inhibir algunas funciones inducidas por la calmodulina, la cual interviene en procesos regulados por calcio. Otros estudios sugieren que al igual que el calcio, el zinc participa en la distribución celular y en la activación de las proteínas cinasas, aunque a través de distintos mecanismos. La influencia del zinc sobre estas enzimas se ha visto que afecta la expresión del receptor para eritrocitos de ratón (MER) presente en algunos linfocitos B humanos (4, 17).

Debido a que no todas las manifestaciones clínicas ocasionadas por la falta de zinc pueden explicarse por la alteración y falta de una o la combinación de varias enzimas, se ha propuesto que deben existir interacciones, probablemente entre el zinc y el genoma, que expliquen las manifestaciones clínicas de la deficiencia del metal.

Los efectos de la deficiencia de zinc sobre la síntesis de DNA y RNA en varios tejidos indican una estrecha relación entre el elemento y el metabolismo de los ácidos nucleicos, lo cual se ha visto reforzado con la demostración de que varios factores de transcripción (activadores del proceso de transcripción), requieren zinc como cofactor (10).

Para que un gen se active, requiere que las proteínas conocidas como factores de transcripción interactúen con un segmento del gen llamado promotor, esta interacción provoca el inicio de la síntesis de proteínas; existen varios factores de transcripción entre los que se encuentran los denominados dedos de zinc (zinc finger). Los zinc finger forman parte de proteínas que captan iones zinc, los cuales juegan un papel importante en la determinación estructural de éstas proteínas, para que puedan ensamblarse perfectamente en un sitio específico del gen promotor. Por ejemplo se ha visto que la regulación negativa de la expresión del gen de la interleucina 2 (IL-2) puede ser regulada por una proteína con dedos de zinc (50).

Estos dedos de zinc son dominios constituidos por repeticiones de 30 aminoácidos aproximadamente entre los que se encuentran 2 pares de histidinas y 2 de cisteínas invariables a las que se une el metal, esto provoca que tales secuencias se plieguen alrededor del

átomo de zinc formando un complejo tetracoordinado con los pares de cisteína e histidinas produciendo un pequeño dominio estructural independiente y unos cuantos aminoácidos unen a los dominios formando cadenas consecutivas. Estas asas interactúan con el DNA en una secuencia de pares de bases específica para que de inicio la síntesis de una proteína. Debido a su forma tan característica estas estructuras han recibido el nombre de dedos de zinc, fig 1 (41).

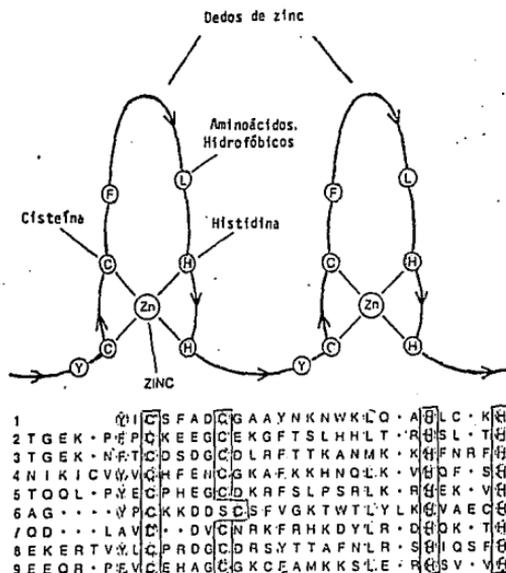


fig. 1 En la parte superior se muestra un diagrama de dos dedos de zinc, cada uno centrado por un átomo de zinc unido a dos pares de cisteínas y dos pares de histidinas, formando un arreglo tetraédrico. En la parte inferior se muestra la secuencia de aminoácidos presentes en el factor de transcripción IIIA de *Xenopus laevis*. Los aminoácidos alineados de esta forma permiten visualizar las repeticiones de las subunidades mostrando los pares conservados de histidinas y cisteínas (41).

### *2.3 Evaluación del status de zinc*

Existen diversas maneras de evaluar el estado nutricional de zinc en una persona, entre los métodos que han sido utilizados se encuentran: la medición de la concentración de zinc en pelo y orina, la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos, la agregación plaquetaria y la determinación de la concentración en suero y plasma mediante espectrofotometría de absorción atómica, siendo este último el más común. En donde pueden presentarse variaciones en la concentración del elemento que no dependen de la ingesta de zinc, sino de otras razones como son: la variación diurna, en donde se pueden observar valores máximos aproximadamente a las 10 a.m. También ocurren variaciones después de la alimentación encontrándose un incremento en la concentración del micronutriente en sangre; durante el embarazo se ha visto una disminución en su concentración sérica, observaciones similares se han encontrado cuando se presentan ciertos padecimientos como: leucemia, falla renal o una disminución en la concentración de albúmina (21).

Otra manera de conocer el estado nutricional de zinc y que al parecer resulta ser la más confiable, es mediante la determinación de la concentración de metalotioneínas en eritrocitos debido a que su expresión es menos sensible al estrés y la infección, comparada con las metalotioneínas plasmáticas las cuales se ven afectadas por la presencia de endotoxinas. La metalotioneína es una proteína que

capta iones zinc y se encuentra involucrada en varios aspectos referentes al metabolismo y función de dicho metal; se ha visto que la expresión de los genes de metalotioneína se encuentra regulada por este elemento (21,38).

#### **2.4 Absorción de zinc**

El consumo de zinc por una persona adulta sana, es alrededor de 200  $\mu\text{mol}/\text{día}$  aunque existen variaciones que van desde 70-450  $\mu\text{mol}/\text{día}$ , de estas cantidades aproximadamente el 30-40 % es absorbido (la dosis óptima recomendada es de 15 mg/día equivalentes a 229.35  $\mu\text{mol}/\text{día}$  (6,7,23)); dicha absorción dependerá de la fuente de zinc que se ingiera (14,27,29).

Por ejemplo el zinc proveniente de alimentos de origen animal y marino es mejor absorbido que el de origen vegetal, ésto se debe a que los fitatos que contienen los vegetales se une al zinc en el lumen intestinal disminuyendo su absorción; un efecto similar presentan las fibras. La siguiente tabla muestra el efecto de los constituyentes alimenticios sobre la absorción del metal.

Factores que aumentan la absorción	Factores que reducen la absorción
EDTA alimentación rica en proteínas lisina, glicina, cisteína histidina lactosa alimentación baja en hierro	glutatión alimentación rica en calcio fibras, fitatos alimentación baja en proteínas cobre alimentación rica en hierro

Tabla I. Efecto de los constituyentes alimenticios, agentes quelantes y factores endógenos sobre la absorción de zinc(14).

De acuerdo con diversos estudios realizados en animales, la absorción de zinc ocurre en el intestino delgado, siendo el principal sitio de absorción el yeyuno aunque parece ser que ésta depende del tipo de alimento ingerido, ya que se ha encontrado que tanto el duodeno como el íleon pueden absorber una cantidad considerable del micronutriente; el estómago y el intestino grueso contribuyen poco con la absorción del metal. La siguiente figura muestra los sitios de absorción e intercambio de zinc (14,27,29).

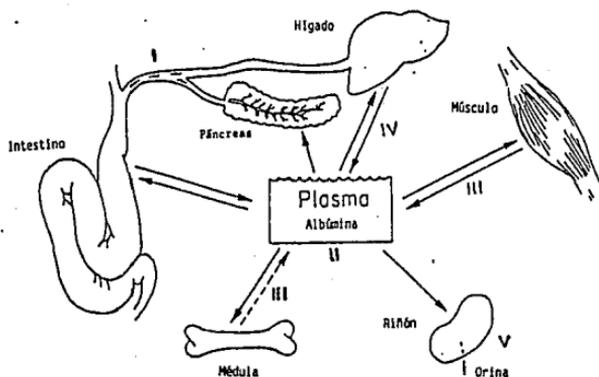


fig 2 Principales fuentes de zinc endógeno y su distribución en el organismo (14).

El zinc endógeno que se encuentra en las secreciones pancreáticas y biliares así como de las células intestinales es vertido en el lumen del intestino delgado (I). De allí es absorbido e incorporado al plasma para ser transportado unido a la albúmina hacia los diferentes órganos (II). Por ejemplo la médula ósea y el músculo representan las principales fuentes de zinc. La probabilidad de que el metal que se encuentra en la médula regrese al plasma se presenta cuando ésta es movilizada para mantener la homeostasis del calcio (III) (14,27).

La asimilación hepática del metal ocurre por medio de un proceso dependiente de energía; una respuesta aguda a infecciones o estrés provoca una reducción de zinc en plasma como consecuencia de su incorporación por el hígado y redistribución dentro de los hepatocitos (IV). El zinc no se excreta en la orina en cantidades apreciables excepto cuando existe una excreción excesiva de nitrógeno provocado por un aumento en el catabolismo muscular (V) (14).

#### *Asimilación celular de zinc en el lumen intestinal*

Al parecer el zinc es transportado a través de las células del intestino delgado por un mecanismo de difusión mediado por acarreadores, esto es unido a uno o más ligandos absorbibles; no se conoce con exactitud la naturaleza química de estos ligandos y puede ser que estos se encuentren sobre las microvellosidades de la superficie de absorción celular para favorecer su asimilación. Las condiciones ácidas o neutras del estómago y el intestino así como la digestión prolongada, afectan la interacción del metal con otros componentes alimenticios que influyen la absorción.

Los ligandos no absorbibles limitan la asimilación del metal; en ocasiones cuando la unión con estos ligandos es muy fuerte, evita que el elemento se transporte como ión libre o unido a otro ligando. La siguiente figura muestra una representación esquemática de como se lleva a cabo la absorción de metales traza por las células del intestino(14).

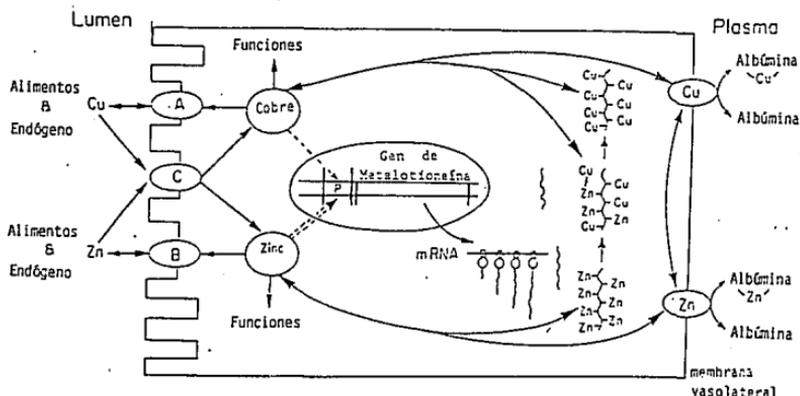


fig 3. Representación esquemática de la célula de la mucosa intestinal y los probables sitios de interacción del cobre y zinc (14).

El zinc y el cobre endógenos y exógenos pueden ser transportados a través de las microvellosidades de la superficie de absorción celular (A y B); pero puede ser que exista un sistema de transporte común o receptores sobre la superficie celular para estos metales (C).

Una vez absorbidos por las células intestinales, estos metales interactúan con el contenido intracelular, si la concentración intracelular de estos nutrientes es elevada ya sea como consecuencia de la administración parenteral o de niveles elevados en los alimentos, el promotor del gen de metalotioneína es activado provocando un aumento en la transcripción del gen (generalmente este promotor es más sensible a los niveles elevados de zinc que de cobre).

Como consecuencia los RNAm de metalotioneína son traducidos y se incrementan los niveles citoplásmicos de polipéptidos de tioneína (líneas onduladas) los cuales se unen a los metales disponibles; parece ser que la afinidad de esta proteína es mayor para el cobre, por lo que se une gran cantidad de este metal, esto provoca que el cobre sea transportado a través de la membrana celular hacia el plasma. Cuando los niveles intracelulares de metalotioneína son elevados, la absorción del zinc se ve disminuida; el zinc y el cobre compiten por el transporte a través de la membrana. En el esquema también puede observarse el flujo de estos nutrientes a través de la capa serosa hacia la mucosa, contribuyendo de esta manera a la secreción endógena de los metales (14).

### *Transporte plasmático*

Aproximadamente de 10-20 % del zinc corporal se encuentra en el plasma y en las células sanguíneas por ejemplo en los eritrocitos, cuyo sitio de unión es la anhidrasa carbónica aunque también puede encontrarse dándole estabilidad a la membrana del mismo. Los leucocitos también contribuyen con la asimilación de elemento sin existir intercambio con el plasma como ocurre con los eritrocitos (14).

El plasma es un medio de transporte metabólicamente activo, debido a que numerosos factores influyen en el transporte de zinc a través de él. El zinc se asocia con las proteínas plasmáticas principalmente albúmina y debido a la gran capacidad que tiene para unirse a este metal, puede evitar que exista transferencia de zinc hacia los tejidos. La cantidad de zinc que es transportada por el plasma está influenciada por la cantidad de zinc ingerido y el estado fisiológico, ya que se ha encontrado que la presencia de endotoxinas disminuye la cantidad de zinc que es transportada hacia los tejidos, de igual forma se ha visto que la interleucina 1(IL-1) afecta la concentración del metal (14).

### *Influencia del estado fisiológico sobre la absorción de zinc*

El metabolismo del zinc se ve afectado por condiciones fisiológicas del organismo tanto humano como animal entre las que se encuentran: la edad, el embarazo y la lactancia (27).

#### **a) Edad**

De acuerdo con varios estudios realizados en modelos murinos, la absorción y retención de zinc son inversamente proporcionales a la edad. La eficiencia en la absorción de los metales durante la fase de recién nacido generalmente es muy grande comparada con otras etapas de desarrollo (27).

#### **b) Embarazo y lactancia**

Durante estos períodos los requerimientos de zinc, así como de otros minerales y nutrientes se ven incrementados como consecuencia del desarrollo fetal y la producción de leche. En el embarazo el zinc también puede ser depositado en tejidos extra-uterinos por ejemplo en el hígado, ésto debido al pronunciado anabolismo que existe durante esta etapa. Los trabajos realizados demuestran que durante la última etapa del embarazo, la capacidad intestinal en ratas preñadas para absorber zinc aumentan como consecuencia del desarrollo exponencial del feto (27).

## 2.5 Excreción de zinc

La excreción de zinc se ve afectada por la nutrición. La eliminación de zinc endógeno por medio del tracto digestivo es de significancia cuantitativa para lograr el balance entre la absorción y las necesidades metabólicas del elemento.

### *Excreción fecal*

Las heces contienen una cantidad variable de zinc, el cual deriva tanto de zinc endógeno como de la fracción no absorbida proveniente de la dieta. La determinación de la cantidad de Zn endógeno del zinc fecal total bajo circunstancias nutricionales normales, requiere de la utilización de marcadores radioactivos. En este sentido, en un estudio realizado con 4 sujetos se determinó el efecto de la administración de cantidades crecientes de zinc (1, 3, 5, 10 mg de isótopos de zinc) sobre la absorción del mismo. Se encontró que cuando los isótopos se administraron en ayunas, la absorción de zinc se vio afectada cuando se excedieron los 5 mg; en cambio cuando los suplementos se administraban con los alimentos la mayor absorción se presentó con la dosis de 1 mg (43). Estos resultados sugiere que durante la absorción del elemento existe una competencia entre el zinc exógeno y el endógeno, este último es secretado en el lumen del tracto gastrointestinal como consecuencia de la alimentación (43).

## ***Excreción urinaria***

Tanto en humanos como en animales sanos la excreción renal de zinc permanece constante a pesar de las grandes fluctuaciones en la ingesta del mismo.

La excreción urinaria de zinc es de aproximadamente 5 a 10  $\mu\text{mol}/\text{día}$ , estas cantidades pueden ser menores si existe un estado de deficiencia crónica de zinc o aumentar cuando las sustancias a las cuales se une el metal también son excretadas en la orina; como es el caso de la excreción de ácidos grasos, aminoácidos, proteínas de bajo peso molecular e incluso algunas drogas y agentes quelantes. En este sentido se han hecho estudios en los cuales personas con una dieta alta en proteínas excretan significativamente más cantidad de zinc que sujetos alimentados con dietas bajas en proteínas, esta respuesta puede ser debida a que existe una diferencia en la ingestión de histidina y cisteína, ya que también se ha visto que estos aminoácidos administrados ya sea por vía oral o parenteral en dosis elevadas, incrementan la pérdida renal del metal (27).

Asimismo la administración de agentes quelantes; los cuales son eliminados a través del tracto urinario, como el EDTA pueden incrementar substancialmente los niveles de zinc en orina. La zincuria también puede presentarse como consecuencia de daños provocados a los tejidos y durante la inanición (27).

### *Excreción y distribución en leche*

La excreción de zinc del cuerpo materno a través de las glándulas mamarias, depende de la cantidad de leche secretada y de la concentración del elemento. Se ha visto que la deficiencia de zinc durante la lactancia no afecta la producción de leche ni la composición de sus nutrientes. Sin embargo la concentración de zinc varía dependiendo de la especie, la etapa de lactancia y el *status* de zinc, aparte de las variaciones individuales. Por ejemplo; la leche humana contiene aproximadamente 1.5 µg de Zn/ml, en cambio la leche de vaca contiene aproximadamente 3 veces más cantidad del micronutriente; esta cantidad disminuye gradualmente durante el período de lactancia tanto en humanos como en animales (27). Se han realizado estudios que demuestran que el calostro de todas las especies está altamente enriquecido con zinc, pero ésta concentración disminuye rápidamente durante su transición a leche normal.

La nutrición afecta notoriamente la concentración del elemento en leche; ésto fue demostrado en un estudio en el cual se alimentaron vacas con una dieta deficiente en zinc y se encontró que la concentración de zinc que inicialmente era de 7 ppm disminuía a 2.3 ppm permaneciendo así durante la fase de depleción y que retornaba a sus niveles normales cuando se les dió una dieta adecuada en zinc (27).

La distribución del zinc en leche también es muy variada dependiendo de la especie, por ejemplo: en la leche de vaca, oveja, cabra y rata, una gran cantidad de este metal se encuentra unido a la caseína. En el humano, la leche contiene una menor cantidad de caseína y el zinc se encuentra presente en el suero de la misma, donde aproximadamente el 10% del zinc total se une a un complejo de bajo peso molecular el cual ha sido identificado como citrato de zinc, aunque también puede encontrarse unido a aminoácidos libres (27).

## *2.6 Zinc y metalotioneínas*

Las metalotioneínas son metaloproteínas que puede ser inducidas por metales, hormonas, etc. Dependiendo de la especie animal y el tejido del cual se aísle, se les ha encontrado unidas a diversos metales, particularmente cadmio, cobre, mercurio y zinc. La caracterización de estas proteínas ha sido realizada a partir de extractos de hígado, de riñón y de intestino.

Las características más sobresalientes de estas proteínas son las siguientes:

- son cadenas polipeptídicas sencillas de 61 aminoácidos.
- tiene la capacidad de unir entre 5 y 7 g átomos/mol de metal.

- 25-30 % de los residuos de aminoácidos son cisteínas; en la proteína nativa no existen enlaces disulfuro y no presenta aminoácidos aromáticos.
- presentan un grado significativo de polimorfismo.
- existen dos principales clases de metalotioneínas denominadas metalotioneína I y II; las cuales difieren ligeramente en su composición de aminoácidos.
- su secuencia de DNA indica que existen más de dos genes de metalotioneínas, esto explica la existencia de las diferentes formas (14).

Con base en estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y estudios previos basados en la estructura primaria de estas proteínas se encontró que los residuos de cisteína son los ligandos a los que se une el metal, y al parecer se sugiere que cada ión se encuentra unido en forma tetraédrica a los grupos tiol. Los estudios de RMN sugieren que 7 átomos de zinc se unen a la molécula de metalotioneína formando dos agrupamientos: uno de 4 átomos (agrupamiento A) y otro de 3 átomos (agrupamiento B).

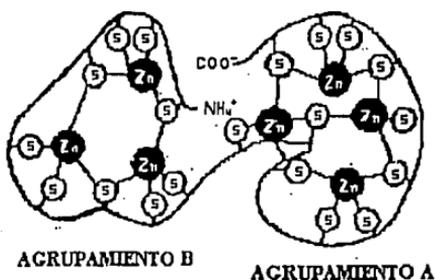


fig. 4 Agrupamientos metálicos de zinc en la molécula de metalotioneína.

### *Biosíntesis de metalotioneínas*

La biosíntesis de metalotioneínas es un proceso muy complejo. Existen varios factores tanto fisiológicos como condiciones experimentales que inducen la síntesis de metalotioneína en hígado. Tabla II.

inductores fisiológicos	inductores experimentales
desarrollo	glucocorticoides
zinc de los alimentos	cadmio
infecciones	tetracloruro de carbono
inanición	cobre
estrés	diabetes
	endotoxinas
	Interleucina-1
	zinc

Tabla II. Factores fisiológicos y condiciones experimentales que provocan la síntesis de metalotioneína (14).

### *Regulación por metales*

La metalotioneína puede ser inducida por algunos metales pesados como: cadmio cobre y zinc. Esto se comprobó en diversos estudios en los cuales la administración de dichos metales a animales de experimentación provocó un aumento en el contenido de metalotioneína hepática principalmente, proponiéndose que esta inducción fué para proteger al organismo de daño celular como consecuencia de la administración del metal. También se encontró que al administrar aminoácidos marcados a animales que habían sido inyectados con metales pesados, éstos se encontraban presentes en la metalotioneína, lo cual indica que la síntesis de *ново* de proteínas está involucrada en tal inducción.

### *Regulación alimenticia*

Como se mencionó la administración de cantidades significativas de zinc por vía parenteral o enteral permite la inducción de metalotioneínas en intestino, hígado, riñón y otros tejidos.

Se ha encontrado también que cuando la dieta se encuentra suplementada con zinc, cobre u otro metal en cantidades elevadas, provoca la inducción de metalotioneínas primeramente en hígado e intestino seguido por el aumento o redistribución del metal en ambos tejidos. Esta respuesta fisiológica ha sido examinada de dos formas:

1) Los cambios agudos en la concentración de zinc en la dieta provocan una alteración en el zinc unido a metalotioneínas hepáticas. En estudios realizados en ratas se encontró que los niveles de metalotioneína son normalmente bajos, sin embargo cuando se administró una dieta deficiente en zinc por un día, se produjo una disminución de los niveles de metalotioneína hasta trazas; cuando se suplementó a estos animales con una dieta adecuada en zinc, incrementó los niveles de metalotioneína y si se administraba nuevamente una dieta baja en zinc los niveles de la proteína se reducían nuevamente.

2) Ahora, si se realiza una depleción por varios días, los niveles de metalotioneínas se reducen, pero al suplementar a los animales por un día con diferentes concentraciones de zinc en la dieta, se restituyen los niveles de metalotioneína proporcionalmente a la suplementación (14).

Estos resultados pueden interpretarse como sigue:

a) La metalotioneína se sintetiza rápidamente para inhibir la acción deleterea del zinc en exceso (destoxificación).

b) La unión del zinc a la metalotioneína es parte de una función intracelular en la cual la proteína unida al metal, actúa como un intermediario o ligando coordinado para ajustar el flujo de zinc hacia el contenido intracelular.

### *Regulación hormonal*

Diversos estudios han demostrado que la expresión del gen de metalotioneína puede ser inducida por hormonas (glucocorticoides), se encontró que estas provocan un aumento en los niveles de RNA mensajero de metalotioneína. Asimismo, se ha visto que la exposición a varios tipos de estrés como son: frío, calor, ejercicio extremo e inhalación de  $\text{CCl}_4$ , producen la inducción de metalotioneína en hígado y riñón; siguiendo con estos estudios se determinó que ésta inducción se debía a controles hormonales a nivel celular, ésto fué comprobado al cultivar células de parénquima de hígado de rata en presencia de glucocorticoides, lo que ocasionó un aumento en la asimilación de zinc y de la síntesis de metalotioneínas y que estos resultados dependían de la dosis de glucocorticoides utilizada (14).

### *Funciones de las metalotioneínas*

Con base en los diversos estudios realizados se ha postulado que las metalotioneínas pueden estar relacionadas principalmente con al menos dos funciones en el metabolismo celular:

1) La destoxificación por metales pesados como cadmio, mercurio, aluminio, etc. y 2) Una función de regulación metabólica, de manera particular para el zinc. Los complejos de zinc-metalotioneína pueden estar involucrados con la duplicación, transcripción, síntesis protéica, degradación y metabolismo energético. Su relación puede ser de manera directa vía interacción con apoproteínas y apoenzimas inactivas o indirecta por regulación de la concentración de zinc libre en el interior de las células (14,8).

### **2.7 Zinc y embarazo**

Resulta una evidencia considerable que el estado nutricional materno durante el embarazo es un factor crítico para el desarrollo embrionario y fetal tanto en humanos como animales. Los estudios realizados durante este período revelan que existen numerosas alteraciones fisiológicas las cuales repercuten en él. Los trastornos encontrados han sido principalmente en el metabolismo de la glucosa como (es caso de hiperglicemia, hiperinsulinemia y baja respuesta a la insulina), disminución en la concentración de albúmina, alteraciones hormonales y en el metabolismo del zinc.

Se ha visto que ratas alimentadas con una dieta deficiente en zinc y seres humanos ingiriendo una dieta marginal en zinc presentan síntomas similares a los que muestran los sujetos diabéticos. También se ha encontrado que conforme el embarazo va

progresando, la concentración de elemento en plasma disminuye gradualmente, en cambio los niveles del mismo en eritrocitos se incrementan, se piensa que esta reducción de los niveles de zinc puede ser consecuencia de la disminución de la concentración de albúmina o de la baja afinidad del metal para unirse a la misma; esta distribución alterada de zinc también puede ser consecuencia de regulaciones hormonales, ya que se ha encontrado que los glucocorticoides y estrógenos alteran la distribución del elemento en tejido; los glucocorticoides incrementan la asimilación hepática de zinc mientras que los estrógenos aumentan su concentración en hígado, eritrocitos, útero y riñón, ésto ocasiona que su concentración en plasma se vea disminuída (46).

Además la excreción urinaria de zinc y glucosa durante el embarazo revela que existe una gran pérdida al término del mismo, ésto puede ser consecuencia de alteraciones en la reabsorción tubular renal (46).

Beach y cols. encontraron que la deficiencia de zinc combinada con el embarazo provoca resultados catastróficos. En los estudios que realizaron utilizando ratas alimentadas con una dieta deficiente en zinc (5ppm) durante el período gestacional, esto provocó en las madres una disminución en la concentración de micronutriente en plasma, desarrollo inadecuado de las glándulas mamarias y disminución en su capacidad de lactación; por lo que respecta a las crías de la primera generación ( $F_1$ ) se observó una disminución en la

respuesta primaria de anticuerpos (células formadoras de anticuerpo, CFA) como consecuencia de la inoculación con glóbulos rojos de carnero (GRC), así como niveles no detectables de inmunoglobulina M (Ig M). Estas alteraciones persistieron durante la segunda (F<sub>2</sub>) y tercera (F<sub>3</sub>) generación, aunque en menor grado, apesar de la restitución con una dieta adecuada en zinc (1,2).

Aunque las disfunciones inmunológicas como consecuencia de la deficiencia prenatal de zinc no han sido demostradas en humanos, trabajos realizados con monos rhesus han mostrado que los primates jóvenes son muy sensibles a la modulación por zinc en la dieta. En estos estudios se investigó la influencia de dietas marginales de zinc (4 µg de Zn/g) administradas durante el embarazo y la lactancia. Se encontró que la cantidad de zinc utilizada en la dieta, no provocó signos de deficiencia de zinc tanto en las madres como en las crías. Sin embargo, ésta carencia del nutriente produjo en ambos (madres e hijos) una reducción significativa en su inmunidad; disminución de los niveles séricos de inmunoglobulinas, baja respuesta a mitógenos y alteración en la función de neutrófilos (quimiotaxis y fagocitosis) (24).

Por su parte Keen *et al* estudiando el efecto de una deficiencia severa de zinc durante el desarrollo de primates a los que se alimentó con dietas moderadamente deficientes (2  $\mu\text{g}$  de Zn/g) y marginales (4  $\mu\text{g}$  de Zn/g) de zinc, encontraron que los animales alimentados con una dieta moderadamente deficiente en zinc durante en desarrollo presentan signos característicos de deficiencia del metal, por otro lado los animales alimentados con dietas marginales en zinc únicamente muestran signos sutiles. Sin embargo, ambos grupos muestran una respuesta inmunológica alterada (25).

## *2.8 Deficiencia de zinc*

Actualmente se considera que la deficiencia de un sólo nutriente e incluso de un sólo elemento químico en la dieta, provocan alteraciones en la respuesta inmunitaria. En este sentido el elemento que ha sido más estudiado es el zinc. Estos efectos de deficiencia o carencia de un sólo nutriente han sido probados utilizando modelos murinos, encontrándose que las deficiencias de zinc tienen efectos adversos inmediatos.

Se han realizado trabajos en los que se ha comprobado que los seres humanos presentan respuestas inmunológicas disminuídas, debido a la ingesta de dietas deficientes en zinc, en este sentido las respuestas más afectadas son: la inmunidad celular, la fagocitosis, el sistema del complemento y la producción de anticuerpos. Estas alteraciones aunadas a otros factores, provocan cambios fisiológicos en el estado nutricional tanto en animales como en individuos.

La deficiencias de zinc generalmente se presentan aunadas a la malnutrición protéico-energética. La hipozinquemia puede deberse a un secuestro del metal llevado a cabo por los hepatocitos, células de la médula y glándulas tínicas, ésto como consecuencia de ciertos padecimientos ya que se sabe que el elemento se encuentra involucrado en reacciones de fase aguda durante las infecciones

generalizadas, traumas o endotoxemia, encontrándose que la concentración de zinc en suero disminuye a la mitad de su valor normal. Se ha visto que una de tantas funciones de la IL-1 es estimular la expresión de genes de metalotioneínas 1 y 2 en los tejidos antes mencionados, la rápida producción intracelular de metalotioneína permite el secuestro durante estas reacciones de fase aguda. De la misma forma la pérdida de nitrógeno corporal que se presenta durante la reacciones febriles y traumatismos severos también ocasiona la pérdida de zinc corporal (3).

La deficiencia de zinc puede ocurrir como una deficiencia aislada como consecuencia de la baja ingestión del micronutriente o por mala absorción del mismo. Aunque la absorción de zinc es un proceso activo, ésta puede verse reducida en el caso del consumo de fitatos y otras fibras las cuales captan iones zinc dentro del tracto intestinal afectando de esta manera la absorción del nutriente.

### *Zinc y sistema inmunitario*

La deficiencia de zinc tiene marcado efecto sobre todos los componentes del sistema inmunológico éstos pueden ser funcionalmente significativos ocasionando un aumento en la susceptibilidad a infecciones por organismos oportunistas.

El sistema inmunológico consta de mecanismos innatos y adquiridos para proteger al organismo de patógenos ambientales. La función de los mecanismos innatos es independiente de la exposición previa del hospedero con el agente infectante, estos mecanismos incluyen barreras mecánicas tales como la piel y las mucosas y componentes celulares (macrófagos, neutrófilos y fagocitos). La influencia de la deficiencia de zinc sobre estas barreras inmunológicas ha recibido poca atención, las consecuencias de la falta de zinc sobre estos mecanismos incluyen lesiones en la piel, lesiones gastrointestinales que provocan cambios degenerativos sobre los enterocitos y daños a las microvellosidades así como alteraciones en la función pulmonar (24).

#### *Efecto sobre los tejidos y células linfoides*

La deficiencia de zinc tiene un gran impacto sobre la anatomía de los tejidos linfoides, dependiendo de la severidad y duración de la deficiencia se puede observar hipoplasia de timo, bazo, nódulos linfáticos, placas de Peyer y otros tejidos linfoides intestinales estos cambios pueden ir progresando y provocar atrofia. La involución tímica involucra las áreas corticales en primera instancia, ocasionando que las poblaciones tanto de linfocitos T como B se vean afectadas por la carencia del elemento, la depleción celular de los nódulos linfáticos involucra principalmente las áreas T dependientes (3,20).

Se conoce que una de las hormonas tímicas, el factor tímico sérico (FTS), que participa en la maduración y diferenciación de los linfocitos T, únicamente se activa cuando se encuentra unido a iones zinc, es decir en forma de timulina, la cual es un nonapéptido producido por las células epiteliales, cuya actividad biológica y antigenicidad dependen de la presencia del metal en la molécula (29).

La falta de zinc ocasiona alteraciones en el número de linfocitos en animales de experimentación. DePasquale-Jardieu y Fraker (16) atribuyen la disminución en el número de células T cooperadoras, a un aumento en la concentración de corticosterona en plasma de 40 a 115 mg /dl en ratones deficientes en zinc. Posteriormente se encontró que aproximadamente la mitad de la cifra de linfocitos T, ocurre antes de que se vean incrementados los valores de esteroides. Sin embargo, estudios subsecuentes indican que los efectos provocados por la falta de zinc son independientes de los requerimientos de glucocorticoides.

En otros trabajos, se encontró que la deficiencia de zinc ocasionó en varias cepas de ratones alteraciones en la actividad de las células NK (de sus siglas en inglés natural killer) algo similar ocurrió en las células T citotóxicas, así como una disminución en el número de células Thy 1.2+ (3,20,44). Recientemente se demostró que los animales alimentados con dietas marginales en zinc mostraron

un cociente normal de células T/células B en el bazo, sin cambios notables en las subpoblaciones de linfocitos que comprenden ambas células, en cambio, cuando se provoca una deficiencia severa del elemento se produjeron alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos T y disminución relativa en el porcentaje de células B (26).

### Efecto sobre la inmunidad humoral

Varios estudios coinciden en que la deficiencia de zinc provoca alteraciones en el número de CFA como respuesta a la inoculación con GRC (19). También se ha visto que existe una severa disminución en los niveles séricos de IgG en pacientes que presentan deficiencia de zinc unida a malnutrición protéico-energética. Se ha encontrado también que la falta de zinc provoca alteraciones en la distribución de inmunoglobulinas, encontrándose disminución en los niveles de IgM, IgG2 e IgA y un marcado aumento en los niveles de IgG1, en respuesta a la inoculación con GRC (3,44,20).

En un estudio realizado por Moulder (34) en el cual se utilizaron ratones seleccionados genéticamente para producir anticuerpos de alta o baja afinidad, al ser sometidos a un tratamiento deficiente en zinc se encontró que la deficiencia de zinc disminuye los niveles en ratones productores de anticuerpos de baja afinidad, pero no su

afinidad por los antígenos T dependientes. En los animales productores de anticuerpos de alta afinidad, no se afectaron los niveles ni la afinidad de manera significativa para estos antígenos. Por lo que respecta a los antígenos T independientes, la afinidad y los niveles de los anticuerpos tanto de alta como de baja afinidad no se afectan por la falta de zinc. También se encontró que el número de linfocitos B no se ve afectado por la carencia del elemento en ambos grupos de animales.

Como se ha mencionado la respuesta secundaria a GRC se reduce substancialmente cuando las inoculaciones se realizan después de iniciada la deficiencia del elemento, sin embargo se conoce poco acerca de los efectos que causa la falta de zinc sobre la respuesta de memoria. En este sentido, DePasquale-Jardieu y Fraker determinaron el efecto que produce la deficiencia de zinc sobre la respuesta de memoria de ratones que fueron inoculados con el antígeno antes de comenzar el período de deficiencia de zinc y encontraron que la falta de elemento destruye una porción substancial de las células de memoria, a pesar de que exista una posterior suplementación con el micronutriente (15).

### Efecto sobre la inmunidad mediada por células

Los linfocitos de pacientes deficientes en zinc muestran una marcada disminución en la respuesta proliferativa a mitógenos y antígenos la cual puede ser corregida al tratarlos con una terapia con zinc. Se ha visto una disminución en la respuesta proliferativa in vitro a mitógenos, tanto de linfocitos T y B obtenidos a partir de bazo, timo y sangre periférica en modelos murinos deficientes en zinc, comparados con los controles (3,20,44). Por otro lado se estudió la capacidad funcional de linfocitos residuales provenientes de ratones deficientes en zinc y se encontró que estas células al ser enfrentadas a mitógenos mostraron una respuesta proliferativa normal y generaron una cantidad adecuada de IL-2, asimismo su respuesta humoral fué similar a la de los animales control (suplementados con una dieta adecuada en zinc). Ésto indica que los linfocitos residuales de ratones deficientes en zinc son capaces de llevar a cabo varios procesos inmunológicos fundamentales (13).

### Efecto sobre la hipersensibilidad tardía

Se han realizado estudios en los que se ha visto que la falta de zinc provoca alteraciones en la respuesta de hipersensibilidad tardía a diversos antígenos (20). Se encontró que la administración de una dieta conteniendo 0.6 mg de Zn/g durante 26 días a ratones sanos

ocasionó que estos animales respondieran pobremente a la sensibilización con dinitrofluorobenceno; en cambio, cuando los animales fueron tratados con una dieta adecuada en zinc, mostraron una respuesta de hipersensibilidad similar a la de los controles (19).

### Efecto sobre la función de células fagocíticas

La falta de zinc ocasiona alteraciones en la quimiotaxis tanto de monocitos como de neutrófilos. También estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado la importancia que tiene el zinc sobre la permeabilidad de la membrana y la actividad fagocítica. Se encontró que las cantidades elevadas de zinc inhiben el flujo de iones a través de la membrana de macrófagos y neutrófilos. Ésto se asoció con la disminución en el consumo de oxígeno en neutrófilos, así como alteraciones en su capacidad fagocítica y bactericida. Por otra parte, concentraciones bajas de zinc en plasma restauran las alteraciones antes mencionadas (3).

### Patogénesis de la deficiencia de zinc

Existen varios factores que contribuyen a provocar un estado de deficiencia de zinc entre éstos se encuentran:

a) el incremento en la pérdida de zinc. Durante el catabolismo, la excreción de zinc se ve incrementada en relación al grado de catabolismo evaluado como la excreción urinaria de nitrógeno y creatinina. En estados severos de catabolismo la excreción de zinc es de 60-120 mol/día, el cual deriva del rompimiento del músculo esquelético rico en zinc.

b) aumento en el requerimiento de zinc. Los pacientes malnutridos necesitan restaurar su masa muscular ésto implica un incremento de tejido y como consecuencia demanda de zinc.

c) suplementación inadecuada. Algunos suplementos alimenticios como hidrolizados protéicos y soluciones de aminoácidos, contienen bajas concentraciones de zinc, las cuales no son capaces de mantener la homeostasis del elemento, resultando esto evidente por la disminución de la concentración de zinc en plasma (29).

Se ha encontrado que los síntomas característicos de la deficiencia de zinc pueden aparecer entre 3 semanas y 7 meses, éstos son: diarrea, dermatitis y alteraciones psicológicas. Los cambios mentales que se presentan son: irritabilidad, apatía, depresión y confusión. La dermatitis es la manifestación más común, es el síntoma más específico lo que permite usarla como diagnóstico.

Las lesiones que se observan en la piel son similares a las que ocurren en la acrodermatitis enteropática (enfermedad hereditaria, en la cual existe una deficiencia de zinc, se piensa que es provocada por una mala absorción del nutriente). La dermatitis es precedida por prurito, provocando lesiones vesículopustulares y eritematosas en la cara y otras partes del cuerpo. Las biopsias de piel que se han tomado muestran hiperqueratosis e infiltración de células polimorfonucleares.

Además puede presentarse una pronunciada pérdida de cabello, posterior a la aparición de la dermatitis, la cual puede persistir e incluso progresar hasta la pérdida total a pesar de la suplementación con zinc (29).

#### Diagnóstico de la deficiencia de zinc

El síndrome de deficiencia de zinc puede estar acompañado por una disminución en los niveles de fosfatasa alcalina sérica, aunque también pueden presentarse niveles normales; algo similar ocurre con la concentración sérica del elemento. La excreción urinaria del elemento disminuye considerablemente; por otro lado, la determinación de la concentración de zinc en las células (leucocitos) puede aprovecharse para el diagnóstico (29).

## Terapia de la deficiencia de zinc

Los síntomas provocados por la falta de zinc pueden ser revertidos entre el segundo y tercer día de terapia con una cantidad adecuada de zinc; las lesiones ocasionadas en la piel por la carencia del metal desaparecen en 10 días aproximadamente. Por lo que respecta a la pérdida de cabello, ésta es poco revertida y ocurre mucho tiempo después de realizada la suplementación. Las dosis recomendadas para ser usadas en adultos son de 765 a 2100 mmol/día por vía oral y de 75 a 300 mmol/día por vía intravenosa, en niños las dosis recomendadas son de 90 a 350 mmol/día por vía oral. En personas con nutrición parenteral, siempre deben darse suplementos de zinc. Una cantidad de 70 a 100 mmol/día, resultan suficientes a menos que se presenten grandes pérdidas a través del tracto gastrointestinal (fistulas, succión gástrica, etc) o por medio de la orina, como consecuencia de un catabolismo severo (29).

## 2.9 Suplementación con zinc

Las observaciones realizadas en los estados de deficiencia de zinc han permitido optar por la administración de suplementos de este metal para prevenir la variedad de alteraciones ocasionadas por su carencia. La administración de dosis farmacológicas de zinc pueden resultar inmunoestimuladoras en el caso de una deficiencia fundamental de zinc; pero también se ha visto que puede producirse una disminución en la concentración sérica de lipoproteínas de alta densidad (HDL), la cual se asocia con un aumento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares. La suplementación con zinc provoca modificaciones en diversos índices biológicos tales como: concentración de zinc en suero, orina, pelo, glóbulos rojos, leucocitos o enzimas y se ha encontrado que las variaciones en estos índices correlacionan con efectos benéficos (39).

Se ha visto que los procesos inflamatorios modifican el *status* de zinc de manera diferente al observado en sujetos deficientes en este micronutriente; en este caso en particular, se presenta una distribución de zinc caracterizada por una disminución de su concentración en plasma y un aumento del mismo en células mononucleares (CMN), orina y fluido sinovial, lo cual concuerda con los índices inflamatorios.

Por otro lado, en un estudio realizado en personas con enfermedad reumática, la suplementación con zinc no provocó ningún efecto benéfico medible a través de los marcadores seleccionados (*status* inflamatorio mediante la determinación de proteína C reactiva PCR y actividad de la enfermedad), sólo se presentó un incremento no significativo en los niveles plasmáticos, asimismo la concentración de zinc en glóbulos rojos y blancos no se vió modificada (39).

Durante el envejecimiento existe una considerable pérdida de la función inmunológica y del estado de zinc, así como un incremento en la morbilidad debido a las infecciones. Diversos autores han comprobado la hipótesis de que la suplementación con zinc puede restablecer las funciones inmunológicas de pacientes seniles (44). En este sentido se encontró que la administración de dosis moderadas de zinc ocasionaron un efecto favorable en el *status* nutricional e inmunológico de personas seniles que presentaban deficiencia marginal de zinc, sin provocar alteraciones en la relación de lípidos LDL/HDL (lipoproteínas de baja densidad/ lipoproteínas de alta densidad) (7).

Por otra parte Chandra (10), encontró que la suplementación durante un año con cantidades fisiológicas de zinc y otros micronutrientes, a una población aparentemente sana de individuos seniles, mejora su inmunidad y disminuye el riesgo a infecciones en este período. Por otra parte, los estudios realizados por Bogden (6)

mostraron que la suplementación con el micronutriente no provoca ningún efecto benéfico en la inmunidad de estas personas, esta contradicción de resultados tal vez sea debida a la edad de los individuos, a su estado de salud así como a la dosis y duración del tratamiento.

Se han realizado estudios de suplementación en niños provenientes de una región endémica para la ingestión subóptima de micronutrientes, se encontró que la influencia de la administración de zinc y vitamina A sobre la respuesta a mitógenos (concanavalina A y toxoide tetánico) no fue significativa; en cambio se obtuvo una respuesta elevada en contra del PPD (derivado proteico purificado), lo que sugiere que el incremento en la asimilación de estos micronutrientes puede resultar benéfico para estos niños que viven en regiones poco privilegiadas (28).

Lo anterior sugiere que cantidades moderadas de zinc pueden ser utilizadas sin riesgo alguno, sin embargo la administración de cantidades elevadas por períodos prolongados, pueden provocar alteraciones en el sistema inmunológico del organismo expuesto (9). De igual forma el suplemento utilizado puede mejorar o afectar la respuesta inmunitaria; en este sentido se estudió el efecto de la administración de dietilditiocarbamato de zinc sobre la respuesta a mitógenos de células T murinas y sus efectos inmunotóxicos, se

encontró que este compuesto es capaz de inhibir la respuesta proliferativa de células T y provocar citotoxicidad en las células esplénicas, en contraste con los efectos que ocasiona la administración de dietilditiocarbamato de sodio, el cual es un inmunopotenciador (40).

## 2.10 Exceso de zinc

Por mucho tiempo las investigaciones en nutrición sobre el zinc se habían enfocado al papel esencial que desempeña en el organismo. En muchos estudios se examinan las consecuencias que provoca la falta de zinc sobre el crecimiento, desarrollo, salud y prevalencia de la deficiencia. La atención ha sido poca hacia las propiedades tóxicas del metal fuera de considerarlo como un riesgo industrial por la inhalación de emanaciones tóxicas o como consecuencia de contaminación grave de un medio localizado (18).

El zinc ha sido considerado como un suplemento no tóxico, particularmente cuando se ingiere por vía oral; de hecho la mayor parte de las revisiones indican que tanto los animales como los seres humanos presentan una tolerancia considerable a la ingesta de cantidades elevadas del elemento. Sin embargo se pueden presentar algunos síntomas como: náuseas, vómito, letargia, fatiga cuando se ingieren grandes cantidades del micronutriente; también se ha visto que puede inducirse una deficiencia de cobre cuando se ingiere 10 veces más cantidad que la dosis recomendada, provocando una función inmunológica alterada, así como efectos adversos en la relación LDL/HDL (18).

En seres humanos, el consumo de zinc en un rango de 100 a 300 mg es común y se utiliza para tratar algunos padecimientos, sin embargo la administración de estas cantidades por períodos prolongados ocasiona graves alteraciones en el organismo, principalmente en el sistema inmunológico y en el perfil de lípidos de la sangre, las cuales se vuelven reversibles cuando cesa el tratamiento con este micronutriente.

En este sentido se encontró que cuando se sometieron once voluntarios a un tratamiento con 300 mg de Zn/día, durante seis semanas, presentaban marcada depresión de algunos indicadores de la respuesta inmunitaria (índice de proliferación de linfocitos, migración quimiotáctica e ingestión bacteriana). En estos sujetos también se observó un aumento en LDL y una disminución en HDL, los reportes sobre alteraciones en los perfiles de lipoproteínas están ligados en alguna forma con un desarreglo en el metabolismo del cobre, como consecuencia de la suplementación con zinc (18).

En otro estudio realizado por Chandra (9) se encontraron resultados similares al administrar una dosis de 150 mg de zinc dos veces al día durante seis semanas, a adultos sanos; la evaluación realizada al inicio del tratamiento mostró un ligero aumento en la respuesta a mitógenos, lo que refleja el potencial mitogénico del metal, posteriormente ésta disminuyó al igual que la función de las células polimorfonucleares; asimismo el perfil lipídico también se vio

afectado. Lo anterior muestra las diversas consecuencias adversas de la administración de dosis farmacológicas de zinc.

En diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se ha observado, que el exceso de zinc es capaz de reducir los distintos tipos de toxicidad mediada por células (T y NK) y también puede afectar el desarrollo del sistema inmunitario. En modelos murinos la exposición a una ingesta excesiva de zinc (2000 ppm) durante los períodos que comprendieron la gestación, la lactancia y el destete, ocasionó una disminución en el número de CFA, sin alterar el porcentaje de células B ni la respuesta a mitógenos. El exceso de zinc en estas etapas provocó además una deficiencia secundaria de minerales, principalmente cobre, manifestándose en forma de acromotriquia y disminución en los niveles séricos de cobre y hematocrito. Ésto indica que el sistema inmunitario es especialmente sensible al elemento durante la ontogénia (35).

Las cantidades elevadas de zinc (5000 ppm), en la dieta de ratones provocan una reducción significativa en la respuesta citotóxica en contra de células tumorales. Al parecer en algunas ocasiones el zinc en exceso tiende a acumularse en algunos tejidos, según se ha visto en estudio realizados en aves (30) y en estudios previos realizados en nuestro laboratorio.

## 2.11 Zinc "in vitro"

Existen varias sustancias conocidas como lectinas o fitomitoógenos, que tienen la capacidad de inducir la transformación blastoide y la mitosis en los linfocitos de forma similar a un antígeno, entre las que se encuentran la fitohemaglutinina (PHA) y la concanavalina A (Con A); asimismo, los extractos bacterianos como el derivado protéico purificado (PPD) y filtrados estafilocóccicos producen el mismo efecto. Sin embargo se ha encontrado que los iones de zinc y de otros metales también pueden estimular la síntesis de DNA en los cultivos de linfocitos tanto de animales como humanos.

Los primeros trabajos acerca de la administración *in vitro* de zinc a cultivos celulares, fueron realizados por Rühl y Berger; ellos trabajaron con linfocitos de sangre periférica de individuos sanos y encontraron que el zinc *per se*, estimulaba e incrementaba la síntesis de ácidos nucléicos de los linfocitos, así como la transformación blastoide; ésto fue posible utilizando pequeñas concentraciones del elemento (0.1mM). Estudiando el efecto de otros cationes divalentes encontraron que el mercurio también estimula la síntesis de DNA en los linfocitos; sin embargo, metales como calcio y magnesio no provocan efecto alguno sobre dicha síntesis, mientras que manganeso, cobalto, cadmio y cobre entre otros, producen un efecto inhibitor. Estos investigadores encontraron que la síntesis de ácidos

nucléicos y la transformación blastoide se presentó entre el 2do y 3er día de cultivo, obteniéndose una respuesta máxima al 6o día. En estos estudios también encontraron que la cinética de la síntesis de DNA de los linfocitos estimulados con el metal, fue similar a la que se presenta en una estimulación antigénica, tanto en tiempo como en magnitud de la respuesta (5).

La administración *in vitro* de sales de zinc ( $ZnCl_2$  principalmente) a los cultivos de células humanas de sangre periférica y de animales de experimentación, puede modificar tanto la respuesta inmunológica celular como humoral. En este sentido, Hart, encontró que la administración de cloruro de zinc en un rango muy estrecho de concentración, resultó ser mitogénico para las células de nódulo linfático de hamster, sin embargo tuvo poco efecto sobre esplenocitos y timocitos. La estimulación máxima ocurrió con la concentración de  $10^{-5}$  M; también encontró un incremento en la estimulación con lipopolisacáridos, pero con sulfato de dextrán y concanavalina A (Con A) no obtuvo respuesta significativa (22).

Se han realizado experimentos en los cuales la adición de un agente quelante como es el caso del EDTA en el cultivo celular, ocasiona que la respuesta proliferativa de linfocitos T principalmente, estimulados con PHA o Con A, se vea inhibida por el secuestro de elementos divalentes, también se observó una disminución en el porcentaje de células viables; este efecto resultó ser reversible

cuando se adicionó zinc al cultivo; en este experimento no se observó alteración en la repuesta mitogénica de células B, lo cual sugiere que este ión es necesario para la actividad mitogénica de células T (53).

Por otra parte se ha visto que el zinc tiene un efecto en la respuesta proliferativa de células esplénicas frente a mitógenos policlonales. Se encontró que la administración de  $10^{-4}$  M de ZnCl<sub>2</sub>, inhibe la proliferación de linfocitos de ratones C57BL/6 (bajos respondedores); en cambio concentraciones de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  M, no modificaron la respuesta proliferativa con dosis subóptimas de mitógeno; sin embargo incrementaron la síntesis de DNA en los cultivos estimulados con grandes dosis de Con A y PHA, las cuales son supraóptimas para estos animales e inhiben la proliferación en los cultivos de células esplénicas, de esta cepa. Por otro lado se encontró que la adición de zinc a los cultivos celulares de ratones BALB/c (altos respondedores), no provocó alguna modificación en su respuesta a estos mitógenos (32).

En otros estudios se ha visto que los efectos inmunopotenciadores e inmunosupresores inducidos por los metales pesados, ocasionan fenómenos inmunopatológicos en numerosos tejidos. En muchos casos la alteración en la respuesta inmunológica esta relacionada con la toxicidad de los metales, por ejemplo: el mercurio es causante de enfermedades renales, se ha visto que

algunas de las condiciones patológicas de esta enfermedad son debidas a complejos inmunes o autoanticuerpos; el mercurio, el plomo, el cadmio, y el cobalto han mostrado efectos inmunosupresores *in vivo*; sin embargo, se ha reportado que estos metales también incrementan la proliferación de linfocitos *in vitro*. En este sentido la capacidad del zinc, plomo y níquel principalmente, para modular la respuesta inmunológica ha sido ampliamente estudiada (31,47).

En un estudio realizado por Lawrence (31), en relación a los efectos que producen los metales pesados sobre la respuesta primaria de anticuerpos *in vitro*, se encontró que varios de los metales ensayados tienen efectos inmunosupresores sobre la producción de anticuerpos, el metal que mostró un mayor efecto inhibitorio fué el mercurio, los metales que presentaron un efecto menor fueron estaño y zinc. Observó que sólo las células estimuladas con plomo y níquel mostraron un aumento en la respuesta de CFA y en la proliferación de linfocitos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) y 2 mercaptoetanol (2-ME).

Algunos metales son capaces de modular *in vitro* la presentación antigénica, ésto fue posible estudiarlo utilizando un sistema para ovoalbumina; en el cual fueron probados numerosos metales usando concentraciones de 0.01y 0.1 mM, las cuales fueron

adicionadas al ensayo de cocultivo (que contenía células presentadoras de antígeno y la línea de células T más ovoalbumina). Los metales que presentaron efectos inhibitorios fueron de mayor a menor: cadmio, cobre, plomo y zinc sobre la producción de IL-2; por otro lado metales como cobalto y cromo no mostraron ningún efecto mientras que el níquel incrementó la producción de IL-2 (45).

Por otro lado Warner (47,48,49) estudió la capacidad de los metales plomo, níquel y zinc para modular la respuesta de linfocitos murinos *in vitro* y encontró que los cultivos suplementados con 0.1 mM de plomo y níquel muestran aumento en el número de CFA, mientras que a esa misma concentración, el zinc tuvo efectos inhibitorios sobre esta respuesta. Observó también que estos metales (principalmente zinc) eran capaces de inducir la proliferación de linfocitos esplénicos, la cual se determinó por la incorporación de timidina tritiada y autorradiografía. Además demostró que para obtener una máxima respuesta proliferativa se requirió la presencia de células T y de células Ia<sup>+</sup>. Al realizar el análisis fenotípico de la superficie celular de esplenocitos estimulados con la concentración óptima del metal (0.1 mM) encontró aumento en el crecimiento y longevidad de las células T; se vio también que el tipo de células que prolifera en respuesta a la estimulación con estos metales son las células Thy-1.2<sup>+</sup> principalmente, ya que también inducen la entrada

al ciclo celular en células L3T4<sup>+</sup> y Lyt-2<sup>+</sup>. La utilización de anticuerpos monoclonales en contra de éstas y otras células, inhibió la proliferación inducida por los metales. Estos metales también son capaces de inducir la producción de IL-2.

Se ha visto que en los cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica estimulados unicamente con ZnCl<sub>2</sub>, en una concentración final de 0.1 mM, este metal fue capaz de inducir *per se* la aparición de receptores para IL-2 (IL-2R) y receptores para transferrina (TrR) en la superficie celular; cuando se realizó la incubación con anticuerpos monoclonales en contra del IL-2R, la incorporación de timidina tritiada fué inhibida. Por otro lado, la adición de IL-2 exógena a los cultivos estimulados con zinc, no incrementó la incorporación de timidina. Cuando este metal se adicionó a los cultivos estimulados con diferentes dosis de Con A la síntesis de DNA se vió aumentada en un 50 % aproximadamente (33).

Es bien sabido que el envejecimiento, se acompaña de una disminución progresiva de las funciones inmunológicas. En el ratón estos cambios se hacen evidentes entre los 10 y 12 meses de edad siendo máximos a los 24 meses, aunque no en todos los individuos. Las alteraciones que se presentan durante el envejecimiento afectan la producción de anticuerpos, tanto de antígenos T dependientes como T independientes, la respuesta a mitógenos y el desarrollo de células T citotóxicas y NK.

En este sentido se ha visto que la adición de zinc a cultivos de linfocitos procedentes de ratones seniles inmunodeprimidos restituye la capacidad de estas células para generar una respuesta en contra de GRC. Se encontró que este incremento provocado por el zinc depende de la edad e involucra los estadios de activación temprana para la formación de anticuerpos (51).

Estudios posteriores ha mostrado que el zinc produce un máximo efecto cuando es adicionado a los cultivos en las primeras 24 horas; se encontró que los sobrenadantes de estos cultivos contienen factores solubles no dializables, los cuales al ser adicionados a los cultivos de células de animales seniles ocasionaron un incremento en la producción de anticuerpos. Los ensayos realizados para diferentes factores solubles mostraron que los niveles de IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos suplementados con zinc no se ven afectados. Sin embargo, los niveles de IL-1 en estos sobrenadantes aumentaron en un 300% comparados con los cultivos no suplementados con zinc. También se vio que la adición de zinc a cultivos de células de animales seniles estimuladas con Con A, incrementó la producción de IL-4 en estas células (51).

Se ha visto que la producción y la respuesta a IL-2 por parte de las células T, tanto de ratones jóvenes como longevos es inhibida por concentraciones de zinc que generalmente incrementan la producción de anticuerpos, lo que sugiere que los efectos inmunorestauradores del zinc en los cultivos de linfocitos de animales seniles son independientes de la IL-2 y que la disminución en la producción de anticuerpos por parte de estos ratones como consecuencia de la edad, no esta relacionada con cambios en la producción de IL-2. Por otra parte, la suplementación de los cultivos de células tanto de animales jóvenes como longevos, con zinc; provocó un aumento en los niveles de IL-1, asimismo la actividad de la IL-4 también se favorece con la presencia del metal (52).

En otros estudios se ha visto que la administración de zinc a cultivos de células humanas de sangre periférica estimula la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF), así como la secreción de IL-1 $\beta$ , sin embargo el zinc *in vitro* no tuvo efecto sobre la liberación de IL-6. En este mismo estudio, cuando al cultivo celular se adicionaron LPS, se encontró que la liberación de estas citocinas también se estimulaba. Por lo que se propuso que el zinc juega un papel importante en la secreción de citocinas por parte de leucocitos humanos (42).

### 3 OBJETIVOS

Investigar el efecto de la adición de un inmunomodulador no tóxico como el zinc en el cultivo de linfocitos esplénicos de ratones en diferentes etapas del desarrollo, a los que se les administra un suplemento del metal en el agua de bebida durante los períodos de gestación, lactancia y posdestete (21 y 42 días de edad)

Estudiar el efecto mitogénico del zinc sobre linfocitos esplénicos de animales en diferentes etapas del desarrollo ontogénico tratados *in vivo* con el micronutriente.

Estudiar el efecto de la administración del metal *in vitro* sobre linfocitos estimulados con concanavalina A, provenientes de ratones suplementados *in vivo* con el metal.

Determinar como se distribuye el elemento en el organismo como consecuencia de la suplementación.

## 4 MATERIAL Y METODOS

### ***Animales***

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/cAnN que fueron albergados en el bioterio de la Facultad de Química, a los cuales se les administró agua de bebida y alimento *ad libitum*.

### ***Diseño experimental***

Se realizaron las cruces de los animales dividiéndolos en grupos, desde ese momento recibieron tratamiento con un suplemento de zinc (acetato de zinc, Mallinckrodt No. cat. 8740-03) en dosis de 500 y 1000 ppm, administradas en el agua de bebida durante las etapas de gestación, lactancia y destete, en la secuencia de I-500/500, II-1000/1000, III-500/500/500 y IV-1000/1000/1000, con sus respectivos controles (Tabla I). Los animales permanecieron en las mismas condiciones hasta el momento del experimento.

GRUPO	ZINC "IN VIVO" EN PPM			ZINC "IN VITRO" $10^{-4}$ M
	GESTACION 21 días	LACTANCIA 21 días	DESTETE 21 días	
I	500	500	—	+
II	1000	1000	—	+
control	0	0	—	+
III	500	500	500	+
IV	1000	1000	1000	+
control	0	0	0	+

Tabla I. Grupos de animales y periodos durante los cuales permanecieron en tratamiento. A los 21 y 42 días de edad que corresponden a los periodos de lactancia y destete respectivamente, se obtuvieron las células esplénicas y se enfrentaron a 0.1 mM de zinc como mitógeno.

### ***Ensayos de proliferación celular***

Cuando los animales cumplieron las edades correspondientes se les extrajeron los bazo en condiciones estériles y se evaluó la respuesta inmunológica celular.

### ***Medio de cultivo***

Se utilizó medio RPMI 1640 (HyClone, No. cat B-0304-AX), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma, Chem. No. cat F-2442), L-glutamina 200mM (Microlab), aminoácidos no esenciales al 0.05% (Microlab), piruvato de sodio al 0.05% (Microlab), penicilina-estreptomocina al 0.1% (HyClone, No. cat B-3001-D-P).

### ***Efecto del zinc como mitógeno***

Para estudiar el efecto del zinc como mitógeno y determinar la concentración óptima que provoque el máximo efecto, se realizó una curva dosis-respuesta utilizando diversas concentraciones del metal. Las concentraciones que se probaron fueron de  $5 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-7}$  M. El cultivo se realizó en presencia de 2-mercaptoetanol (2-ME Merck art. 805740) en una concentración de  $5 \times 10^{-5}$  M.

Las condiciones en las que se llevó a cabo el cultivo fueron las siguientes: se extrajeron los bazos en condiciones de esterilidad y se colocaron en 5 ml de solución salina balanceada (BSS), se perfundieron para obtener las células. Estas se lavaron 3 veces por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, se ajustaron a una concentración de  $5 \times 10^8$  células/ml y se depositaron por cuadruplicado en una microplaca de 96 pozos (Costar No. cat. 3596) 100  $\mu$ l de la suspensión celular y 100  $\mu$ l de medio de cultivo condimentado conteniendo 2-ME. Finalmente se adicionaron 10 o 20  $\mu$ l de cada solución de zinc (anexo I). El cultivo se incubó en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  y 37°C durante 120 h; 20 h antes de finalizar el período de incubación, las células fueron pulsadas con 1  $\mu$ Ci de timidina tritiada (Dupont NET-027) adicionada en un volumen de 10  $\mu$ l/pozo.

Las células se recuperaron con un cosechador de células (Nunc inter med 8) sobre tiras de papel de fibra de vidrio (Nunc N 1-73164) que se colocaron en viales con líquido de centelleo; ésto para determinar la cantidad de timidina incorporada al DNA mediante un contador de centelleo (Beckman LS 6000 SE), los resultados se reportan en cuentas por minuto (cpm).

***Efecto mitógeno del zinc sobre las células de animales tratados "in vivo" con el micronutriente***

A los 21 y 42 días de edad se extrajeron los bazos de los animales tratados "in vivo" con el metal y se obtuvieron las células esplénicas, estas se ajustaron a una concentración de  $5 \times 10^6$ , 100  $\mu$ l de la suspensión celular fueron depositados por cuadruplicado en una placa de 96 pozos, posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ l de medio de cultivo conteniendo 2-ME (basales). Para evaluar el efecto mitógeno del zinc sobre estas células se adicionaron 20  $\mu$ l del elemento en la concentración óptima (estimuladas). Las células se incubaron y cosecharon en las condiciones descritas en el ensayo anterior.

### **Curva dosis-respuesta a concanavalina A**

Para determinar la concentración óptima de concanavalina A (Con A Sigma, Chem. No. cat c-7275) con la que se obtuvo la máxima respuesta proliferativa, se realizó una curva dosis respuesta con 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de mitógeno, las cuales se adicionaron en un volumen de 100  $\mu\text{l}$  a la suspensión de células esplénicas ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml contenidas en el mismo volumen (estimuladas), además de su basal (100  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular y 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo); las muestras se trabajaron por cuadruplicado en una microplaca de 96 pozos.

El ensayo se realizó en condiciones estándar de cultivo para lo cual, las células se incubaron en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  y  $37^\circ\text{C}$  durante 72 h; 20 h antes de finalizar el cultivo las células fueron pulsadas con  $1\mu\text{Ci}$  de timidina tritiada adicionada en un volumen de 10  $\mu\text{l/pozo}$ . La cosecha de las células y la lectura de los resultados se realizó en condiciones estándar para los ensayos de proliferación.

### **Efecto del zinc sobre la respuesta mitogénica a Con A**

Para observar el efecto que produce el zinc administrado *in vitro* sobre la respuesta de linfocitos esplénicos estimulados con el mitógeno Con A, se realizó una curva utilizando diversas concentraciones de zinc en un rango de  $0.5 \times 10^{-3}$  a  $0.5 \times 10^{-6}$  M.

Se depositaron por pozo 100  $\mu$ l de la suspensión celular y se estimularon con el mismo volumen de Con A en la concentración óptima y se adicionaron 10 o 20  $\mu$ l de cada solución de zinc. El cultivo se realizó en las mismas condiciones estándar para la curva de Con A.

***Ensayo de proliferación celular de animales tratados con zinc "in vivo" e "in vitro"***

Los bazo se extrajeron en condiciones de esterilidad y colocados en solución salina balanceada (BSS) se perfundieron con 5 ml de BSS para obtener las células. Estas se lavaron 3 veces por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml; 100  $\mu$ l de la suspensión fueron depositados por cuadruplicado en una microplaca de 96 pozos, en seguida se adicionaron 100  $\mu$ l de medio de cultivo (basales) o Con A ajustada a la concentración óptima (estimulados). Para evaluar el efecto del zinc "in vitro", tanto a las células basales como las estimuladas se les adicionó 20  $\mu$ l de la solución de zinc en la concentración óptima. Las células se incubaron y cosecharon en condiciones estándar de cultivo.

### ***Determinación de zinc en tejidos y plasma***

Se determinó en cada grupo la concentración de zinc en timo, hígado y plasma.

Cuando los ratones cumplieron las edades correspondientes (21 y 42 días de edad) se les practicó un sangrado del seno infra orbital utilizando EDTA como anticoagulante para obtener el plasma, los plasmas de 4 animales se mezclaron y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para analizarlos posteriormente. Estos animales se sacrificaron por dislocación cervical y se procedió a extirpar el timo y el hígado.

El plasma y los órganos a peso seco se digirieron con una mezcla de ácido/peróxido; las muestras se analizaron mediante espectrofotometría de absorción atómica para determinar la concentración de zinc

La digestión del timo se realizó con los órganos de 5 animales. Mientras que el hígado se digirió como la mezcla de 0.1 g de tejido/ratón, de 5 animales (anexo II).

### ***Análisis estadístico***

Las medias se compararon con un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías.

## 5 RESULTADOS

### Efecto mitogénico del zinc

Estudios previos han indicado que el zinc *per se* puede resultar mitogénico cuando es adicionado a los cultivos tanto de linfocitos de sangre periférica como de linfocitos esplénicos. Para comprobar este efecto se realizó una curva utilizando diversas concentraciones del elemento en un rango de  $5 \times 10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M de  $ZnCl_2$  en presencia de 2-ME ( $5 \times 10^{-5}$  M) durante 120 h.

En la gráfica No. 1 se muestran los promedios de 4 experimentos y en ella se puede observar que la respuesta proliferativa máxima se presenta con la concentración de  $10^{-4}$  M (0.1 mM) de Zn. Por otra parte observamos que concentraciones mayores a 0.1 mM resultan tóxicas para las células en tanto que con concentraciones menores, el estímulo resultó similar a los controles sin zinc (basal). La concentración óptima de zinc se utilizó en los ensayos posteriores.

Se realizó el tratamiento estadístico (ANOVA de una vía) de los resultados obtenidos y se encontró que la concentración óptima presenta una  $p < 0.05$  respecto a las demás concentraciones.

## **Efecto del zinc como mitógeno sobre linfocitos esplénicos procedentes de ratones suplementados *in vivo* con el metal**

Una vez que se encontró la concentración óptima de zinc es decir, que mostró el máximo efecto estimulador sobre los linfocitos de animales sin tratamiento, se evaluó en las mismas condiciones de cultivo el efecto mitogénico del elemento en la concentración 0.1 mM sobre linfocitos de ratones tratados *in vivo* con el micronutriente.

En las gráficas No. 2 y 3 se observa que el tratamiento *in vivo* con el metal inhibió la proliferación debida a la acción del zinc como mitógeno en linfocitos esplénicos tanto en los animales de 21 como en los de 42 días de edad. Este efecto resultó más pronunciado en el grupo IV tratado con 1000 ppm de Zn.

Se observa en el siguiente cuadro (Cuadro I) que la proliferación basal a los 21 días de edad, tanto de los animales control como de los que se sometieron al tratamiento es muy similar, sin embargo cuando los linfocitos son estimulados *in vitro* con zinc la respuesta proliferativa de los animales que han sido tratados *in vivo* con el micronutriente se ve alterada, este efecto fué más pronunciado en los animales de 42 días de edad sometidos por más tiempo al tratamiento, ya que el promedio de cpm de las células estimuladas con el elemento en el grupo IV (1000 ppm) es aproximadamente la mitad de las cpm del grupo III (500 ppm).

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de dos vías encontrándose que entre las respuestas proliferativas de los controles de 21 y 42 días de edad estimulados con 0.1 mM de zinc y las de los animales tratados *in vivo* con el metal existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

edad	grupos	cpm (basal)	cpm (estimulados)
21 d	control	13368.79 +/- 2019.4	69601.27 +/- 8020.9
21 d	I (500)	15369.84 +/- 1821.2	29003.0 +/- 5762.4
21 d	II (1000)	15401.82 +/- 2240.9	22552.96 +/- 3828.8
42 d	control	17182.94 +/- 2132.9	73102.72 +/- 16195.8
42 d	III (500)	9992.04 +/- 2048.8	16329.10 +/- 1916.5
42 d	IV (1000)	9682.10 +/- 1823.1	9984.33 +/- 1648.6

**Cuadro I.** Este cuadro muestra la proliferación de linfocitos esplénicos de ratones de 21 y 42 días de edad tratados *in vivo* con el micronutriente y estimulados con 0.1 mM de zinc como mitógeno. Los resultados se muestran como las medias +/- la desviación estándar (s)

### **Determinación de la dosis óptima de Con A para inducir la máxima estimulación en linfocitos esplénicos**

Con la finalidad de determinar la concentración de Con A más adecuada para inducir la máxima proliferación en los linfocitos esplénicos, éstos se estimularon con distintas concentraciones del mitógeno. Como se observa en la gráfica No. 4, la máxima estimulación se produjo cuando las células se pusieron en presencia de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de la lectina. Dicha concentración se mantuvo constante durante los experimentos.

Esta concentración óptima de concanavalina es el promedio de tres experimentos, los cuales fueron analizados mediante una ANOVA de una vía, encontrándose que la dosis de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  presenta una  $p < 0.05$  con respecto a la concentración de 1.0  $\mu\text{g/ml}$ .

### **Determinación de la concentración óptima de zinc que modifica la respuesta a Con A**

Para valorar el efecto que pudiera producir la suplementación con Zn de los cultivos estimulados con concanavalina A, se realizó una curva con diferentes concentraciones de zinc en presencia de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de Con A. Se encontró que el máximo efecto potenciador

ocurre con la adición de  $5 \times 10^{-5}$  M de  $ZnCl_2$ , mientras que con concentraciones mayores a  $10^{-4}$  M la respuesta proliferativa a mitógenos se ve inhibida y las concentraciones menores a  $10^{-4}$  M no modifican la respuesta proliferativa (datos preliminares no mostrados en gráfica).

### **Resultados preliminares sobre el efecto de la adición de zinc a los cultivos de linfocitos estimulados ante Con A de animales tratados *in vivo* con el metal**

Se estudió el efecto que provocó la administración de  $10^{-4}$  M de  $ZnCl_2$  sobre los cultivos de linfocitos esplénicos estimulados con Con A de animales de 21 y 42 días de edad tratados *in vivo* con el metal. Se encontró que a los 21 días de edad la administración de zinc *in vitro* no modificó la respuesta proliferativa inducida por el mitógeno (datos no mostrados en gráfica). Mientras que a los 42 días de edad, la administración *in vitro* de  $10^{-4}$  M (0.1 mM) de zinc parece revertir los efectos inhibitorios provocados por el tratamiento *in vivo* con 500 ppm de Zn (grupo III) gráfica No. 5. Respecto a los controles, la administración de zinc *in vitro* no modificó su respuesta proliferativa.

## **Determinación de la concentración de zinc en plasma y tejidos**

Con objeto de conocer como se distribuye el elemento en los animales tratados con zinc, se determinó la concentración de este metal mediante espectrofotometría de absorción atómica en tejidos linfoides (timo) y no linfoides (hígado) y plasma de ratones de 21 y 42 días de edad.

Se encontró que la concentración del elemento en el timo permanece constante a los 21 días y que los animales de 42 días tratados con 1000 ppm de zinc presentan una mayor acumulación del elemento. En la gráfica No. 6 se muestra la concentración intratímica de zinc en animales que recibieron un suplemento del metal durante la gestación, la lactancia y el postdestete.

En el siguiente cuadro (Cuadro II) se muestran los promedios de la concentración de zinc en timo a los 21 y a los 42 días de edad. Los resultados fueron analizados estadísticamente (ANOVA de dos vías), encontrándose que en lo que respecta a la edad y dosis no existen diferencias significativas  $p>0.05$ .

edad	grupos	ppm de zinc en timo
21 d	control	15.94 +/- 1.19
21 d	I	12.49 +/- 2.6
21 d	II	17.13 +/- 1.97
42 d	control	12.10 +/- 0.93
42 d	III	13.99 +/- 1.01
42 d	IV	15.72 +/- 1.41

**Cuadro II.** En este cuadro se muestran los grupos de animales estudiados y la concentración intratímica de zinc determinada mediante espectrofotometría de absorción atómica, los resultados se representan como la media +/- s.

La gráfica No 7 representa los resultados de la concentración de zinc en hígado de animales tanto de 21 como de 42 días de edad. Los animales que recibieron la suplementación con zinc muestran un incremento significativo en la concentración del metal en este órgano ( $p < 0.05$ ). En el cuadro III se puede observar los grupos estudiados y la concentración de zinc en este órgano.

edad	grupos	ppm de zinc en hígado
21 d	control	14.56 +/- 1.30
21 d	I	19.21 +/- 2.57 *
21 d	II	25.46 +/- 2.58 *
42 d	control	14.24 +/- 0.72
42 d	III	18.78 +/- 2.09 *
42 d	IV	26.81 +/- 0.18 *

**Cuadro III.** En este cuadro se observa la concentración de zinc en hígado, los resultados se muestran como la media +/- s. Los resultados se analizaron estadísticamente a través de ANOVA de dos vías encontrándose que entre las dosis existen diferencias significativas  $p < 0.05$  \*.

En lo que respecta a la concentración de zinc en plasma, en la gráfica No. 8 se observa que a los 21 días de edad los niveles de zinc en el plasma se incrementan directamente en relación a la suplementación con el micronutriente. En el siguiente cuadro (cuadro IV) pueden observarse las medias de la concentración de zinc en plasma de los animales a 21 y 42 días de edad.

edad	grupos	mg/L. de zinc en plasma
21 d	control	1.77 +/- 0.347 *
21 d	500	3.19 +/- 0.125 *
21 d	1000	3.12 +/- 0.668 *
42 d	control	2.74 +/- 0.665
42 d	500	2.31 +/- 0.530
42 d	1000	2.95 +/- 0.385

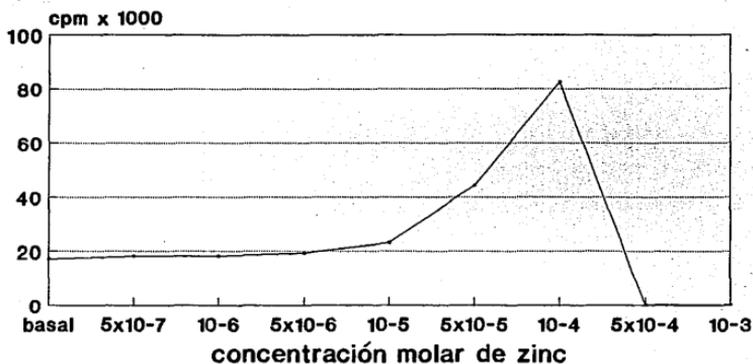
**Cuadro IV.** En este cuadro se muestran las medias +/- s de la concentración de zinc en el plasma de los animales sometidos a la suplementación con zinc a 21 y 42 días de edad con sus respectivos controles. Al realizar el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas en los animales de 21 días con respecto a su control  $p < 0.05$ . \*(ANOVA de dos vías)

En el cuadro V se observa que a los 21 y a los 42 días de edad los animales tratados con zinc presentan un incremento en el peso del timo comparados con su control. Por lo que respecta a los valores del índice tímico de los animales de 42 días tratados con Zn, estos resultan similares a los índices de los ratones de 21 días. También se calculó la diferencia entre los índices de las dosis así como de los controles. Estos datos y los valores de los índices parecen sugerir una tendencia a reducir la involución tímica en los animales tratados con zinc.

edad	tratamiento (dosis)	peso timo en g	• índice tímico	Δ del índice
21 días	0	0.0521	0.5158	0.1352 0.0821 0.0930
	500	0.0571	0.4939	
	1000	0.0545	0.5532	
42 días	0	0.0705	0.3806	
	500	0.0766	0.4118	
	1000	0.0869	0.4602	

**Cuadro V.** Se muestran el peso promedio del timo de los animales a los 21 y a los 42 días de edad, el • índice tímico (peso timo/peso corporal) y Δ, las diferencias de los índices de las dosis ( índice tímico de 21 días - índice tímico de 42 días).

## Efecto mitogénico de diferentes concentraciones de zinc sobre linfocitos esplénicos

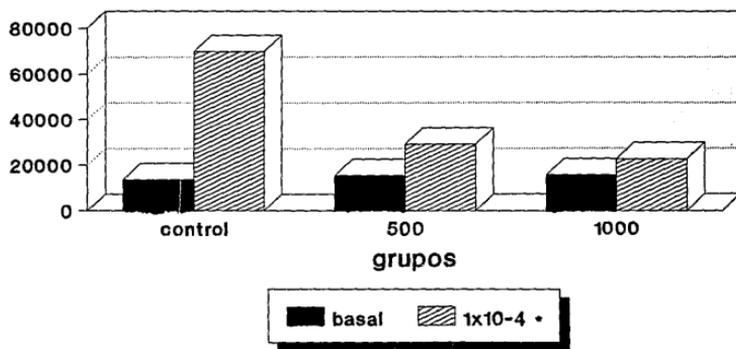


cultivo con 2-ME 5x10<sup>-6</sup> M

120 h

gráfica No. 1

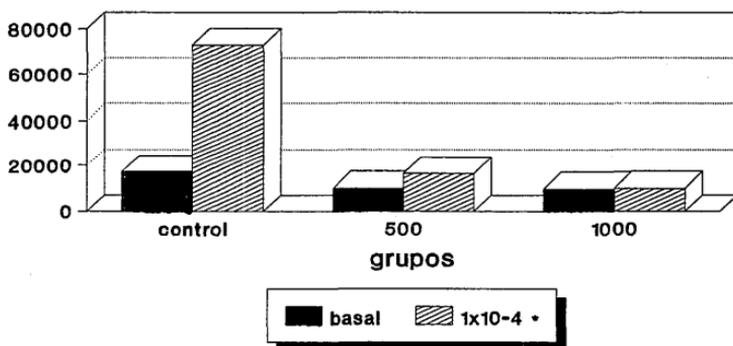
## Efecto del zinc como mitógeno sobre células de animales tratados "in vivo" con el metal



• concentración molar de zinc "in vitro"  
animales de 21 días

gráfica No. 2

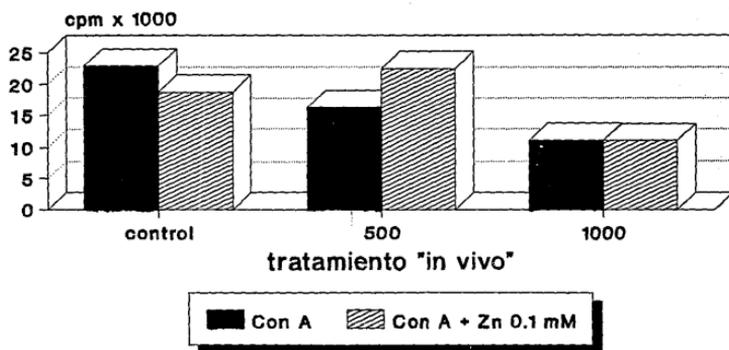
## Efecto del zinc como mitógeno sobre células de animales tratados "in vivo" con el metal



• concentración molar de zinc "in vitro"  
animales de 42 días

gráfica No. 3

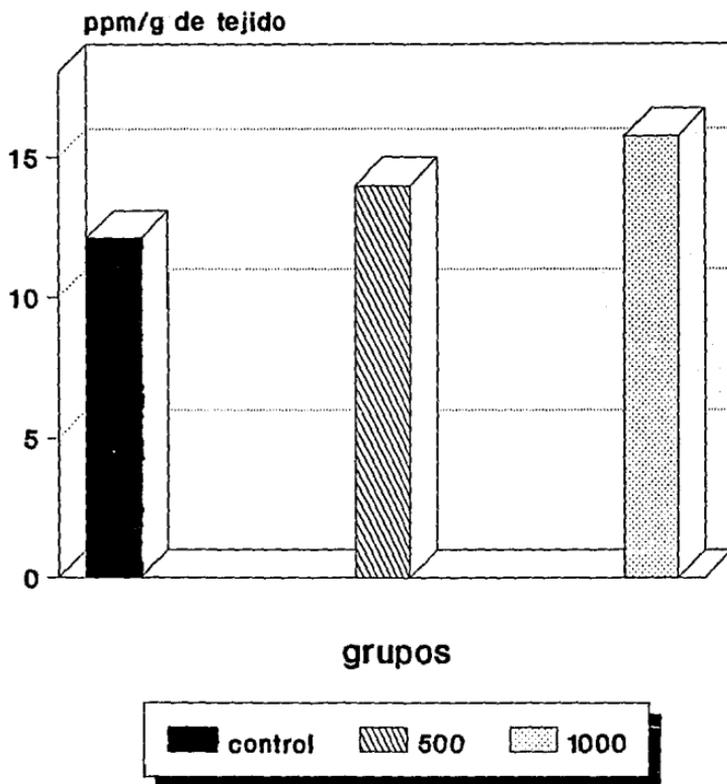
## Efecto del zinc "in vitro" ante el estímulo de Con A en linfocitos esplénicos



Resultados preliminares

gráfica No. 5

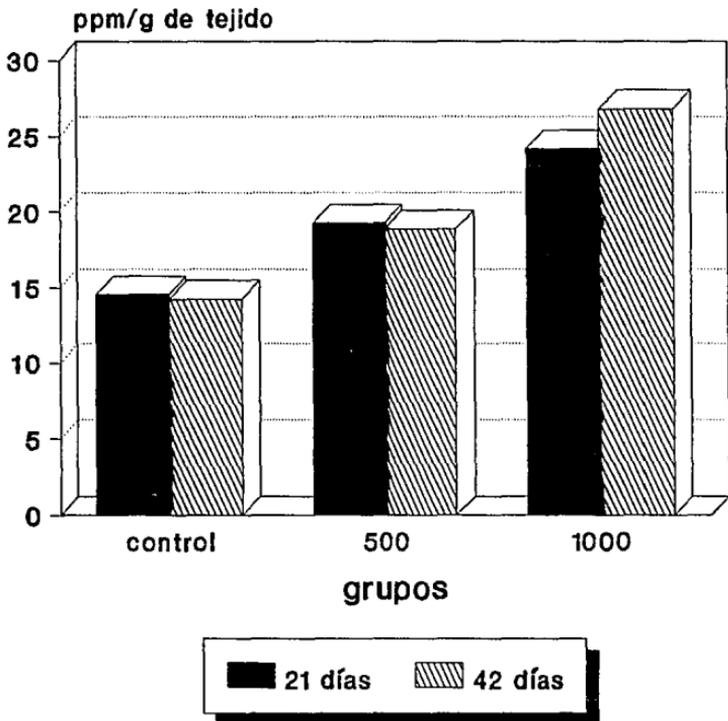
# Concentración de zinc en timo de animales 42 días de edad



$p > 0.05$

gráfica No. 6

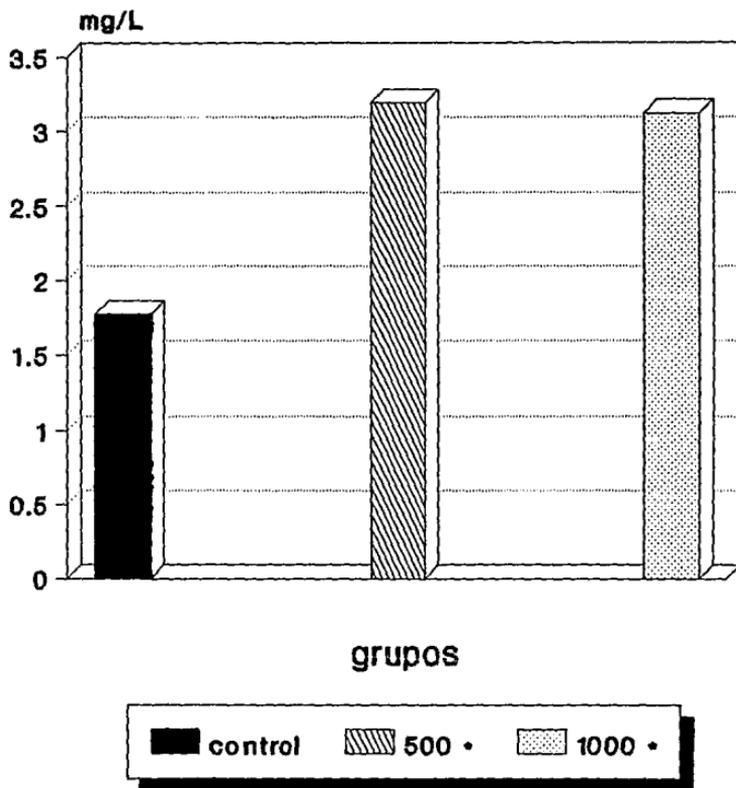
# Concentración de zinc en hígado de animales de 21 y 42 días de edad



$p < 0.05$  en relación a la dosis

gráfica No. 7

## Concentración de zinc en plasma de animales de 21 días de edad



•  $p < 0.05$  con respecto al control

gráfica No. 8

**FALTA PAGINA**

**No.**

84

## 6 DISCUSION

En este trabajo se evaluó el efecto que ejerce la administración de dosis moderadas de zinc sobre la función inmunológica (inmunidad celular), durante las etapas de gestación, lactancia (21 días de edad) y destete (42 días de edad). Se decidió evaluar estas etapas, debido a que se han realizado estudios en los que se observa que durante el embarazo y la lactancia existe una disminución fisiológica de los niveles de zinc en las madres, ya que este metal y otros micronutrientes se requieren principalmente para el desarrollo del feto y en la secreción de leche (27).

También se ha visto que la ingestión de dietas marginales o deficientes en zinc durante el embarazo produce resultados catastróficos sobre las funciones del sistema inmunológico de las crías, estas alteraciones pueden persistir incluso hasta la tercera generación (1,2,24,25). Por otra parte, existen algunas controversias entre los resultados obtenidos en experimentos al administrar el metal *in vivo* e *in vitro*.

Con base en lo anterior se consideró que la administración de este metal durante etapas perinatales podría reforzar el sistema inmunológico de las crías, por ésto se estudió el efecto de la administración del metal a cultivos de linfocitos esplénicos procedentes de animales tratados *in vivo* con el elemento.

En los ensayos sobre los efectos mitogénicos del elemento encontramos que efectivamente el zinc resultó ser mitogénico *per se*, se observa que la dosis que produce la máxima estimulación en el cultivo, es la de 0.1 mM.

Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos de otros investigadores en los cuales se ha visto que el zinc es capaz de estimular la síntesis de DNA y RNA de linfocitos humanos de sangre periférica (5) y células esplénicas murinas (47). En estos estudios se encontró que el efecto mitogénico del metal depende de varios factores, entre los que se encuentran: el medio de cultivo empleado, la presencia de grupos tiol exógenos como el 2-ME, el número de células, así como la presencia de células T y de células  $Ia^+$  (47). Sin embargo, no deben descartarse otros efectos como: activación de enzimas, cambios en la membrana celular y en el flujo de otros iones en el citoesqueleto que pueden modificar la activación de las células respondedoras y/o la interacción de las células en el cultivo (32).

En un estudio realizado por Warner (47), se encontró que la selección del medio de cultivo es un factor crítico que determina la actividad inmunomoduladora de los metales, debido a que los diversos medios de cultivo varían en cuanto a la cantidad de sus constituyentes (glutatión, fosfatos, calcio, fierro, magnesio) con los cuales el metal exógeno puede interactuar.

Los ensayos realizados por nosotros se prolongaron a 120 h con lo que obtuvimos la máxima respuesta proliferativa similar a la proliferación inducida por antígenos solubles o en el cultivo de células alogénicas o autólogas (47).

También se usó en los cultivos un agente reductor como el 2-mercaptoetanol el cual se considera que mantiene la viabilidad de las células y aumenta la respuesta proliferativa *in vitro* a través de su función al disminuir los enlaces disulfuro de la superficie de los linfocitos (36,37).

Por su parte el zinc es capaz de interactuar con los grupos sulfhidrilo libres y puede actuar con grupos tioles en la membrana, al parecer, ésto ocasiona alteraciones en la conformación de las moléculas membranales favoreciendo la activación de las células (47).

Otra condición importante en los cultivos fué la densidad celular ( $5 \times 10^5$  células/pozo) siendo un factor crítico en el estímulo con metales debido a que se requiere que exista el contacto célula-célula para inducir la proliferación, regulada probablemente por la interacción (linfocitos-macrófagos) (47,48).

En los cultivos realizados para evaluar el efecto del zinc como mitógeno sobre los linfocitos de ratones tratados *in vivo* con el metal, encontramos que las células de los animales tratados *in vivo*, no respondieron a la acción mitogénica del zinc ni a 21 ni a 42 días de edad.

Se observó que a los 21 días de edad la proliferación de las células que no recibieron el estímulo del Zn como mitógeno (basal), tanto en los animales sometidos a la suplementación *in vivo* con el metal como en los animales control fué muy similar; sin embargo, cuando los linfocitos se ponen en presencia del metal la respuesta proliferativa de los animales tratados con zinc *in vivo* fué menor a la de los controles. Este efecto fué mas pronunciado en los animales de 42 días de edad debido a que tanto la proliferación de los basales como la proliferación de las células estimuladas con zinc de los animales tratados *in vivo* con el micronutriente se vió inhibida.

Lo anterior sugiere que el mecanismo habitual del zinc como mitógeno observado en animales sin tratamiento *in vivo* (controles), no se pudo llevar a cabo en los animales tratados *in vivo* con el micronutriente, quizá ésto se deba a que la suplementación con el metal por períodos prolongados (principalmente a 42 días de edad) provoquede la inhibición de enzimas relacionadas con la replicación celular como consecuencia de un aumento en la concentración intracelular de zinc, por lo que las células de estos animales no son capaces de responder al estímulo con el metal *in vitro*.

En una investigación preliminar realizada en este trabajo, encontramos que el zinc 0.1 mM adicionado a los cultivos de animales de 21 días de edad tratados *in vivo* con un suplemento del metal, no modificó la respuesta proliferativa inducida por la concanavalina A. Ésto lleva a pensar que este fenómeno quizá se deba al tipo de cepa que se utilizó: BALB/cAnN, la cual responde favorablemente al estímulo ante Con A por lo que la adición de zinc *in vitro* no provoca ninguna modificación en la respuesta.

Sin embargo, encontramos que a los 42 días de edad la respuesta proliferativa de los linfocitos de animales tratados *in vivo* con el metal frente a mitógenos disminuye y la adición de zinc *in vitro* sobre estas células es capaz de revertir los efectos ocasionados por la suplementación *in vivo* de los animales con 500 ppm del elemento; al parecer el exceso de zinc está provocando que la respuesta linfoproliferativa de estos animales sea similar a la que presentan las cepas de ratones con baja respuesta proliferativa a mitógenos (C57BL/6) (32). Además se ha visto que el zinc *in vitro* modifica el número y movilidad de los receptores para mitógenos, por lo que este efecto puede contribuir a la modulación de la respuesta proliferativa en los cultivos suplementados con el metal.

Los animales tratados con 1000 ppm en ese período no presentan ninguna modificación al adicionar el elemento al cultivo. Esto sugiere que la cantidad administrada *in vivo* ha sobrepasado los límites tóxicos de tolerancia de las células, por lo que estas no son capaces de responder a la presencia del zinc en el cultivo.

En los experimentos realizados en este trabajo, el zinc se administró en el agua de bebida. El Zn exógeno es absorbido en el intestino delgado por las células intestinales, éstas se encargaran de incorporarlo al plasma, en donde será transportado y distribuido a tejidos como el hígado, la médula, el músculo, el páncreas, etc (14).

En diversos estudios realizados con animales sometidos a dietas deficientes en zinc, se ha encontrado que una de las tantas consecuencias que provoca la falta del metal es la disminución en el tamaño de los órganos linfoides: timo y bazo, que puede progresar hasta producir atrofia de los mismos. Por otro lado se ha visto que estas alteraciones pueden revertirse cuando a los animales se les suplementa con una dieta adecuada en zinc (3,20).

En este trabajo al determinar la concentración de zinc en los tejidos de animales sometidos a la suplementación con el metal, encontramos que los animales tratados con 1000 ppm del elemento muestran una mayor acumulación del metal en los tejidos analizados, tanto a los 21 como a los 42 días de edad.

Se observa también que la concentración de zinc en el timo de los animales sometidos al tratamiento fué mayor al de los controles y se encontró que la ganancia en peso de este órgano es mayor en los animales que recibieron zinc; al obtener la relación timo/peso corporal (índice tímico) vemos que a los 42 días de edad el timo ha comenzado a involucionar y que la involución tímica es más pronunciada en los controles que en los animales suplementados con el metal, sugiriendo una tendencia a que la involución de este órgano se reduzca en los animales tratados.

No sabemos si éstos efectos resulten benéficos para los animales sometidos al tratamiento, debido a que lo normal es que el timo se reduzca en tamaño e involucione. Sería útil determinar la cantidad de células T maduras así como la relación de células T y B, debido a que si existiera alguna alteración en estos parámetros, esto tal vez se esté reflejando en los efectos inhibitorios observados en la proliferación celular.

En lo que respecta a la concentración de zinc en hígado, encontramos que los resultados obtenidos tanto a los 21 días como a los 42 días de edad concuerdan con reportes en los cuales se ha visto que la suplementación con zinc, provoca que este metal se acumule en las células hepáticas. Ésto, probablemente como consecuencia de la inducción de la síntesis de metalotioneínas, las que se producen en grandes cantidades en este órgano cuando existen niveles elevados de este metal en plasma, para regular la homeostasis del mismo y detoxificar al organismo del exceso del elemento (14).

En este sentido encontramos que los animales tratados con 1000 ppm de zinc presentan una concentración elevada del elemento en este órgano en ambos períodos del desarrollo.

Al determinar la concentración de zinc en plasma se encontró que los animales de 21 días de edad sometidos a la suplementación con el micronutriente, presentan niveles elevados de zinc comparados a los controles, lo que concuerda con otros estudios en los cuales se ha visto que la administración de zinc provoca modificaciones en la concentración de zinc en plasma (6,7,23).

Por otro lado encontramos que a los 42 días de edad la concentración de zinc en el plasma de los animales sometidos al tratamiento es similar a la de los controles. Ésto lleva a pensar que quizá ocurre una redistribución del metal como consecuencia de la administración prolongada y de las dosis utilizadas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos al determinar la concentración de zinc en hígado y timo.

Como corolario se deduce que:

- En los ensayos de proliferación celular, los animales de 21 y 42 días de edad suplementados *in vivo* con dosis moderadas del micronutriente, presentan una baja respuesta linfoproliferativa frente al Zn como mitógeno.
- La respuesta proliferativa basal (que no recibe el estímulo del zinc *in vitro*) de los animales tratados con zinc durante los períodos de gestación y lactancia, y destete fué menor a la que presentan los controles.
- El tratamiento *in vivo* con dosis moderadas de zinc provocó cambios en el timo (variación en el índice tímico).
- La administración prolongada de zinc provocó la acumulación del elemento en tejidos (timo e hígado).
- La suplementación con el metal durante las etapas de gestación y lactancia ocasionó un aumento en los niveles plasmáticos de zinc.

Continuando con esta línea de investigación resultaría interesante determinar como se encuentra la concentración de zinc en el bazo de los animales sometidos a la suplementación con el metal, debido a que esta sería una manera indirecta de conocer la concentración de zinc en las células circulantes (eritrocitos, linfocitos, macrófagos) las cuales llegan a este órgano y además contienen una gran cantidad de este metal (4,29).

Asimismo la determinación de los niveles de interleucina-1, interleucina-2 e interleucina-4 en estos animales, así como la expresión de sus receptores y la determinación de la función y actividad fagocitaria de los macrófagos, podría darnos la pauta para poder avanzar en la comprensión de los efectos que está provocando el tratamiento *in vivo* con dosis moderadas de zinc sobre el cultivo de células procedentes de estos animales sometidas al estímulo con el metal.

## **Anexo I**

### ***Preparación de la solución de zinc***

Se preparó una solución 1.0 M de cloruro de zinc (Merck No cat. 8816), la cual se esterilizó por filtración (Millipore swinnex-25 y filtro type GS 0.22 $\mu$ m); y se almacenó a 4°C.

A partir de esta solución se prepararon las soluciones que fueron utilizadas en las curvas de zinc; para lo cual se tomaron 100 $\mu$ l de la solución concentrada y se diluyeron con 9.9 ml de medio de cultivo de esta manera se obtuvo una solución 10<sup>-2</sup> M de cloruro de zinc; de esta solución se tomaron 10 o 20  $\mu$ l y se adicionaron a los pozos de la microplaca en donde se habían colocado previamente 100  $\mu$ l de la suspensión celular y 100  $\mu$ l de medio de cultivo de esta forma se obtuvieron las concentraciones 0.5x10<sup>-3</sup> y 1.0x10<sup>-3</sup> M de zinc respectivamente.

Para obtener las demás concentraciones de zinc se partió de la solución 10<sup>-2</sup> M y se realizaron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 con medio de cultivo. De igual forma cuando se tomaron 10 o 20 $\mu$ l de la dilución 1:10 y se agregaron al cultivo se obtuvieron las concentraciones 0.5x10<sup>-4</sup> y 1.0x10<sup>-4</sup> M respectivamente; así se continuó sucesivamente hasta completar la curva.

## **Anexo II**

### ***Digestión de plasma y tejidos***

#### **Plasma**

Se tomaron 0.5 ml de la mezcla de plasmas y se digirieron con 0.5 ml de ácido nítrico (Baker, No cat. 9601-62), posteriormente se agregaron 2.0 ml de peróxido de hidrógeno ( Mallinckrodt No cat. 5240) para aclarar la solución y completar la digestión, por último las muestras digeridas se aforaron a 6 ml con agua destilada y se dejaron reposar durante 24 h a temperatura ambiente, al término de las cuales se filtraron y analizaron en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química, para determinar la concentración de zinc mediante espectrofotometría de absorción atómica.

#### **Tejidos**

El timo e hígado se extirparon, se determinó el peso de los timos y se obtuvo el promedio de cada grupo. El timo y bazo de 5 animales y 0.1 g de hígado/ratón (0.5 g ) se colocaron a peso seco durante 24 h a temperatura de 100°C. Las muestras se digirieron en la misma forma en que fueron digeridos los plasmas para determinar la concentración del zinc.

### ***Espectrofotometría de absorción atómica***

**Fundamento:** Cuando se hace incidir un haz de luz de una determinada longitud de onda sobre una llama que contiene una nube de átomos al estado fundamental, estos absorberán la energía, por lo que la intensidad inicial de luz se ve disminuída en una cantidad determinada por la concentración de átomos en la llama; posteriormente la luz es dirigida sobre un detector que mide la intensidad de luz disminuída, la cantidad de luz absorbida se determinará al comparar la intensidad inicial y la disminuída; este proceso es conocido como absorción atómica

Mediante estas bases las muestras de tejidos y plasma fueron analizadas y se determinó su concentración de Zn interpolando los resultados sobre una curva de zinc. Los resultados se reportan en partes por millón.

## BIBLIOGRAFIA:

1. Beach R. S, Gershwin M. E and Hurley L. S: **Gestational zinc deprivation in mice : Persistence of immunodeficiency for three generations.** *Science* 218: 469-471, 1983
2. Beach R. S, Gershwin M. E and Hurley L. S: **Persistent immunological consequences of gestation zinc deprivation.** *Am J Clin Nutr* 38: 579-590, 1983
3. Beisel W.R: **Single nutrients and immunity.** *Am J Clin Nutr* 35(suppl):417-468, 1982
4. Beisel W.R: **Zinc and the immune system.** in: Academic Press, ed. *Enciclopedia of immunology*. Roith 1577-78, 1992
5. Berger N. A and Skinner A. M: **Characterization of lymphocyte transformation induced by zinc ions.** *J Cell Biol* 61: 45-55, 1974
6. Bogden J. D et al: **Zinc and immunocompetence in elderly people: effects of zinc supplementation for 3 months.** *Am J Clin Nutr* 48: 655-663, 1988
7. Boukaiba N et al: **A physiological amount of zinc supplementation: effects on nutritional, lipid and thymic status in an elderly population.** *Am J Clin Nutr* 57: 566-572, 1993
8. Brambila C. E. M and González V. E: **Zinc: función e interacción con las moléculas de los sistemas biológicos.** *Boletín de Bioquímica* 36-45, 1994
9. Chandra R. K: **Excessive intake of zinc impairs immune responses.** *JAMA* 252: 1443-1446, 1984

10. Chandra R. K: **Effect of vitamin and trace element supplementation on immune responses and infection in elderly subjects.** *Lancet* 340: 1124-1127, 1992
11. Chandra R.K: **Nutrition and immunoregulation. Significance for resistance to tumors and infectious diseases in humans and rodents.** *J Nutr* 122: 754-757, 1992
12. Chandra R. K: **1990 McCollum award lecture. Nutrition and immunity: Lessons from the past and new insights into the future.** *Am J Clin Nutr* 53: 1087-1101, 1991.
13. Cook-Mills J.M and Fraker P.J: **Functional capacity of the residual lymphocytes from zinc deficient adult mice.** *Br J Nutr* 69: 835-848, 1993
14. Cousins R. J: **Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin.** *Phys Rev* 65: 238-309, 1985
15. De Pasquale-Jardieu P and Fraker P.J: **Interference in the development of a secondary immune response in mice by zinc deprivation: persistence of effects.** *J Nutr* 114: 1762-1769, 1984
16. De Pasquale-Jardieu P and Fraker P.J: **The role of corticosterone in the loss in immune function in the zinc-deficient A/J mouse.** *J Nutr* 109: 1847-1855, 1979
17. Forbes I. J, Zalewski P. D and Giannakis C: **Role for zinc in a cellular response mediated by protein kinase c in human B lymphocytes.** *Exp Cell Res* 195: 224-229, 1991

18. Fosmire G. J: **Zinc toxicity.** *Am J Clin Nutr* 51: 225-227, 1990
19. Fraker P. J, Zwicky C. M and Luecke R. W: **Delayed type hypersensitivity in zinc deficient adult mice: impairment and restoration of responsivity to dinitrofluorobenzene.** *J Nutr* 112: 309-313, 1982
20. Fraker P. J et al : **Interrelationships between zinc and immune function.** *Fed Proc* 45: 1474-1479, 1986
21. Grider A, Bailey L. B and Cousins B. J: **Erythrocyte metallothionein as an index of zinc status in humans.** *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1259-1262, 1990
22. Hart D. A: **Effect of zinc chloride on hamster lymphoid cells: Mitogenicity and differential enhancement of lipo-polisaccharide stimulation of lymphocytes.** *Infect Immunol* 19: 457-461, 1978
23. Johnson P.E et al: **Homeostatic control of zinc metabolism in men: zinc excretion and balance in men fed diets low in zinc.** *Am J Clin Nutr* 57:557-565, 1993
24. Keen C.L : **Zinc deficiency and immune function.** *Ann Rev Nutr* 10: 415-431, 1990
25. Keen C.L et al: **Effect of severity of maternal zinc deficiency on pregnancy outcome and infant zinc status in Rhesus monkeys.** *Pediatr Res* 33:233-241,1993

26. King L. E and Fraker P. J: **Flow cytometric analysis of the phenotypic distribution of splenic lymphocytes in zinc deficient adult mice.** *J Nutr* 121: 1433-1438, 1991
27. Kirchgessner M and Weigand E: **Zinc absorption and excretion in relation to nutrition.** In: *Sigel H, ed. Metal ions in biological systems. New York, 319-354, 1983*
28. Kramer T et al: **Lymphocyte responsiveness of children supplemented with vitamin A and zinc.** *Am J Clin Nutr* 58: 566-570, 1993
29. Ladefoged K and Jarnum S: **Zinc deficiency during parenteral nutrition.** In: *Sigel H, ed. Metal ions in biological systems. New York 416-422, 1983*
30. Lastra M. D and Espinosa E: **Efectos del zinc como inmunomodulador.** *Bioquimia* 13: 17-21, 1993
31. Lawrence D. L: **Heavy metal modulation of lymphocyte activities I. In vitro effects of heavy metals on primary humoral immune responses.** *Tox Appl Pharmacol* 57: 439-451, 1981
32. Malavé I and Benaím I. R: **Modulatory effect of zinc on the proliferative response of murine spleen cells to polyclonal T cell mitogens.** *Cell Immunol* 89: 322-330, 1984
33. Malavé I et al: **Effect of zinc on the proliferative response of human lymphocytes: mechanism of its mitogenic action.** *Immunopharmacology* 20: 1-10, 1990

- 34 Moulder K and Steward M. W: **Experimental zinc deficiency: Effect on cellular responses and the affinity of humoral antibody.** *Clin Exp Immunol* 77: 269-274, 1989
- 35 Mulhern S. A et al: **Suppression of antibody response by excess dietary zinc exposure during certain stages of ontogeny.** *Proc Soc Exp Biol Med* 180: 453-461, 1985
36. Noelle R.J and Lawrence D.A: **Modulation of T-cell functions I. Effect of 2-mercaptoethanol and macrophages on T-cell proliferation.** *Cell Immunol* 50: 416-431, 1980
37. Noelle R.J and Lawrence D.A: **Modulation of T-cell functions II. Chemical basis for the involvement of cell surface thiol-reactive sites in control of T-cell proliferation.** *Cell Immunol* 60: 453-469, 1981
38. Peretz A et al: **Interest of zinc determination in leucocyte fractions for the assessment of marginal zinc status.** *Clin Chim Acta* 203: 35-46, 1991
39. Peretz A et al: **Zinc distribution in blood components, inflammatory status and clinical indexes of disease activity during zinc supplementation in inflammatory rheumatic diseases.** *Am J Clin Nutr* 57: 690-694, 1993
40. Renoux G, Renoux M and Guillaumin J.M: **Immunopharmacology and immunotoxicity of zinc diethyl-dithiocarbamate.** *Int J Immunopharmac* 10: 489-493, 1988
41. Rhodes D and Klug A: **Zinc fingers.** *Sci Am* feb 32-39, 1993.

42. Scuderi P: **Differential effects of copper and zinc on human peripheral blood monocyte cytokine secretion.** *Cell Immunol* 126: 391-405, 1990
43. Sian L et al: **Influence of a meal and incremental doses of zinc on changes in zinc absorption.** *Am J Clin Nutr* 58: 533-536, 1993
44. Sherman A. R: **Zinc, copper and iron nutriture and immunity.** *J Nutr* 122: 604-609, 1992
45. Smith K.L and Lawrence D. A: **immunomodulation of in vitro antigen presentation by cations.** *Tox Appl Phar* 96: 476-484, 1988
46. Smith M.A et al: **Blood and urinary zinc changes after a glucose challenge in early and late pregnancies.** *Am J Clin Nutr* 48:664-670, 1988
47. Warner G. L and Lawrence D. A : **Stimulation of murine lymphocyte responses by cations.** *Cell Immunol* 101: 425-439, 1986
48. Warner G. L and Lawrence D. A: **Cell surface and cell cycle analysis of metal-induced murine T cell proliferation.** *Eu J Immunol* 16: 1337-1342, 1986
49. Warner G. L and Lawrence D. A: **The effect of metals on IL-2 related lymphocyte proliferation.** *Int J Immunopharmac* 10: 629-637, 1988
50. Williams T.M et al: **Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression.** *Science* 254:1791-1794, 1991

51. Winchurch R. A, Togo J and Adler W. H: **Supplemental zinc ( $Zn^{2+}$ ) restores antibody formation in cultures of aged spleen cells II. Effects on mediator production.** *Eur J Immunol* 17: 127-132, 1987

52. Winchurch R. A, Togo J and Adler W. H: **Supplemental zinc restores antibody formation in cultures of aged spleen cells. III . Impairment of IL-2 mediated responses.** *Clin Immunol Immunopathol* 49: 215-222, 1988

53. Zanzonico P. Fernandez G. and Good R.A: **The differential sensitivity of Tcell and B cell mitogenesis to in vitro zinc deficiency.** *Cell Immunol* 60: 203-211, 1981