



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

EFFECTO DEL ZINC EN LA INVOLUCION
TIMICA

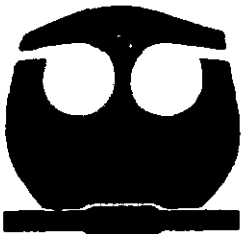
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MONICA BERENICE HERAS CHAVARRIA



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

270611

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

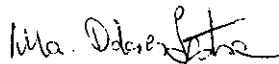
Presidente	Prof.	LASTRA AZPILICUETA MARIA DOLORES
Vocal	Prof.	HERNANDEZ MONTES HOMERO
Secretario	Prof.	PELAYO CAMACHO ROSANA
1er. suplente	Prof.	PANIAGUA SOLIS JORGE FERNANDO
2do. suplente	Prof.	ESPINOSA ARCINIEGA HECTOR ENRIQUE

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Lab. de Investigación en Inmunología FACULTAD DE QUIMICA UNAM

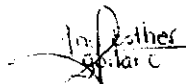
Asesor del tema:

M en C María Dolores Lastra Azpilicueta



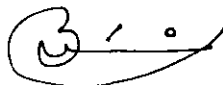
Supervisor técnico:

M en C Ana Esther Aguilar Cárdenas



Sustentante:

Mónica Berenice Heras Chavarría



Si nuestros logros son el fruto del esfuerzo y del aprendizaje, del apoyo y la confianza, bien es que estos se compartan con todas aquellas personas que los han hecho posibles.

A ti, Dios, por tu infinita y maravillosa presencia en mi vida

A mi queridísima e inolvidable "mami grande" por el amor y dedicación que me brindó durante tantos años.

A mi mamá por ser el pilar de mi formación humana y profesional, por su cariño y comprensión.

A Betsy y Lucy por su incondicional compañía, amistad y paciencia.

A mi papá por su sonrisa.

*A la Facultad de química
con todo lo que ella significa.*

*Por el tiempo y aventuras compartidas
a mis amigos: Ceci, Ricardo, Erika,
Germán y Verónica.*

*A las personas que han
aportado a mi vida más de lo que
yo hubiera pedido: Fernando E.
Pável, Roberto.*

*Mi eterna gratitud a la Mtra. MD Lastra
por su valioso tiempo y consejo.*

*A la Mtra Anita, por ser no sólo una gran guía
sino una valiosa amiga, con mi cariño incondicional.*

Gracias al Maestro Rodolfo por su buen humor y su ayuda.

*Gracias a la Mtra Nadia
por toda su colaboración en el desarrollo
de este trabajo.*

*A mis compañeras y amigas
"Chivis" y Mary por su compañía y confianza.*

*Gracias al Mtro L. Valente por su
acertado asesoramiento.*

INDICE

1. Introducción	11
2. Generalidades	14
2.1 Función biológica del zinc	14
Zinc y hormonas	
Zinc y enzimas	
Zinc y control transcripcional	
Actividad antioxidante	
2.2 Absorción del zinc	18
Ingesta de zinc en la dieta	
Requerimientos de zinc	
Absorción gastrointestinal	
Transporte plasmático	
Influencia del estado fisiológico	
2.3 Sitios de almacenamiento	21
2.4 La excreción del zinc	21
2.5 Evaluación del status de zinc	22
2.6 El zinc y las metalotioneínas	22
2.7 El zinc en las etapas perinatales	23
2.8 Deficiencia y exceso de zinc	25
Toxicidad del zinc	
Dosis tóxicas	
Dosis farmacológicas	
2.9 El zinc y el sistema inmune	28
Efecto del zinc sobre los tejidos linfoides y el sistema inmune	
Efecto del zinc sobre la inmunidad humoral	
Efecto sobre la función de las células fagocíticas	

2.10 Desarrollo e involución tímicas	31
Embriología	
Estructura y microambiente tímico	
Componentes no epiteliales	
Linfocitos tímicos	
Involución tímica	
La involución tímica y el embarazo	
Teorías propuestas para explicar la involución tímica	
2.11 El Zinc y el timo	40
El Zinc y la apoptosis	
2.12 La suplementación con zinc	43
3. Justificación del estudio	45
4. Objetivo	46
5. Material y Métodos	47
6. Resultados	51
7. Discusión	61
Anexo	71
Bibliografía	73

ABREVIATURAS

ConA	Concanavalina A
FTS	Factor Tímico Sérico
GH	Hormona del crecimiento
IL-1β	Interleucina - 1 beta
IFN-γ	Interferon gamma
MDZ	Deficiencia moderada de zinc
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
PHA	Fitohemaglutinina
PRL	Prolactina
SM-C	Somatomedina-C
SZD	Deficiencia severa de zinc
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal
TNF	Factor de necrosis tumoral
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

El zinc es un micronutriente esencial para la inmunocompetencia. La carencia de este elemento y aún deficiencias marginales del mismo, producen una serie de efectos negativos tales como retraso en el crecimiento y trastornos en la gestación, también se presenta alteración en las dos ramas de la respuesta inmune. Dichos efectos pueden persistir por períodos prolongados durante la vida de los individuos y en las generaciones posteriores. (Beach *et al* 1980, Beach *et al* 1983, Chandra 1991)

Se ha demostrado que la intervención con Zn tiene un efecto positivo sobre la respuesta inmune. En especial la suplementación oral con este metal, en un modelo murino durante las etapas perinatales, elevó la proliferación linfocítica, la concentración de las inmunoglobulinas y la actividad fagocítica. (Lastra *et al* 1996)

La anatomía de los órganos linfoides también se altera por la deficiencia de zinc, siendo el timo el órgano que se afecta de forma más evidente. El timo tiene especial importancia en el sistema inmune ya que proporciona los elementos necesarios para la maduración y diferenciación de los linfocitos T, sin embargo, involuiona tempranamente llegando a su tamaño máximo entre las 3 y 4 semanas de edad en el ratón. El índice tímico (peso timo/ peso corporal) es una medida de la involución, ya que a diferencia del humano, el tejido linfoide del timo murino no se sustituye por tejido conectivo y grasa. (George y Ritter 1996)

Con el objeto de analizar el efecto de la administración oral de zinc en la involución tímica, se dio un suplemento de este elemento traza en el agua de bebida (500 y 1000 mg/L) durante la gestación, la lactancia y el destete a ratones BALB/cAnN. Los resultados muestran que el tratamiento incrementó el índice tímico de aquellos animales de seis semanas de edad respecto al control ($p < 0.05$), y se obtuvo una pendiente positiva al graficar el peso corporal contra el peso tímico en los ratones con la suplementación, en contraste con el grupo testigo (0 mg/L), en el cual la pendiente fue negativa. No se observó variación significativa en el índice esplénico ni en la concentración de zinc en el bazo respecto al tratamiento, sin embargo, la concentración de zinc en suero aumentó conforme la dosis del metal administrada.

Los resultados indican que la suplementación con zinc en dosis de 500 mg/L retarda la involución tímica al aumentar el índice tímico del grupo con tratamiento. Estas observaciones sugieren que la involución fisiológica del timo no es un proceso irreversible y puede ser alterado por la concentración de zinc en el organismo. Es necesario realizar nuevos estudios encaminados a conocer los mecanismos moleculares por los cuales el zinc afecta la involución del timo, además de establecer la dosis óptima de suplementación.

1. INTRODUCCION

El zinc influye muchos aspectos del sistema de defensa del huésped, desde la integridad de la piel hasta la regulación génica en los linfocitos.

El zinc es importante para el desarrollo y función normales de las células integrantes del sistema inmune no específico, como neutrófilos y células NK . El zinc también afecta el desarrollo de la inmunidad adquirida, participando en la activación de linfocitos T y en la producción de citocinas tipo Th1; así mismo, participa en el desarrollo de los linfocitos B y la producción de anticuerpos, particularmente de IgG. (Shankar *et al* 1998, Lesourd 1997, Lastra *et al* 1996, Chandra 1991)

Estos efectos del microelemento en el sistema inmune pueden explicarse a través de su participación en procesos celulares básicos como la replicación, y la transcripción, y por el papel del zinc en la estructura y función de enzimas involucradas en la activación y la muerte celular.

De lo anterior se puede deducir que la deficiencia de este elemento traza que puede estar acompañada de una malnutrición protéico-energética o desnutrición, conduce a una respuesta inmune deficiente que incluye atrofia tímica y, por consiguiente, una mayor susceptibilidad a infecciones. (Wellinghausen *et al* 1997)

Se ha reportado que la malnutrición en el humano dentro del primer año de edad resulta en una reducción permanente en el tamaño del timo, dicha reducción en el tamaño y celularidad se observó principalmente en la corteza del órgano. (Golden *et al* 1977)

El timo proporciona los elementos necesarios para el desarrollo y diferenciación de los linfocitos T, sin embargo, involuciona tempranamente y se conoce poco acerca de los factores que desencadenan dicho evento. El timo alcanza su máximo tamaño entre las tres y cuatro semanas de edad en el ratón, y después se reduce con la edad. La funcionalidad disminuida del timo se asocia con la reducción en el tamaño del órgano, y, además, se ha visto que el timo remanente es menos eficiente, ya que su producción de células es menor a la esperada. (George y Ritter 1996, Mocchegiani *et al* 1995a)

En contraste con algunos modelos experimentales, en los cuales se pueden provocar deficiencias severas de zinc, las poblaciones humanas frecuentemente exhiben deficiencias marginales del elemento, especialmente en ciertos estados del desarrollo como la gestación y la lactancia; también se ha observado que los reservorios de zinc experimentan una reducción progresiva con la edad.

En México y en muchos países en vías de desarrollo existen deficiencias severas de micronutrientes, siendo la población más afectada los niños, quienes muestran infecciones subclínicas que aunado al mal tratamiento y a la desnutrición conduce a un elevado índice de mortalidad. (Rosado *et al* 1997)

Se conoce que la suplementación oral con zinc cuidadosamente monitoreada, incrementa y restablece la respuesta inmune tanto celular como humoral en individuos normales y en aquellos con deficiencias marginales de zinc. En modelos experimentales se ha visto que el tratamiento con zinc aumenta la producción de IgM y la proliferación de los linfocitos en respuesta a la concanavalina A. (Murray *et al* 1983, Lastra *et al* 1996). Por lo anterior, es importante explorar el impacto de distintos suplementos de zinc en el sistema inmune. El presente trabajo ha sido diseñado para estudiar el efecto de la suplementación oral con zinc (500 y 1000 mg/L) en la involución tímica, y su impacto en otros órganos linfoides asociado a los cambios en la concentración tisular y sérica inducida por la suplementación durante la gestación, la lactancia y el destete.

2. GENERALIDADES

Microelementos

Los elementos traza se encuentran en el organismo en concentraciones de miligramos por kilogramo de tejido. El cobre, el cobalto, el cromo, el yodo, el hierro, el flúor, el manganeso, el molibdeno, el selenio y el zinc son esenciales para el crecimiento y desarrollo normales de animales y humanos. (Lockitch 1996)

Uno de los elementos traza a los que se han enfocado numerosas investigaciones, es el zinc, debido a su importancia en el sistema inmune. Durante las últimas dos décadas se han realizado diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, en animales y en humanos que muestran que el zinc es esencial en el desarrollo y función normales de diversos tejidos y células del sistema inmune. Los avances realizados en el área de la biología celular y molecular han aportado datos que explican el papel del zinc en la expresión genética, la proliferación y la apoptosis de células linfoides. (Mulhern *et al* 1985, Cunningham- Rundles *et al* 1990, Fraker y Telford 1997)

2.1 Función biológica del zinc

El zinc posee características químicas que le permiten participar en múltiples procesos bioquímicos, por ejemplo, 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. (Bramblia *et al* 1994)

El zinc modifica la estabilidad de la membrana celular, posiblemente debido a que es capaz de formar mercáptidos con los grupos tioles de las proteínas, o debido a su posible interacción con los grupos fosfato de fosfolípidos y con los grupos carboxilo de los ácidos siálicos. Esto es importante ya que se puede alterar el ensamblaje de receptores de la superficie celular y canales iónicos que podrían afectar la transducción de señales, además, se podría cambiar la zona de contacto con otras células y con la matriz

extracelular. Otro efecto también importante en la señalización celular es la inhibición por el zinc de algunas funciones estimuladas por calmodulina, proteína que une calcio y que puede unirse a otras proteínas de acuerdo a los cambios de calcio intracelular, su unión modifica la actividad de muchas enzimas y proteínas que participan en el transporte membranar. (Wellinghausen *et al* 1997) Diversas investigaciones han reportado interacciones del zinc con la proteína cinasa C, enzima que tiene un papel central en la transducción de señales provocada por la activación del receptor al unirse a su ligando, seguido por una elevación en el recambio de fosfatidilinositol. (Wellinghausen *et al* 1996)

Se conoce también que el zinc tiene un importante papel en el crecimiento y desarrollo. Las acciones del zinc sobre el crecimiento pueden dividirse en tres tipos: 1) acción sobre el gusto y el olfato, regulación del apetito y regulación en el consumo de alimentos; 2) acción estimulante en la síntesis de DNA y RNA, que conduce a la replicación celular y la diferenciación de condrocitos, osteoblastos y fibroblastos, además afecta la transcripción celular, que resulta en la síntesis de somatomedina-C (hígado), fosfatasa alcalina, colágeno y osteocalcina (hueso), y 3) su acción en la síntesis hormonal, por ejemplo, su participación en la síntesis de GH (hormona del crecimiento), y la interacción del Zn con hormonas relacionadas con el crecimiento óseo como la testosterona, las hormonas tiroideas, la insulina y la vitamina D3 (Brandao-Neto *et al* 1995).

El zinc también tiene una actividad moduladora en la transmisión sináptica, ya que interactúa con sitios específicos en los neurotransmisores neurotrópicos. La función del zinc en el sistema nervioso es compleja, ya que actúa como inhibidor de los receptores de GABA. (Westbrook y Mayer 1987)

Zinc y hormonas

El zinc afecta la síntesis, la secreción y la actividad periférica de las hormonas, así como estas últimas pueden influir en el metabolismo del zinc a varios niveles. Esto se ha comprobado, mediante el estudio de animales que fueron privados de zinc en su dieta, éstos presentaron niveles plasmáticos

reducidos de algunas hormonas y neurotransmisores; como son: insulina, GH, tirotrópina, hormonas tiroideas, gonadotropinas, testosterona y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), mientras que otras hormonas se encontraron en niveles incrementados, entre estas últimas se pueden citar la prolactina (PRL), el cortisol, la corticosterona y las catecolaminas. (Fabris *et al* 1990)

Existe una relación directa entre los niveles de zinc en sangre y los de testosterona, hormona que posee actividad anabólica. Por otro lado, el zinc se ha encontrado en altas concentraciones en el páncreas de diferentes especies, observándose que el elemento es esencial para la síntesis, cristalización y acción periférica de la insulina. (Brandao-Neto *et al* 1995).

Se ha demostrado que el zinc se une al factor tímico sérico (FTS o timulina), en proporción equimolar, dicho factor presenta actividad biológica cuando el péptido está unido al Zn, mientras que cuando no se encuentra unido al metal es capaz de unirse a sitios blanco, pero dicha forma es inactiva y probablemente evita que la forma activa ejerza su acción. (Fabris *et al* 1990)

Zinc y enzimas

Se han identificado más de 200 metaloenzimas, las cuales participan en procesos metabólicos relacionados con la síntesis y la degradación de lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos (Tabla I). En todas las enzimas que han sido analizadas por cristalografía, el átomo de zinc estructural se coordina con 4 cisteínas, mientras que los átomos de zinc localizados en los sitios activos de las enzimas se coordinan con 3 aminoácidos de la proteína y con una molécula de agua. (Bramblia *et al* 1994)

Tabla I. Enzimas con requerimientos primarios de zinc

Fosfotransferasas	Polimerasas
Timidina cinasa	RNA polimerasas
Piruvato cinasa	DNA polimerasas
Adenilato cinasa	
Desoxinucleotido transferasa	
	Fosfatasas
Hidrolasas	Fosfatasa alcalina
Diadenosina tetrafosfato hidrolasa	Fosfatasa creatina
Peptidilpéptido hidrolasa	ATPasa
	Fosfolipasa A2
Deshidrogenasas	Peptidasas
Deshidrogenasa alcoholica	Carboxipeptidasa A
Superóxido dismutasa	Carboxipeptidasa B
Deshidrogenasa láctica	Carboxipeptidasa N

Tomado de Fabris et al 1990

Zinc y control transcripcional

Para que un gen se exprese, se requiere que las proteínas conocidas como factores de transcripción interactúen con un segmento del gen llamado promotor. Algunos de estos factores de transcripción contienen sitios de unión al DNA denominados dedos de zinc (zinc fingers), los cuales parecen ser adecuados para el reconocimiento del DNA. Su estructura está constituida por dominios formados por repeticiones de aproximadamente 30 aminoácidos, entre los que se encuentran dos histidinas y dos cisteínas invariables a los que se une el metal; esto provoca que tales secuencias se plieguen alrededor del átomo de zinc formando un complejo tetracoordinado. (Rhodes 1993)

Por otro lado existen reportes, que indican que la actividad de las polimerasas de DNA y RNA en diversos tejidos o cultivos celulares puede verse afectada por la deficiencia de zinc. (Brandao-Neto et al 1985)

Actividad antioxidante

Bajo condiciones *in vitro* en sistemas biológicos se ha observado que el zinc actúa como antioxidante interactuando con grupos sulfhidrilo de proteínas, inhibiendo su oxidación. *In vivo*, induce la síntesis de metalotioneínas, proteínas que tienen la propiedad de eliminar radicales libres. También, la administración

de zinc puede inhibir la toxicidad de agentes como el tetracloruro de carbono, el etanol y las radiaciones ionizantes. (Walsh *et al* 1994)

2.2 Absorción del zinc

Ingesta de zinc en la dieta

La fuente más importante de zinc es la carne de res, de cerdo y el pescado. (Walsh *et al* 1994)

La disponibilidad del zinc es baja en dietas compuestas de cereales no refinados; por lo que el zinc está más disponible en dietas de origen animal que en fuentes vegetales. El fitato, presente en los granos y vegetales, inhibe la absorción del zinc ya que este forma complejos con el fitato a pH alcalino. Otros inhibidores de la absorción del zinc incluyen la lignina, algunas hemicelulosas, fosfopéptidos de calcio derivados de la digestión de la caseína y el calcio, como se muestra en la tabla II. (Çavdar *et al* 1991)

Tabla II. Factores asociados con una disminución en la absorción de zinc

Factores en la dieta	
Calcio	Ausencia de una apropiada absorción Acrodermatitis enteropática (AE)
Cobre	
Hierro	
Fitato	
Fibra (ciertas hemicelulosas)	
Lignina	
Alcohol	
Acidos grasos poliinsaturados	
Disfunción gastrointestinal	
Enfermedad en la mucosa intestinal	
Síndrome de malaabsorción	
Cirugía	

Tomado de Walsh *et al* 1994

Requerimientos de zinc

Los niños, los adolescentes y las mujeres embarazadas tienen requerimientos más altos de zinc que los adultos. Esto se comprobó analizando el recambio de ⁶⁵Zn en ratones durante la gestación, la lactancia y el destete, observándose que la pérdida de zinc corporal es el doble de la observada en

hembras no preñadas. En los primeros meses de la lactancia en el humano, la leche materna proporciona aproximadamente 2 a 3 mg de Zn diarios, cantidad que decrece gradualmente a cerca de 0.6 mg/día a los seis meses.

Tabla III. Requerimientos de zinc de distintas especies

ESPECIES		REQUERIMIENTOS
Ratas	Todas las clases	12 mg/kg
Ratones	Todas las clases	30 mg/kg
Humanos	Niños	5-10 mg/día
	Adultos	12-15 mg/día
	Lactantes	16-19 mg/día

Tomado de da Silva 1991

Absorción gastrointestinal

Una vez en el intestino, el zinc se asocia con metalotioneínas y con otras proteínas por un proceso dependiente de energía. La mayor velocidad de absorción se presenta en el yeyuno (357 ± 14 nM/min/40 cm), comparado con el duodeno (230 ± 33 nM/min/40 cm) e íleo (84 ± 10 nM/min/40 cm) esto se determinó por una técnica de perfusión intestinal realizada en humanos. (Walsh *et al* 1994) La absorción intestinal del zinc es estimulada significativamente por la adición de glucosa sin que se vea incrementada la absorción de agua y sodio. (Jameson 1993)

Los trastornos genéticos en el metabolismo del zinc, como la acrodermatitis enteropática en humanos, presentan un defecto en la absorción de zinc resultando en deficiencia grave del microelemento. La causa específica de la falla en la absorción no se conoce, pero se tienen reportes de que las proteínas intestinales ricas en cisteína (CRIP) están involucradas en el transporte de Zn a través de la membrana intestinal en los animales normales. (Bremner y Beattie 1995)

Ligandos

Durante la digestión, el zinc se libera de los ligandos a los que se une en los productos alimenticios, por ejemplo, en la leche los principales ligandos son: histidina, D-penicilamina, ácidos grasos esenciales y prostaglandinas; después el zinc se asocia con otros presentes en las microvellosidades intestinales,

algunos de estos ligandos son aminoácidos como la histidina que provienen de la dieta, otros, como las metalotioneínas, pueden ser de origen endógeno; y otros más incluyen el ácido cítrico, el ácido piconílico, las inmunoglobulinas y la lactoferrina.

Transporte plasmático

Después de su absorción, el elemento se une a varias proteínas del plasma para ser transportado hacia los diferentes órganos. Aproximadamente el 66% del zinc en la circulación está unido a la albúmina y un poco más del 32% del metal se une a la α -2 macroglobulina. El uno o dos por ciento del zinc plasmático puede estar asociado con aminoácidos libres. El zinc plasmático y eritrocitario representa aproximadamente del 10 al 20 % del zinc corporal. (Scuderi 1990)

Influencia del estado fisiológico en la absorción

- **Edad**

Debido a que la capacidad de absorción del zinc por el intestino en varias especies, se reduce con la edad, los ancianos tienen un mayor riesgo de mostrar una deficiencia. (Fabris *et al* 1990, Mocchegiani E. *et al* 1995)

- **Deficiencia en la dieta**

En modelos experimentales se ha observado un aumento en la absorción de zinc en animales con una dieta deficiente del elemento, mientras que con un exceso se ve disminuida. (Walsh *et al* 1994)

- **Embarazo**

La absorción de zinc también se ve incrementada durante el embarazo, observándose una reducción después del parto, en algunas ocasiones el zinc puede ser depositado en el hígado, esto debido al pronunciado anabolismo que existe durante ésta etapa. Estudios realizados en ratas preñadas demuestran que durante la etapa final del embarazo la capacidad intestinal para absorber zinc aumenta como consecuencia del desarrollo exponencial del feto. (Lindsay *et al* 1994)

2.3 Sitios de almacenamiento

El zinc se almacena principalmente en el músculo y la médula ósea, sin embargo, la deficiencia del metal se desarrolla rápidamente cuando la ingesta se reduce. En la tabla IV se muestra la concentración de zinc en tejidos de distintas especies.

Tabla IV. Concentración comparativa de zinc en diferentes tejidos.

Tejido	Concentración de zinc
Plasma (humano)	110 ± 14.8 µg/dL
Linfocitos (humanos)	50.9 ± 5.9 µg/10 ¹⁰ cels
Plasma (murino Balb/c)	114.8 ± 4.47 µg/dL
Hígado (murino C57BL/6)	1.29 ± 0.08 µmol/g de tejido seco

Tomado de Walsh *et al* 1994 y Morgan *et al* 1988.

Los cambios característicos en el metabolismo del zinc después del estrés, son: una disminución rápida y significativa en las concentraciones plasmáticas del elemento asociadas con un incremento en el contenido de zinc hepático.

2.4 La excreción del zinc

Aproximadamente del 5 al 10 % de la excreción diaria de zinc es renal, el resto es excretado en fluidos pancreáticos o en la bilis. La excreción fecal diaria de zinc varía entre 5-10 mg/día y depende de la dieta. En condiciones patológicas acompañadas por diarrea y mala absorción se observan pérdidas fecales excesivas de zinc. El zinc fecal está compuesto de zinc proveniente de la dieta que no fue absorbido y del zinc endógeno que proviene de la bilis, del fluido pancreático y de células de la mucosa intestinal. La secreción de Zn endógeno aumenta cuando la fuente de proteínas de la dieta es de origen vegetal. (Bremner y Beattie 1995, Walsh *et al* 1994)

El zinc también es secretado por la orina, en humanos aproximadamente de 200 a 600 µg de zinc se pierde por día en la orina y en ratones 1.14 µg, lo que corresponde a menos del 10% de la cantidad consumida en la dieta, sin embargo, la excreción renal es sensible a los cambios en el *status* de zinc. Por

ejemplo, en un experimento realizado en humanos por Babcock A. *et al*, un incremento de 11 veces en la ingesta de zinc debido a la suplementación con ZnSO₄, produjo un incremento del 37% en el zinc plasmático, y un aumento de 188% en la excreción diaria de zinc en la orina; lo que indica que el incremento en los niveles plasmáticos de zinc aumenta la depuración renal, posiblemente debido a una mayor filtración y/o a una reabsorción disminuida. (Walsh *et col* 1994)

2.5 Evaluación del *status* de zinc

La concentración de zinc sérico o plasmático es aún la prueba más común para evaluar el *status* de zinc. El 65% del zinc sérico se encuentra unido a la albúmina y por lo tanto puede estar disminuido en la hipoalbuminemia. La concentración plasmática de zinc muestra variaciones diurnas y se ve disminuida fuertemente en las respuestas de fase aguda con movilización de zinc de los tejidos; en una situación grave, el monitoreo del *status* de zinc requiere pruebas séricas periódicas hasta que se mantenga estable. (Linder 1991, King 1990)

También las mediciones de la concentración de zinc en saliva, semen, pelo, sudor, fluido amniótico, leucocitos, células mononucleares, glóbulos rojos o plaquetas y la estimación de la excreción renal y fecal han sido utilizadas en la clínica para determinar el estado nutricional de los pacientes. Otras pruebas funcionales incluyen la determinación de la fosfatasa alcalina, la deshidrogenasa láctica, la ribonucleasa, la anhidrasa carbónica, además de la agudeza del olfato y gusto. (Jameson 1993, Linder 1991)

2.6 El zinc y las metalotioneínas

Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteína y tienen sitios de unión a metales; existen en diferentes isoformas dependiendo de la especie animal y del tejido en que se localicen. Las diferentes isoformas de las metalotioneínas están codificadas por diferentes

genes los cuales se encuentran en el mismo cromosoma y se expresan de manera coordinada. (Cousins 1985)

La síntesis de las metalotioneínas es un proceso complejo, ya que se induce por Zn, Cu y Cd, pero también por factores fisiopatológicos en los que se promueve transcripción genética directamente por metales o indirectamente por cambios en los niveles de citocinas o esteroides.

Los cambios rápidos en las concentraciones de metalotioneínas en respuesta a la administración de metales, implica que estas proteínas inhiben la acción deleterea del exceso de cationes. Por otra parte, los complejos de zinc-metalotioneína pueden estar involucrados con diversos procesos metabólicos, actuando de manera directa vía interacción con apoproteínas y apoenzimas, o indirecta por regulación de la concentración de zinc libre en el interior de las células. (Bremner y Beatle 1995)

2.7 El Zinc en las etapas perinatales

El zinc es un nutrimento esencial para el crecimiento y la diferenciación celular de todas las especies y tiene un papel trascendental en el desarrollo fetal y embrionario, especialmente en el sistema nervioso. En la actualidad está bien definido el efecto teratogénico de la deficiencia de zinc en los mamíferos, algunas de las anomalías observadas cuando se produce una deficiencia severa de zinc en las ratas son: labio y paladar hendido, malformaciones del sistema nervioso (defectos en el tubo neural), así como numerosas anomalías del corazón, pulmón, hígado y sistema urogenital y defectos en el esqueleto óseo. Además de éstas anomalías morfológicas, también se han observado alteraciones en la conducta y defectos en las funciones pancreática y pulmonar, y como se explicara más adelante, en la respuesta inmune. Entre los mecanismos propuestos para explicar la teratogenicidad de la deficiencia del zinc se encuentra, la reducción en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, disminución en el grado de polimerización de tubulina, aumento en la oxidación de macromoléculas, defectos en la membrana celular,

expresión génica alterada, reducción en la unión de hormonas y factores de transcripción dependientes de regiones de dedos de zinc, y alteración en el ciclo celular. (Wellinghausen *et al* 1997, Jameson 1993, Beach *et al* 1982)

Es bien conocido que los requerimientos de zinc aumentan durante el embarazo, esto es particularmente importante en mujeres de un nivel socioeconómico bajo las cuales no consumen la cantidad adecuada de zinc y de proteínas con lo que la biodisponibilidad del elemento se ve mermada, ocasionándose una deficiencia crónica marginal del microelemento. En modelos animales se ha observado que se puede presentar una interrupción en el ciclo estral si la deficiencia de zinc se induce una semana antes de la cruce, evitando el apareamiento y por lo tanto la fertilización. También se ha descrito que la carencia de Zn durante la gestación afecta el desarrollo de las glándulas mamarias y por lo tanto la transferencia de nutrientes de la madre al neonato. (Çadvar *et al* 1991, Beach *et al* 1983)

El zinc esta involucrado en el crecimiento intrauterino del feto. Existen numerosos reportes acerca de que el *status* del zinc en la madre esta íntimamente relacionado al peso del neonato, la edad gestacional al parto, partos prematuros, retraso en el crecimiento y preeclampsia. En un experimento, realizado por Goldenberg *et al*, en el que se estudió el efecto de la suplementación con Zn en una dosis de 25 mg/d en mujeres embarazadas, se observó un incremento significativo en el peso neonatal. En modelos animales también esta muy claro este fenómeno, ya que Beach observó que la deficiencia de zinc en ratones N:NIH(S) durante las etapas perinatales aumentó el grado de mortalidad y ocasionó anomalías físicas así como interrupción en el crecimiento de la progenie. Hasta ahora, los mecanismos por los cuales la suplementación con zinc durante el embarazo resulta en un incremento en el peso neonatal y en el crecimiento fetal, y la prolongación de la edad gestacional, permanecen poco comprendidos. (Goldenberg *et al* 1995, Garg *et al* 1993, Beach *et al* 1983)

Existen muchos trabajos que afirman que la deficiencia de zinc en el periodo neonatal resulta en parámetros inmunológicos anormales. Uno de los más importantes es el realizado por Beach *et al* que muestra una relación estrecha entre la deficiencia de zinc durante el embarazo e inmunodeficiencia persistente por tres generaciones en modelos murinos, estos estudios también señalan que la privación marginal de zinc causa una reducción significativa en la respuesta inmune cuando ocurre durante ciertas etapas del desarrollo. (King *et al* 1995, Tamura *et al* 1992, Beach *et al* 1983, Luecke y Fraker 1979, Golden *et al* 1977)

Todo lo anterior es relevante, ya que estudios realizados en individuos aparentemente bien nutridos, indican que las mujeres embarazadas, las mujeres lactando y los niños pueden sufrir deficiencias marginales o incluso carencia severa de este elemento traza.

2.8 Deficiencia y exceso de zinc

La deficiencia de zinc está caracterizada por retardo en el crecimiento, deficiente cicatrización de heridas, rash, pérdida de cabello, ceguera nocturna, desordenes en el sistema nervioso, alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos y defectos inmunológicos, particularmente en las funciones de las células T con un incremento en la susceptibilidad a infecciones. (Tabla V)

Las deficiencias de zinc pueden clasificarse de acuerdo a su origen, en: hereditarias, adquiridas primarias (debido a la dieta), o secundarias (condicionadas). Las deficiencias de zinc adquiridas se presentan frecuentemente por una suplementación inadecuada en la nutrición parenteral, acompañadas por malnutrición proteico-energética y/o mala absorción. Las deficiencias adquiridas secundarias pueden presentarse como resultado de quemaduras severas, terapia anticonvulsivante, el tratamiento con penicilamina, la quelación en la enfermedad de Wilson, y por pérdidas urinarias excesivas de zinc. (Bremner y Beattie 1995, Michel *et al* 1993, Linder 1991)

informado en incidentes de ingestión accidental, infusión intravenosa o por contaminación durante la hemodiálisis. En otro reporte, en el que un individuo de 16 años ingirió 12 g del metal en un período de dos días, se reportó letargia, vértigo, y dificultad al escribir, todos estos síntomas desaparecieron al aplicar una terapia quelante. (Walsh *et al* 1994, Fosmire 1990) En un modelo murino (BALB/c) se ha visto que la suplementación con 1000mg/L durante la gestación, la lactancia y el destete tiene un efecto negativo en el valor del hematocrito y se observó una disminución no significativa en el peso corporal de los animales. (Lastra *et al* 1996)

Dosis farmacológicas

La suplementación oral con zinc en dosis terapéuticas (20 mg/d en humano) puede causar daño gastrointestinal y ulceración gástrica. También se ha demostrado que la terapia prolongada con suplementos del elemento, puede producir deficiencia severa de cobre, acompañada por anemia, leucopenia y neutropenia; éste efecto se utiliza terapéuticamente en el tratamiento de la enfermedad de Wilson. La interrupción en el uso de estos suplementos permite una aparente normalización en el *status* de cobre. (Fosmire 1990)

En un estudio realizado por Chandra, en once voluntarios masculinos, se demostró que después de administrar 300 mg Zn/d en un período de seis semanas, algunas funciones inmunológicas se deprimían como el índice de estimulación linfocítica, la migración quimiotáctica y la fagocitosis, si se compara con los valores obtenidos antes de la suplementación. Además, se observó un incremento en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y una disminución en las de alta densidad (HDL), sin embargo, las concentraciones de triacilgliceroles y colesterol total no se modificaron significativamente. (Jameson 1993, Beach *et al* 1983)

De lo anterior se puede deducir, que la prescripción de dosis farmacológicas de zinc, particularmente cuando la ingesta es por períodos prolongados, puede dar lugar a reacciones potencialmente adversas.

2.9 El zinc y el sistema inmune

La mayoría de trabajos están enfocados ha estudiar el efecto de la deficiencia del zinc en la respuesta inmune especifica, sin embargo, la influencia del zinc en los mecanismos inespecificos ha recibido poca atención(tabla VI), entre las consecuencias que se pueden mencionar se encuentran: lesiones en la piel, lesiones gastrointestinales que provocan cambios degenerativos sobre los enterocitos, daños en las microvellosidades así como alteraciones en la función pulmonar. (Lastra y Espinosa 1993).

Tabla VI. Consecuencias inmunologicas de la carencia de zinc.

Tejido o célula afectada	CONSECUENCIAS
Histología	Atrofia tímica Anormalidades estructurales de las áreas dependientes de T
Timo	Producción hormonal reducida Activación de timulina periférica (Zn-FTS) reducida
Linfocitos T	Proliferación y diferenciación reducida de linfocitos T Actividad defectuosa de las células T cooperadoras
Linfocitos B	Disminución en la respuesta a mitógenos Respuesta por anticuerpos disminuída hacia antígenos dependientes de T Respuesta normal a antígenos dependientes de B
Células Asesinas Naturales (NK)	Actividad disminuída

Tomado de Walsh *et al* 1994

Efecto del zinc sobre los tejidos linfoides y el sistema inmune.

La deficiencia de zinc en ratones y humanos causa atrofia del timo y de los nódulos linfáticos y reacciones deficientes de hipersensibilidad cutánea mediada por células. Los linfocitos aislados de animales deficientes de zinc muestran una respuesta disminuída a mitógenos y una reducción en la producción de anticuerpos dependiente de T, más aún, cuando se administra una dieta deficiente en zinc a animales de experimentación se produce una respuesta deficiente de las células T cooperadoras (CD4⁺) acompañada por una

disminución en la actividad de las células NK. Los ensayos encaminados a conocer la función del zinc en el desarrollo y función de diferentes poblaciones de células linfoides, indican que este elemento influye principalmente en el linfocito T. Sin embargo, los resultados de experimentos en cultivos mixtos con células de ratones deficientes en Zn, han puesto de manifiesto que la depresión observada en la proliferación de las células T es indirecta y debida a un defecto primario en la población de macrófagos. Este fenómeno se hace reversible al aumentar el número de macrófagos en el cultivo. También se conoce que la producción y acción de algunas citocinas, es dependiente de Zn, por ejemplo en monocitos este microelemento induce la síntesis de IL-1, IL-6 y TNF, y en linfocitos T la producción de IL-2 y de interferón entre otros. (Cunningham-Rundles *et al* 1990, Wellinhausen *et al* 1997, Lastra y Espinosa 1993).

Se conoce que la expresión del gen de la interleucina-2, que resulta del reconocimiento del antígeno por los linfocitos T, es crucial para la subsecuente diferenciación y proliferación de esta población, habiéndose definido varios factores reguladores necesarios para la activación del proceso, sin embargo, se conoce poco sobre la regulación negativa de la expresión de IL-2, donde parece estar involucrada la síntesis de una proteína de Zn. (Driessen 1995)

El efecto mitogénico del zinc en linfocitos T, que se ha observado en experimentos *in vitro*, indica que este microelemento puede actuar directamente en las células del sistema inmune, además, el zinc es requerido por la enzima nucleósido fosforilasa la cual es indispensable para el funcionamiento de los linfocitos T. El zinc también puede influir el sistema inmune a través de su acción en la actividad biológica de la timulina. Se ha demostrado que en condiciones caracterizadas por deficiencia de zinc, como aquellas asociadas con la edad o con enfermedades congénitas, o infecciosas como el SIDA, se observa una reducción en el nivel de timulina activa circulante, acompañada por una aparición concomitante de moléculas inactivas del factor tímico sérico (el zinc no se encuentra unido al péptido). (Mocchegiani y Fabris 1995b, Fabris *et al* 1990, Prasad *et al* 1988, Murray *et al* 1983)

Efecto del zinc sobre la inmunidad humoral

Algunos estudios realizados en esta rama indican que existe una severa disminución en los niveles séricos de IgG en pacientes que presentan deficiencia de zinc unida a malnutrición protéico-energética; otros hallazgos sugieren que la carencia de zinc provoca alteraciones en la distribución de las inmunoglobulinas. (Chandra 1989)

En un experimento realizado por Fraker *et al*, en el que se enfocaron principalmente a células de linaje B en la médula de ratones adultos jóvenes, la deficiencia moderada de zinc (MDZ) causó una disminución del 43% en la población de células nucleadas que exhibían el marcador B220, mientras que en aquellos animales con una deficiencia severa de zinc (SZD) la disminución fue del 91%. Las células B (B220⁺Ig⁻) fueron más sensibles a la deficiencia, pues la deficiencia moderada de zinc produjo una reducción de células nucleadas del 60%. Las células B inmaduras (B220⁺IgM⁺IgD⁻) se vieron afectadas en forma similar, sin embargo, en ratones con MDZ, las células B maduras (IgM⁺IgD⁺), presentaron una resistencia moderada. El análisis por citometría de flujo indicó que la deficiencia de zinc causaba un aumento en las células NK con un incremento paralelo en la proporción de células nucleadas que presentaban Mac-1 tanto en deficiencias moderadas como graves. La depleción de las células de linaje B en la médula como resultado de la deficiencia de Zn, indica que existe una alteración en el proceso linfopoyético de la médula, lo cuál parece ser la clave de la linfopenia resultante en muchos tipos de malnutrición. (King LE *et al* 1995, Fraker *et al* 1995)

Efecto sobre la función de las células fagocíticas.

Se ha demostrado que la falta de zinc afecta la permeabilidad de la membrana del macrófago y la actividad fagocítica. (Beisel 1992)

Un estudio encaminado a observar el efecto regulador del zinc en la inducción de la síntesis de citocinas por superantígenos y lipopolisacárido, en células mononucleares de sangre periférica y monocitos purificados mostró que

el zinc aumenta significativamente la producción de IL-1 β (después de 48h de cultivo) y de TNF- α (después de 24h) en forma dosis-dependiente, lo que sugiere que la función del zinc es probablemente mediada por activación del monocito y la liberación de citocinas. (Driessen *et al* 1995)

2.10 Desarrollo e involución del timo

El timo es un órgano linfoide primario que proporciona el microambiente especializado donde ocurre el rearreglo genético y la maduración de los timocitos. Después de la expresión del receptor de la célula T, los linfocitos experimentan dos procesos esenciales en su desarrollo; la selección positiva, proceso por el cual se establece un repertorio celular restringido por las moléculas del MHC propias, y la selección negativa, en la cual se eliminan por apoptosis aquellas células que reconocen péptidos propios. (Paul 1993, George y Ritter 1996)

Embriología

El timo es un órgano complejo, altamente especializado, el cual embriológicamente tiene un origen múltiple, presentando componentes endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos. Durante la sexta semana de gestación en el humano, el endodermo recubre la porción ventral de la tercera bolsa faríngea formando una saculación pronunciada que subsecuentemente se desprende de la pared faríngea, dando origen al primordio tímico. Después de esto, el primordio tímico migra en dirección caudal y medial junto con la glándula paratiroidea. Durante la octava semana, el primordio tímico se extiende hacia su extremo inferior, formando dos barras epiteliales que se fusionan con la línea media, para ocupar su posición definitiva en el mediastino anterosuperior. Durante su movimiento descendente, la porción final del órgano se vuelve delgada, se alarga y fractura en pequeños fragmentos que usualmente desaparecen, aunque, pueden persistir en los tejidos blandos del cuello, frecuentemente en íntima conexión con la glándula paratiroidea.

Después que se ha completado la migración, las células epiteliales derivadas del endodermo forman redes reticulares fibrosas y los elementos mesenquimatosos presentes forman una cápsula alrededor de dichas estructuras. Como resultado del crecimiento de esta cápsula, se forman trabéculas que dividen al órgano en numerosos lóbulos. Para la décima semana, las células linfoides originadas en el hígado fetal y en la médula ósea llegan al timo, y el órgano se diferencia en corteza y médula; otras pequeñas estructuras tubulares compuestas de células epiteliales, aparecen también en este período, éstas más tarde forman los corpúsculos de Hassall. (Janeway y Travers 1994, Suster y Rosai 1990)

El peso relativo máximo del timo se alcanza al nacimiento, aunque el crecimiento absoluto del timo continúa hasta la pubertad, con un peso de 30-40g en el humano; después empieza su involución, por lo que permanece en un estado atrófico hasta la edad madura. (Paul 1993)

Estructura y microambiente tímico

El timo está envuelto por una cápsula de tejido fibroconectivo y una membrana basal que cubre el área cortical; estas dos capas están separadas por el área subcapsular fundamentalmente constituida por una capa continua de células epiteliales. El tejido fibroconectivo rico en colágeno entra y atraviesa la corteza, separando el timo en lobulillos; éste tejido fibroconectivo o trabécula, además, contiene fibroblastos, adipocitos y terminaciones nerviosas. El epitelio subcapsular reviste la superficie del órgano y los espacios perivasculares formando una barrera que separa el espacio intratímico propio del mesénquima vascularizado.

El estroma del timo es esencialmente una red de células epiteliales unidas entre sí por desmosomas, intercaladas entre éstas se encuentran células derivadas de la médula ósea. Estudios de microscopía electrónica y de inmunohistoquímica demostraron la heterogeneidad del estroma identificándose al menos seis tipos de epitelio distribuidos gradualmente del área subcapsular a la médula. El epitelio tipo 1 de la región subcapsular/ subtrabecular, es muy

importante ya que éste lugar es donde se inicia la timopoyesis; éstas células generalmente no presentan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II. (Paul 1993, Suster y Rosai 1990)

Las células epiteliales tipos 2, 3 y 4 forman el estroma de la corteza, éstas células epiteliales son positivas para las moléculas MHC clase I y II, y pueden secretar diversos factores como citocinas. Las células epiteliales tipo 2 y 3 parecen ser las enigmáticas células llamadas nodrizas, estas tienen vacuolas citoplásmicas en las cuáles albergan linfocitos inmaduros, la membrana que rodea estas vacuolas expresa moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad, por lo que su función no solamente es el aislar y proteger a las células T de un contacto prematuro con antígenos que las pudiera llevar a la muerte celular, sino que parece ser el sitio en el cual los linfocitos T empiezan su selección. (Boyd *et al* 1993)

La red epitelial medular está formada por los tipos celulares 3,5 y 6; las células tipo 5 están predominantemente localizadas en la unión corticomedular. Una característica exclusiva de la médula tímica es la presencia de estructuras queratinizadas conocidas con el nombre de corpúsculos de Hassall, ellas son más notorias en el timo humano y presentan las citoqueratinas 19 y 3/10 característica de un epitelio maduro, lo que sugiere que son el estado final de las células epiteliales tímicas.

Las células epiteliales tímicas (TEC), particularmente las poblaciones medular y subcortical producen citocinas y diversos péptidos entre los que se encuentran IL-1, IL-6, IL-7, TGF- β . Además, los timocitos activados secretan también diversas citocinas que tienen un efecto autocrino y paracrino; por ejemplo, el IFN γ que se secreta por los linfocitos T puede actuar en las células epiteliales tímicas y a su vez, las citocinas producidas por estas últimas promueven la proliferación y diferenciación de los timocitos señalando de esta manera la compleja interacción entre las células epiteliales tímicas y los linfocitos T, que comprende señales en ambas direcciones que conducen al desarrollo de los linfocitos T. (Ritter y Boyd 1993)

Componentes no epiteliales.

Se presume que los monocitos y los precursores de las células dendríticas llegan al timo junto con otras células tallo circulantes y se diferencian en éste órgano en macrófagos y células interdigitantes. Los macrófagos tímicos son fenotípica y ultraestructuralmente heterogéneos, los del tejido conectivo son grandes de forma irregular y contienen material electrodensito en su citoplasma; la característica principal de los macrófagos corticales es la presencia de múltiples lisosomas que contienen restos de linfocitos fagocitados, a diferencia de los macrófagos de la unión corticomedular que carecen de éste material fagocitado. (Ardavin 1997, Boyd *et al* 1993)

Los componentes de la matriz extracelular son también importantes en el microambiente tímico, entre estos se encuentran glicosaminoglicanos y glicoproteínas como la laminina y la fibronectina, estas estructuras normalmente se encuentran junto a las células epiteliales particularmente las tipo 1, entre sus funciones se puede mencionar que son el soporte del desarrollo de los timocitos, intervienen en las interacciones célula-célula incluyendo la migración y pueden unir citocinas solubles generando gradientes locales de concentración. Las diferentes poblaciones de timocitos y células epiteliales expresan diversos receptores para componentes de la matriz extracelular. (Boyd *et al* 1993, Paul 1993)

Algunos linfocitos B pueden encontrarse como agregados en los folículos linfoides o dispersos como células individuales. Los folículos linfoides con centros germinales activos se pueden observar en el timo normal, especialmente en el de niños y adolescentes. Las células plasmáticas son raras en el timo normal, están usualmente localizadas en el septo de tejido conectivo, o menos frecuentemente, en la médula. Pueden encontrarse en forma numerosa en el timo en involución.

Se acepta en la actualidad la presencia de células neuroendocrinas, en el timo normal, ya que han sido identificadas en la glándula de aves y reptiles y en menor grado en el timo de algunos mamíferos (incluyendo el humano). (Hadden

Linfocitos tímicos

Los precursores linfoides provenientes de la médula ósea migran a través de la sangre y llegan al timo por los vasos sanguíneos que se encuentran en la frontera entre la corteza y la médula, es decir, al nivel de la unión corticomedular; entonces éstas células atraviesan la corteza prácticamente en su totalidad y se ubican en el componente subcapsular donde empieza el fenómeno de maduración.

Los linfoblastos activos mitóticamente, presentes en la región subcapsular carecen de las moléculas CD4, CD8 y CD3, y comprenden aproximadamente el 15% de las células linfoides presentes en el timo. Bajo la influencia del microambiente subcapsular y cortical externo, los timocitos secuencialmente regulan la expresión de CD25 y CD44, se dividen y expresan CD4 y CD8, como consecuencia del rearreglo de la cadena β del receptor del linfocito T (TCR); esta población celular corresponde al 85% del total de los timocitos. La expresión selectiva de moléculas MHC clase II en la corteza tímica y las interacciones al nivel de la membrana plasmática entre las células epiteliales de esta región y las células T son particularmente importantes en el proceso de selección positiva, un paso crítico en la diferenciación de los timocitos. Inmediatamente después de que el TCR se expresa en la corteza, los timocitos con alta afinidad hacia péptidos propios son inducidos a tolerancia o al proceso de selección negativa, al parecer, esta selección es mediada por diversas células que expresan el complejo apropiado (péptido-moléculas del MHC), como células epiteliales, fibroblastos reticulares y macrófagos entre otras; la elección en el resultado del proceso entre delección clonal o anergia puede ser dependiente del estado de diferenciación en el que se encuentre la célula T y/o la presencia o ausencia de ciertas señales accesorias en las células involucradas; este evento resulta en apoptosis y fagocitosis activa, característica que da a esta área una apariencia de "cielo estrellado" y se hace particularmente evidente en la involución tímica accidental (debida a estrés). (Anderson y Jenkinson 1997, Owen y Jenkinson 1993)

Aún existe mucha controversia acerca de la función del epitelio medular en el proceso de diferenciación de las células T. Se ha demostrado que los linfocitos T CD4⁺ migran directamente a la periferia sin entrar a la médula; aunque algunos investigadores afirman que parte del proceso de maduración y selección también puede ser medular. (Anderson y Jenkinson 1997, Boyd *et al* 1993, Owen y Jenkinson 1993, Paul 1993)

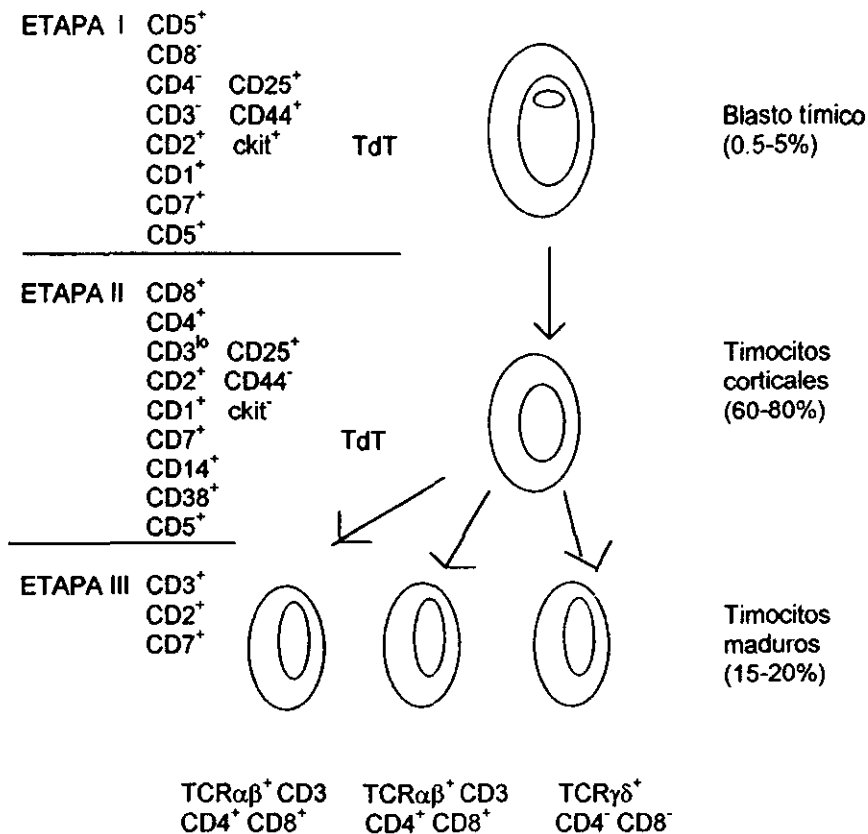


Figura 1 Secuencia en la maduración de los linfocitos tímicos. (Moreno 1996, Abbas 1997)

Involucion tímica

El timo experimenta un proceso lento de involución fisiológica con la edad, este comienza en la pubertad (en el ratón a las 4 semanas), cuando el órgano alcanza su peso máximo y la proporción de producción de células T

es muy grande. Este proceso de envejecimiento es conocido como "involución fisiológica", consiste en alteraciones atróficas graduales y progresivas y es acompañado por cambios graduales en las poblaciones de células relativas a diferentes índices de involución del epitelio tanto de la corteza como de la médula. En el humano, durante las primeras etapas, los cambios consisten principalmente en un decremento en el número de timocitos corticales, y en fases más avanzadas, el parénquima tímico adquiere una apariencia primitiva y es reemplazado por islas de células epiteliales sin linfocitos, que presentan agregados de corpúsculos de Hassall y tejido adiposo abundante.

Los cambios microscópicos más notables observados durante la involución, son relativos a la distribución, arquitectura y apariencia citológica de las células epiteliales; algunas de ellas adquieren apariencia mesenquimatosas, otros de sus arreglos comprenden formaciones similares a rosetas carentes de lumen central. Ya que estas características pueden encontrarse también, con alguna frecuencia en casos de displasia tímica y timomas, sugiere que los cambios involucrados en la involución representan estados regresivos y funcionalmente inactivos de las células epiteliales. (Suster y Rosai 1990)

Algunas veces, algunos remanentes tímicos están casi exclusivamente formados de elementos epiteliales, de manera inversa, algunos remanentes tímicos están constituidos casi exclusivamente de linfocitos, por lo que estos pueden parecer nódulos linfáticos.

Otro cambio drástico que puede presentarse, es la involución accidental o debida a algún tipo de estrés. Esta condición representa una respuesta dramática de la glándula tímica a episodios graves de estrés, en los cuales existe una liberación repentina de corticosteroides provenientes de la corteza adrenal que llevan a una depleción rápida de los linfocitos tímicos corticales.

Cuando las pérdidas de timocitos continúan, la arquitectura lobular se colapsa y se produce fibrosis. El timo entonces se transforma en una masa adiposa que contiene islas dispersas de parénquima con cantidades muy

pequeñas de linfocitos. (George y Ritter 1996, Suster y Rosai 1990)

A pesar de lo descrito anteriormente el número de células T maduras en la periferia no muestra una disminución similar, por lo que se ha sugerido que las células T son de larga vida o se renuevan ellas mismas, o ambas situaciones. Además, una vez que el repertorio de células T se establece, la inmunidad puede sostenerse sin la producción de grandes cantidades de nuevas células T. (Janeway 1994)

Se ha observado que la involución tímica aguda en la infancia se correlaciona con la duración de enfermedades agudas, como se ha observado en adultos y niños con SIDA. (Suster *et al* 1990)

La involución tímica y el embarazo

El timo se altera evidentemente durante el período de gestación y el tipo y magnitud de estos cambios depende de las interacciones nerviosas, endocrinas e inmunológicas.

La estructura del timo cambia dramáticamente durante el embarazo humano y animal. Cuando se estudió el embarazo alogénico en un modelo murino, el peso del timo se incrementó transitoriamente, seguido por una disminución drástica. Esta pérdida en el peso del órgano, se ha atribuido a la muerte celular y a una emigración de linfocitos pequeños de la corteza; también se ha visto que los nervios tímicos tienen menor cantidad de neurotransmisores. En la etapa final del embarazo, se aprecia la involución máxima de la corteza, y se mantiene hasta que la lactancia termina; después de esto, reaparece la noradrenalina en los nervios, la corteza se vuelve a poblar y el timo "recrece" rápidamente. (Clarke y Kendall 1994)

Los niveles de hormonas circulantes son importantes para determinar el grado de involución en el ratón, ya que se ha observado una correlación negativa en el número de embriones y la concentración de progesterona en circulación con el peso del timo. En algunas cepas de ratón, la involución

tímica puede ser prevenida por transplantes de piel del padre. (Clarke y Kendall 1994)

La función del timo durante el embarazo es compleja, este órgano pierde dos tercios de sus células inmaduras en este período, sin embargo, el significado de estos cambios todavía no es claro, aunque, se piensa que influye la capacidad de la madre para proteger al feto de respuestas inmunes perjudiciales a antígenos paternos.

Teorías propuestas para explicar la involución tímica

En humanos, el incremento sustancial de los tejidos graso y conectivo y del espacio perivascular compensan la disminución de las áreas verdaderas del timo, por lo que el tamaño permanece constante a través de la vida. En contraste, la pérdida de tejido tímico en el ratón, no se ve acompañada por una expansión de los tejidos conectivo y graso produciéndose una reducción significativa del tamaño total tímico con la edad. La involución del timo no es sólo la reducción en el tamaño, sino también la disminución en la producción de células T, por lo que el timo que se mantiene es menos eficiente, produciendo menos células de las esperadas. Así, por ejemplo, se ha estimado que el timo de un ratón viejo produce sólo el 0.7% del número de células T producidas en un recién nacido. Esta pérdida en la estructura y función tímica es única en el sistema inmune. (George y Ritter 1996)

Existen varias teorías que intentan explicar el envejecimiento tímico, sin embargo, ninguna es totalmente clara hasta ahora. Una de ellas, sostiene que la involución es un proceso adaptativo; es decir, un tejido que experimenta un alto grado de proliferación y reorganización puede por sí mismo ser de alto riesgo de transformación maligna. Esto supone que hay una desventaja directa en la producción continua de células inmunes a lo largo de la vida del animal, ya que se incrementa el riesgo de autoinmunidad. Otra teoría argumenta que el proceso de envejecimiento está visto como el resultado de una optimización, es decir, que los organismos deben balancear el reparto de energía, con objeto de hacer óptimo el uso de su energía y maximizar su capacidad para reproducirse. El timo en infantes humanos es un órgano

relativamente grande, alcanza en promedio poco más de 20 g a los 6 meses (aprox. 0.5% del peso corporal total) y contiene aproximadamente 10^{11} timocitos de los cuales el 20-25 % son producidos por división celular cada día. Este proceso es muy costoso, ya que el 95 % de los timocitos mueren en el timo como resultado del mecanismo diseñado para eliminar células autoreactivas y para seleccionar un repertorio de células restringidas por el MHC, con lo anterior se propone que mientras el timo es muy eficiente desde el punto de vista inmunológico el gasto de energía y recursos es muy alto.

Parece razonable, decir que el timo, experimentará su involución y la pérdida de la función rápidamente. El *Homo sapiens* tenía una vida corta debido a la depredación o al padecimiento de distintas enfermedades, y vivía en pequeños grupos con relativa poca movilidad, por lo que en los primeros años de vida, muchos de esos individuos habrían estado expuestos a la mayoría de los patógenos en su ambiente, y habrían desarrollado un repertorio de células T de memoria, por esto el contacto con nuevos patógenos sería poco probable y el gasto de mantener un timo totalmente funcional, para mantener la producción de nuevas especificidades de células T no estaría justificado. Sin embargo, recientes investigaciones han enfatizado el incremento de la morbilidad en la vida actual, ya que se explica que la vida en las grandes ciudades implica que los humanos estén expuestos a nuevos patógenos durante su vida, por lo que se necesita mantener la capacidad para producir nuevas células T. (George y Ritter 1996)

2.11 El zinc y el timo

Entre los cambios fisiológicos que se observan como respuesta a la deficiencia de zinc están la atrofia tímica y la linfopenia, por ejemplo, en un experimento en ratones, la administración de una dieta deficiente en Zn por 30 días, provocó atrofia tímica extrema (70-80%) acompañada de hipoplasia esplénica; sugiriendo que la deficiencia del elemento altera la linfopoyesis o la producción de nuevos linfocitos por la médula ósea. (Fraker *et al* 1995)

Experimentos y evidencias clínicas apoyan la idea que al avanzar la edad, el sistema inmune experimenta un deterioro progresivo de su eficiencia; al parecer esto depende en gran medida de la involución del timo, fenómeno considerado irreversible y uno de los eventos más tempranos relacionados con la edad. Como la edad avanza el timo muestra una declinación progresiva en su función, que se demuestra por el tamaño reducido del órgano, y la evidencia histológica de hipotrofia de la corteza, también los niveles plasmáticos de hormonas tímicas como timosina α_1 , timopoyetina, y la timulina cuya forma activa contiene Zn, están disminuidos. Las causas de ese deterioro se desconocen, pero se ha sugerido que la disminución progresiva de la actividad endocrina tímica puede ser debida a algunas alteraciones de las células epiteliales que se vuelven incapaces de sintetizar y/o liberar dichos factores o bien a la presencia de otros mecanismos extrínsecos que parecen controlar la función del epitelio endocrino. Experimentos realizados en el ratón han demostrado que ambos mecanismos pueden estar involucrados. (Hadden 1998, Mocchegiani y Fabris 1995b)

Los factores ambientales que incluyen a los factores neuroendocrinos, son de importancia primaria, ya que algunos de ellos influyen en la actividad endocrina del timo. (Clarke y Kendall 1994, Mocchegiani y Fabris 1995b) Se ha demostrado que la involución tímica relacionada con la edad puede ser revertida por algunas manipulaciones endocrinas que se conoce afectan el crecimiento tímico durante el desarrollo, por ejemplo, la administración de hormonas como la tiroxina (T4) y la hormona del crecimiento o bien la administración de inhibidores de la hormona luteinizante. (Fabris *et al* 1990)

A pesar de la información existente se desconoce el mecanismo preciso por el cual el zinc ejerce su acción en el timo, pero se sabe que la suplementación con el metal puede reactivar la cascada enzimática necesaria para la síntesis de péptidos tímicos o que la suplementación puede corregir el recambio de algunas hormonas, importantes en el funcionamiento tímico.

El zn y la apoptosis

La apoptosis es particularmente importante para la fisiología del sistema inmune se acepta como modelo de muerte de los centoblastos con baja afinidad para el antígeno en los centros germinales y el mecanismo efector de los linfocitos T citotóxicos y de las células NK. También los timocitos que presentan receptores de células T de alta afinidad para los antígenos propios son clonalmente suprimidos durante el desarrollo del timo por este tipo de muerte. (McConkey 1994, Duke 1991)

La apoptosis o muerte celular programada es un tipo activo de muerte celular, que ocurre en diversas condiciones fisiopatológicas. Una de las características más importantes de ésta es que la muerte celular es precedida por fragmentación del DNA, consecuente con la activación de la endonucleasa nuclear dependiente de Ca y Mg. Se ha visto que dicha fragmentación puede ser inhibida por iones Zn. (Cohen 1993, Barbieri *et al* 1992)

En diversos reportes se propone que el zinc es capaz de inhibir la apoptosis, sin embargo, se ha demostrado por diversos experimentos, que a pesar de que el zinc inhibe completamente la fragmentación del DNA y por lo tanto su pérdida, no protege a los timocitos murinos de la muerte espontánea o inducida con dexametasona. Los datos también sugieren que la fragmentación del DNA aunque característica, no es un evento crítico para la muerte de tipo apoptótico de los timocitos. (Treves *et al* 1994, Barbieri *et al* 1992)

Muy recientemente el grupo de Fraker y Telford ha proporcionado nuevos datos que sugieren que el zinc, lejos de ser un bloqueador de la apoptosis, es un modulador de éste tipo de muerte, ya que grandes concentraciones del metal (500-1000 μ M) prevenía la muerte celular, sin embargo, al utilizar concentraciones entre 80-200 μ M de zinc se pudo inducir la apoptosis de células inmaduras CD4⁺CD8⁺ $\alpha\beta$ TCR^{lo} CD3^{lo}. Además, mostraron que cuando se inducía la apoptosis por los glucocorticoides, el "efecto protector" del zinc es sólo transitorio. (Fraker y Telford 1997)

Otro dato interesante es que la malnutrición puede inducir apoptosis en ciertas células y tejidos, especialmente en precursores linfoides. (Shankar y Prasad 1998, Fraker y Telford 1997)

2.12 La suplementación con zinc

Las observaciones realizadas en los estados de deficiencia de zinc, han llevado al empleo de suplementos para prevenir la variedad de alteraciones ocasionados por su carencia. Sin embargo, en todos los casos se debe analizar la dosis a administrar, ya que aunque la suplementación farmacológica con el microelemento tiene la mayoría de las veces resultados óptimos, puede haber ocasiones en que se presenten efectos tóxicos, aún en dosis moderadamente bajas.

Como se ha mencionado los niveles plasmáticos de zinc parecen variar de manera inversa a la edad y algo similar parece ocurrir con el sistema inmune por lo que algunos autores han considerado importante, estudiar los efectos de la suplementación con zinc en la edad avanzada. Experimentos realizados en roedores a los que se les dio una suplementación con zinc en la dieta durante toda su vida, demostró que pudieron prevenirse muchas de las modificaciones relativas a la edad incluyendo la disminución en la producción de las hormonas tiroideas, la reducción en la actividad de las células T cooperadoras y la citotoxicidad deprimida de las células NK. Cuando se aplicó el mismo tratamiento a animales NZB susceptibles a autoinmunidad, se observó una disminución en el tiempo de aparición de las reacciones de autoagresión. Se ha demostrado que la suplementación con zinc suministrada oralmente a ratones mayores es capaz de producir recrecimiento del timo, con un incremento en la producción de las hormonas tiroideas y aumento en el porcentaje de células productoras de timulina con el recobro completo del número reducido de células Thy 1.2+. (Mocchegiani et al 1995a, Mocchegiani y Fabris 1995b)

Por otra parte Chandra, encontró que la suplementación por un año con

cantidades fisiológicas de zinc y otros micronutrientes, a una población aparentemente sana de humanos seniles, mejora su inmunidad y disminuye el riesgo a infecciones en este periodo. (Chandra 1989)

Las investigaciones previas realizadas en nuestro Laboratorio indican que la suplementación con Zn durante etapas perinatales aumentan algunas funciones inmunes. La administración oral de zinc a ratones BALB/c en los periodos de gestación y lactancia produjo un incremento significativo en el metabolismo de macrófagos peritoneales y en la fagocitosis; también se observó un aumento considerable en la síntesis de IgM. Respecto a los linfocitos T se encontró un efecto mitogénico del metal. Se pudo observar que la respuesta proliferativa máxima se presenta con la concentración de 0.1 mM de zinc, y dosis mayores resultan tóxicas para las células. Estos resultados revelan la importancia de este elemento traza en el estado inmune, sugiriendo la posibilidad de la regulación de algunas funciones inmunológicas a través del zinc..

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Existen informes experimentales y clínicos que indican que el sistema inmune experimenta un deterioro progresivo a medida que la edad avanza y muestran que tal disminución en su eficiencia depende significativamente de la involución fisiológica del timo; también se ha demostrado que dicha involución puede ser revertida por manipulación endocrina.

Experimentos realizados en roedores, a los que se les suplemento a lo largo de su vida con zinc, demuestran que dicho tratamiento previene la disminución en los niveles de las hormonas tímicas, la reducción en la actividad de las células T cooperadoras (CD4⁺) y la citotoxicidad deprimida de las células NK, sin embargo, la mayoría de los estudios realizados se enfocan a edad adulta, en la cual el timo ha experimentado ya una profunda involución.

Otras investigaciones informan que la involución tímica en el ratón comienza a las 4 semanas de edad, además, se propone que el zinc durante las etapas perinatales puede tener mayor efecto inmunomodulador. Para comprobar esto, en el presente trabajo se administró zinc a ratones de la cepa BALB-cAnN en el agua de bebida en concentraciones de 500 y 1000 mg/L y se estimó el índice tímico a las tres y seis semanas de edad de la progenie.

4. OBJETIVOS

- Investigar el efecto que tiene la suplementación con zinc en los índices tímico y esplénico, utilizando como modelo experimental ratones de la cepa BALB/cAnN, a los que se les administró el microelemento en el agua de bebida, durante los períodos de gestación, lactancia y posdestete (3 y 6 semanas de edad).

- Determinar las concentraciones de zinc en el bazo y en el suero.

- Estudiar el efecto de las diferentes dosis de suplementación en las curvas de crecimiento de la progenie.

- Establecer un esquema y dosis adecuada de suplementación durante etapas tempranas del desarrollo en modelo del ratón BALB/cAnN.

5. MATERIAL Y METODOS

Animales.

Se utilizaron ratones singénicos de la cepa BALB/cAnN los cuales se mantuvieron bajo condiciones ambientales estándar de luz y temperatura en el bioterio de la Facultad de Química. Las camadas se ajustaron a un promedio de seis crías. Se les administro agua de bebida y alimento *ad libitum* (Lab Diet, mouse diet 5015, St Louis, MO63144). Los animales de experimentación tomaron agua desionizada y los de tratamiento agua desionizada con la cantidad indicada de zinc desde el momento de la cruce.

Peso de los animales

El peso corporal promedio de la camada de cada cruce realizada, fue monitoreado cada tercer día por las tres o seis semanas de vida de las crías. Así se obtuvieron las curvas de crecimiento de cada grupo de experimentación.

Cuando los animales cumplieron las edades correspondientes (3 o 6 semanas de edad), se anestesiaron con éter para realizar el sangrado y se obtuvo su peso (Balanza Harvard Trip 2 Kg OHAUS).

Diseño experimental

Al momento de hacer la cruce, los animales se dividieron en grupos de acuerdo al tratamiento con el suplemento de Zn (Acetato de zinc, Mallinckrodt Paris Kentucky 40361), asignado al azar para cada una de las cruces. Cada grupo experimental constó de 20 animales.

Las dosis que se incluyeron en el presente trabajo fueron 500 y 1000 mg/L, administradas en el agua de beber, durante las etapas de gestación, lactancia y destete (Tabla I).

Tabla I. Grupos de animales y periodos durante los cuales estuvieron en tratamiento.

GRUPOS	GESTACION Animal progenitor Cepa BALB/c	LACTANCIA Progenie (F1) (6 semanas de tratamiento)	DESTETE Progenie (F1) (9 semanas de tratamiento)
	Zinc administrado <i>in vivo</i> en mg/L		
CONTROL	0	0	-
I	500	500	-
II	1000	1000	-
CONTROL	0	0	0
III	500	500	500
IV	1000	1000	1000

Los grupos I y II recibieron una dosis de zinc de 500 y 1000 mg/L durante la gestación y la lactancia. Los grupos III y IV recibieron Zn en las concentraciones de 500 y 1000 mg/L durante el período correspondiente a gestación, lactancia y destete. A los grupos denominados como control no se les administro zinc. A las 3 y 6 semanas de edad que corresponden a los períodos de lactancia y destete respectivamente, se obtuvieron el suero, el bazo y el timo.

Efecto del Zn en la involución tímica.

Cada animal se sacrificó por dislocación cervical y se extrajeron el bazo y el timo, se pesaron cada uno de los órganos y se relacionaron con el peso corporal del animal, calculando así los índices tímico y esplénico de cada uno, como se muestra:

$$\text{Índice tímico} = \frac{\text{Peso del timo (g)}}{\text{Peso del animal (g)}}$$

$$\text{índice esplénico} = \frac{\text{Peso del bazo (g)}}{\text{Peso del animal (g)}}$$

Obtención de suero

Después de anestesiarse a los ratones, se practicó un sangrado del seno infraorbital de cada animal y la sangre obtenida se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos para obtener los sueros, los cuales fueron almacenados individualmente a -70°C para su posterior análisis.

Determinación de zinc en bazo y suero

Para estos análisis se emplearon los órganos de 2 animales y 1 mL de suero obtenido de la mezcla de alícuotas de 200 μ L de 5 animales.

El suero y el bazo fueron secados calentando en un horno a 100 °C por 24h, después se digirieron con una mezcla de 1 mL de ácido nítrico (Baker, No cat. 9601-62) y 2 mL de peróxido de hidrógeno (Mallinckrodt No cat. 5240 Paris Kentucky) para aclarar la solución. Para completar la digestión las muestras se calentaron bajo agitación el tiempo necesario. Por último el volumen de las muestras digeridas se llevó a 6 mL con agua desionizada, los tubos se mezclaron y se dejaron reposar durante 24h 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 (Anexo I).

Análisis estadístico

Los valores se expresaron como la media \pm la desviación estandar; los promedios se compararon por un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías y un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo. Los valores de los índices esplénico y tímico se analizaron después de transformarlos con la función arco-seno.

6. RESULTADOS

Efecto del zinc en la involución tímica

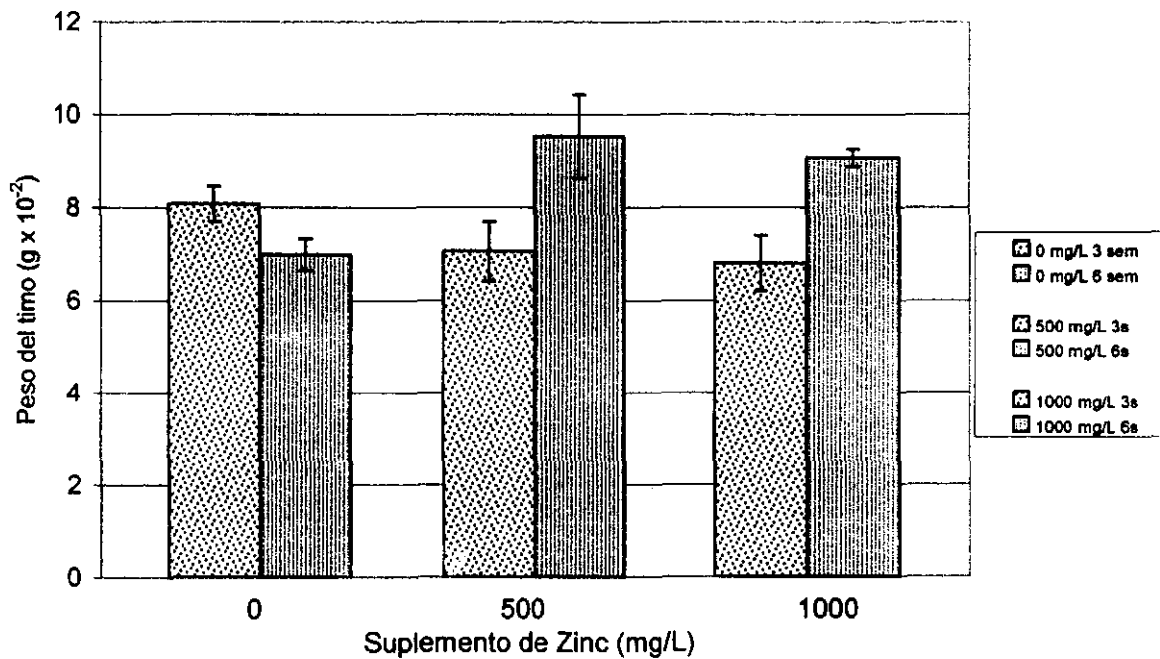
En la gráfica No1 se muestra el peso del timo de los ratones de 3 y 6 semanas de edad que recibieron el suplemento comparados con los controles y en la gráfica No2 se compara el índice tímico promedio de los diferentes grupos de experimentación.

Los resultados expresados en las gráficas mencionadas anteriormente, muestran que el tratamiento *in vivo* con el metal, no produjo una variación significativa en el peso ni en el índice tímico promedio hasta las tres semanas de edad.

Sin embargo, en esas mismas gráficas, se observa que los animales que fueron tratados con 500 mg/L de Zn, presentan un índice tímico significativamente mayor que los animales testigo (0 ppm) de la misma edad y con nueve semanas de tratamiento.

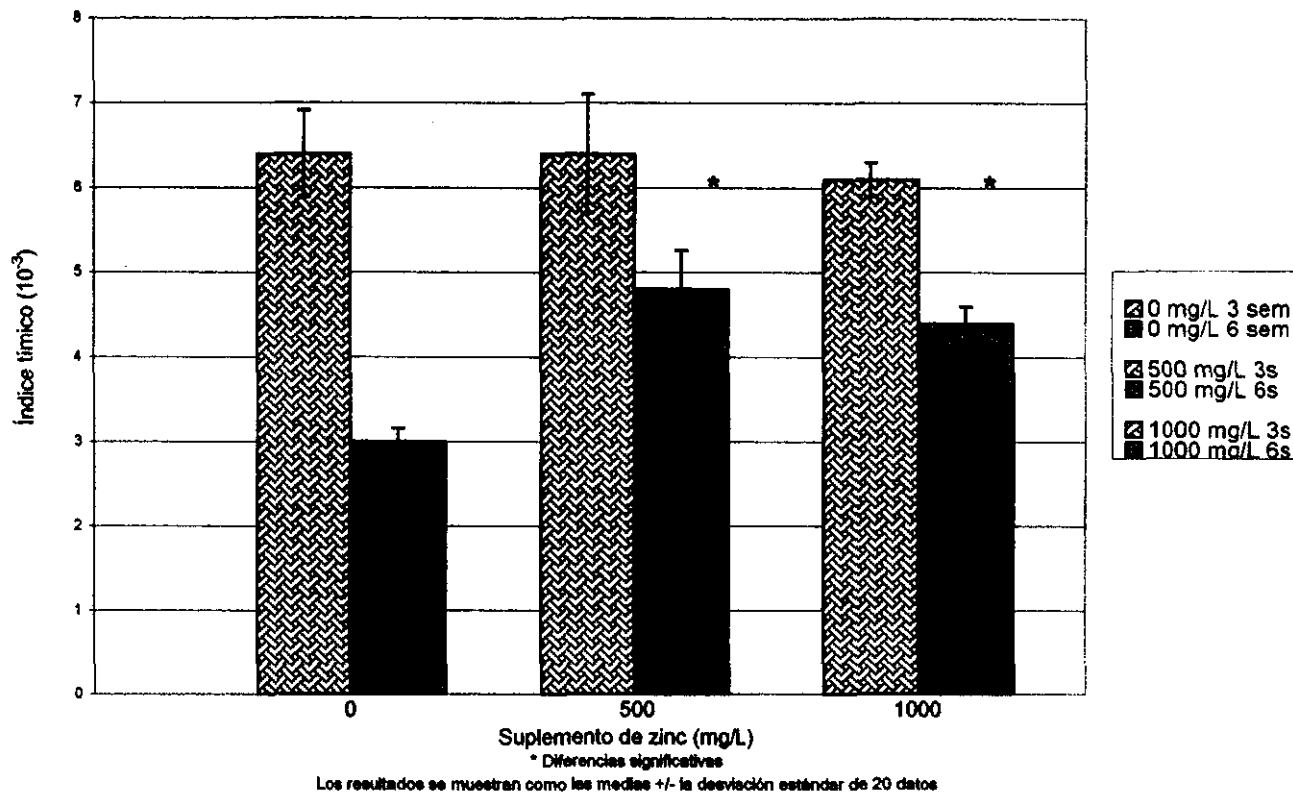
Los resultados muestran que el índice tímico de los animales de 6 semanas de edad tratados *in vivo* con las concentraciones de 500 y 1000 mg/L, fue significativamente mayor que los controles, pero no son diferentes entre sí, es decir, que el aumento en la dosis administrada del metal por nueve semanas no produjo un incremento adicional en el índice tímico.

Figura 1. CAMBIOS EN EL PESO DEL TIMO DE LOS RATONES CONTROL Y DE LOS SUPLEMENTADOS CON ZINC



Los resultados se muestran como las medias +/- la desviación estándar de 20 datos

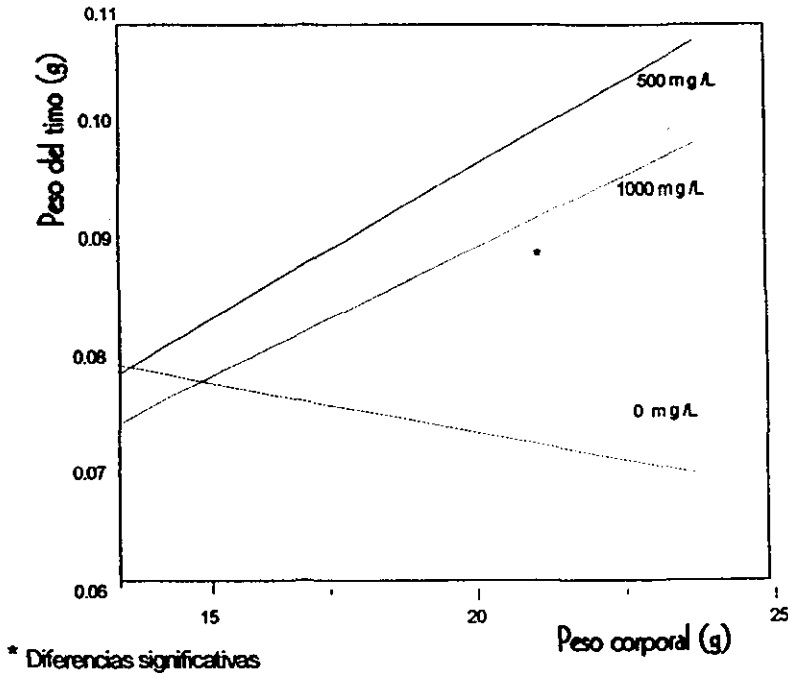
Figura 2. VARIACIONES EN EL INDICE TIMICO DE LOS RATONES DE 3 Y 6 SEMANAS DE EDAD TRATADOS *IN VIVO* CON ZINC Y SUS RESPECTIVOS CONTROLES



Efecto del Zn en la velocidad de crecimiento del timo

Se compararon los cambios en la velocidad de crecimiento del timo, relacionando las variaciones en el peso de este órgano y el peso corporal entre los animales testigo y los tratados con el microelemento (gráfica No3). Se observó que mientras la pendiente de la recta del grupo control es negativa, la de los grupos tratados con el zinc en sus diferentes concentraciones es positiva y sin diferencia estadística entre estas últimas, es decir, que el tratamiento con zinc evita la pérdida de peso del timo en el ratón en el intervalo de 3 a 6 semanas de edad.

Figura 3. VARIACION DEL PESO TIMICO EN FUNCION DEL PESO CORPORAL DEL ANIMAL EN LOS DISTINTOS GRUPOS DE ESTUDIO



Efecto del zinc en el índice esplénico

Con la finalidad de estudiar el efecto del zinc en otros órganos linfoides, se estimo también el índice esplénico de los animales de los seis grupos, encontrándose que no existe diferencia significativa entre el índice esplénico de los animales tratados y sin tratar como se observa en la gráfica No 4.

Concentración de zinc en el bazo y el suero.

Con objeto de conocer la variación en la concentración del elemento en los animales tratados con zinc, se determinó la concentración de éste metal en el bazo y en el suero de ratones de tres y seis semanas de edad.

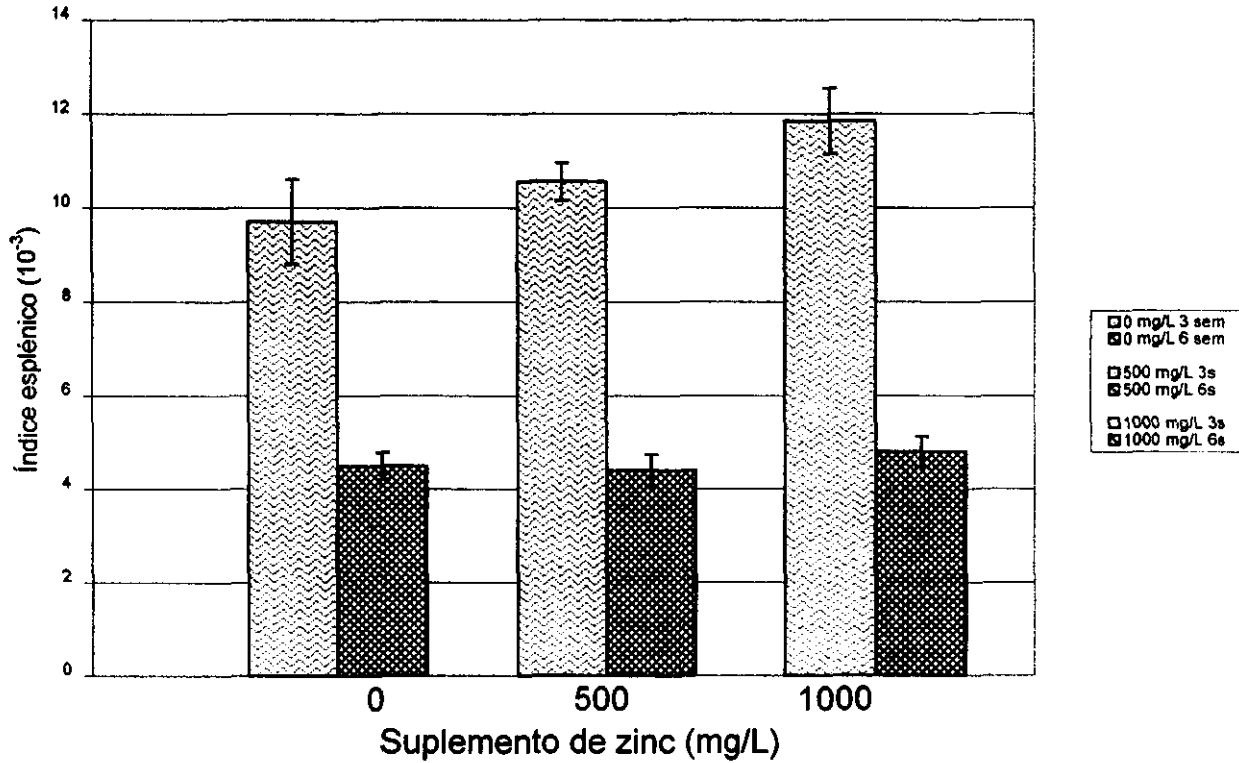
Se encontró que la concentración del elemento en el bazo no presentó variación significativa, entre los diferentes grupos de tratamiento y edad. (Gráfica No 5)

Con respecto a la concentración de zinc en el suero, la gráfica No 6 muestra que a las 3 y 6 semanas de edad, los niveles del metal en suero se incrementan directamente en relación con la suplementación.

Efecto del zinc en las curvas de crecimiento de la progenie.

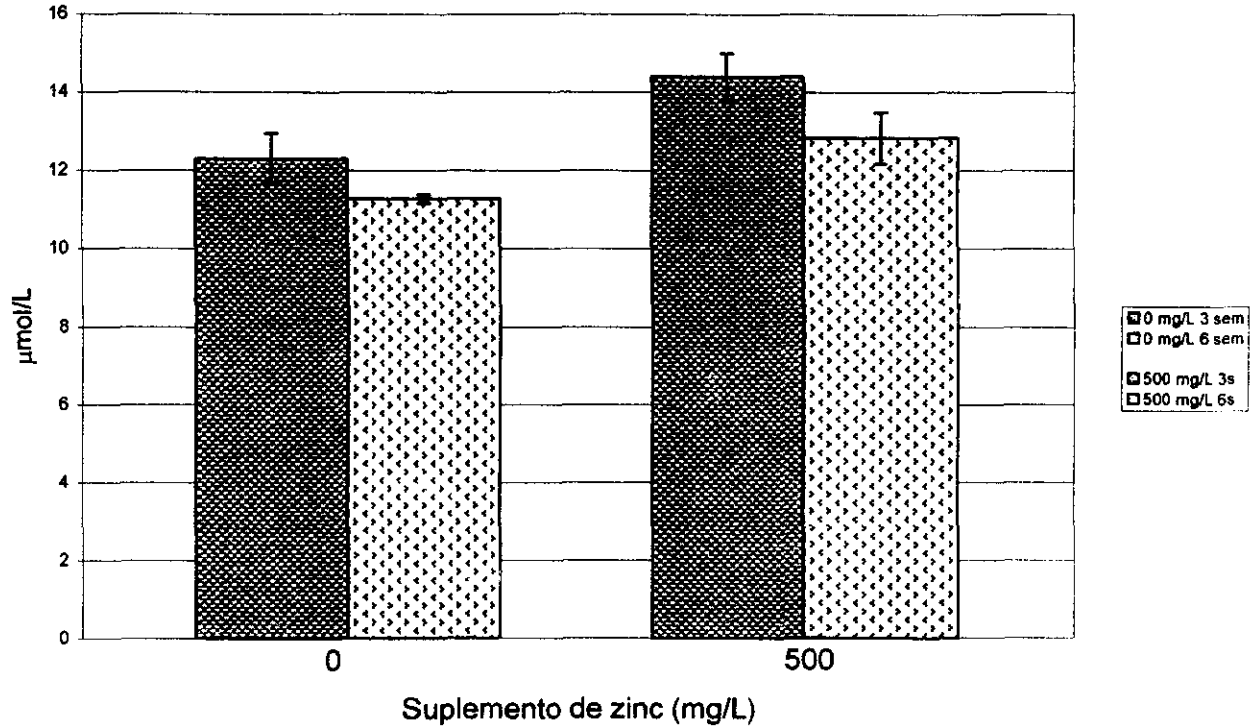
Las gráficas 7 y 8 muestran las curvas de crecimiento de los diferentes grupos (se utilizó el peso corporal como parámetro medible), no se observaron cambios significativos entre ellas .

Figura 4. CAMBIOS EN EL INDICE ESPLÉNICO DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE EXPERIMENTACION



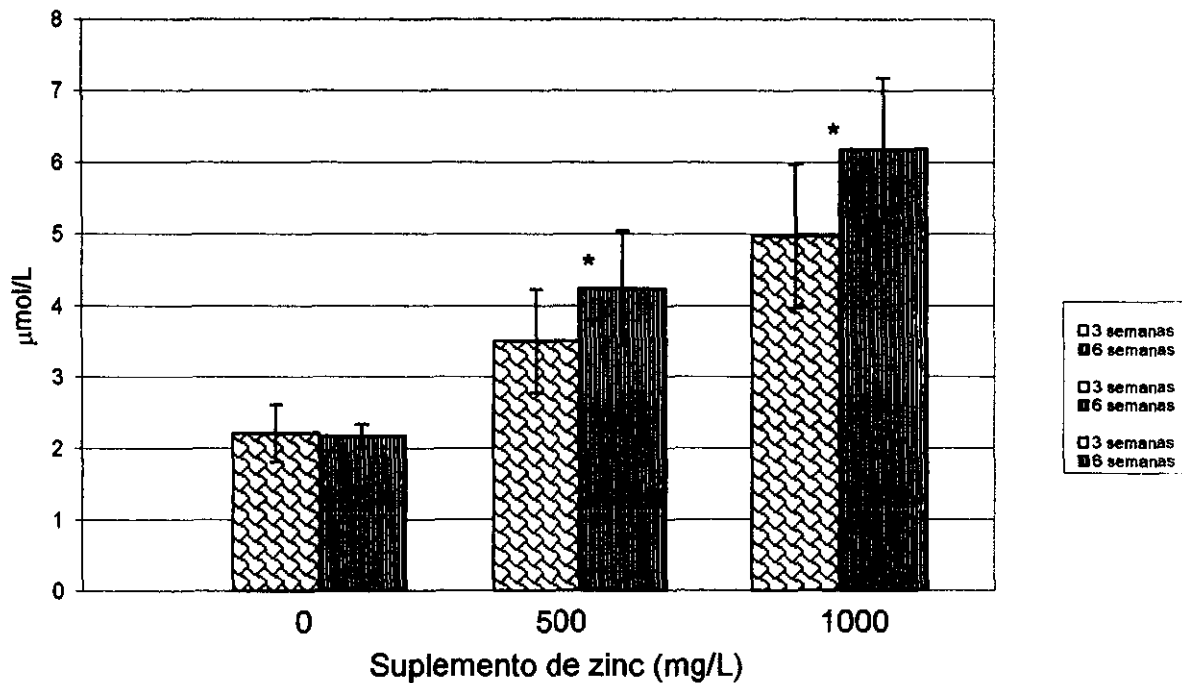
Los resultados se muestran como las medias +/- la desviación estándar de 20 animales

Figura 5. CONCENTRACION DE ZINC EN EL BAZO DE LOS ANIMALES CONTROL Y DE LOS SUPLEMENTADOS CON 500 mg/L



Los resultados se muestran como la media +/- la desviación estándar de 5 datos

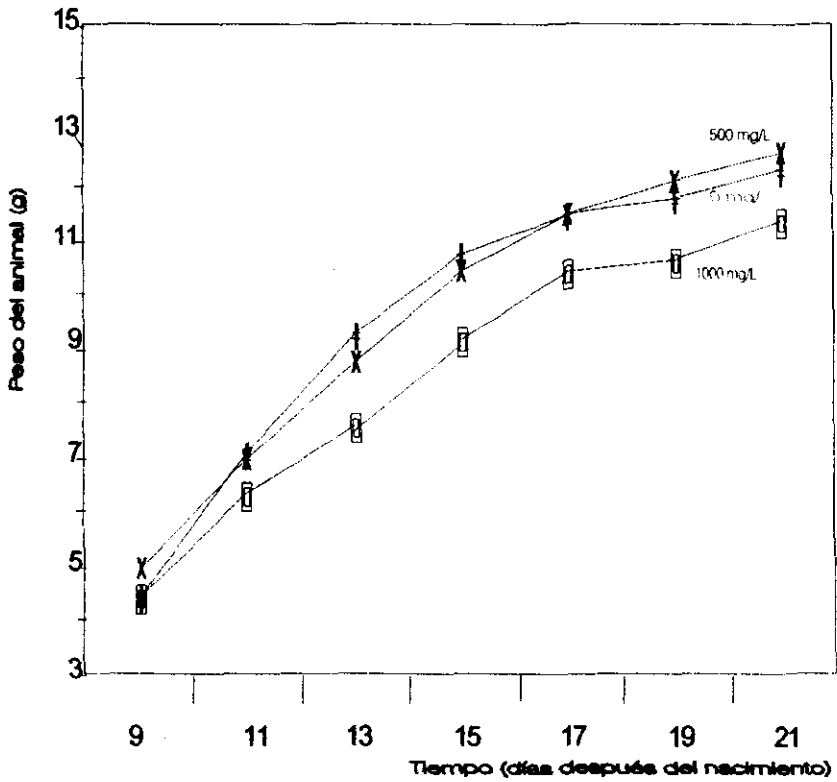
Figura 6. CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE ZINC EN EL SUERO DE LOS RATONES CON LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS A LAS TRES Y SEIS SEMANAS DE EDAD



* $p < 0.05$ con respecto al control

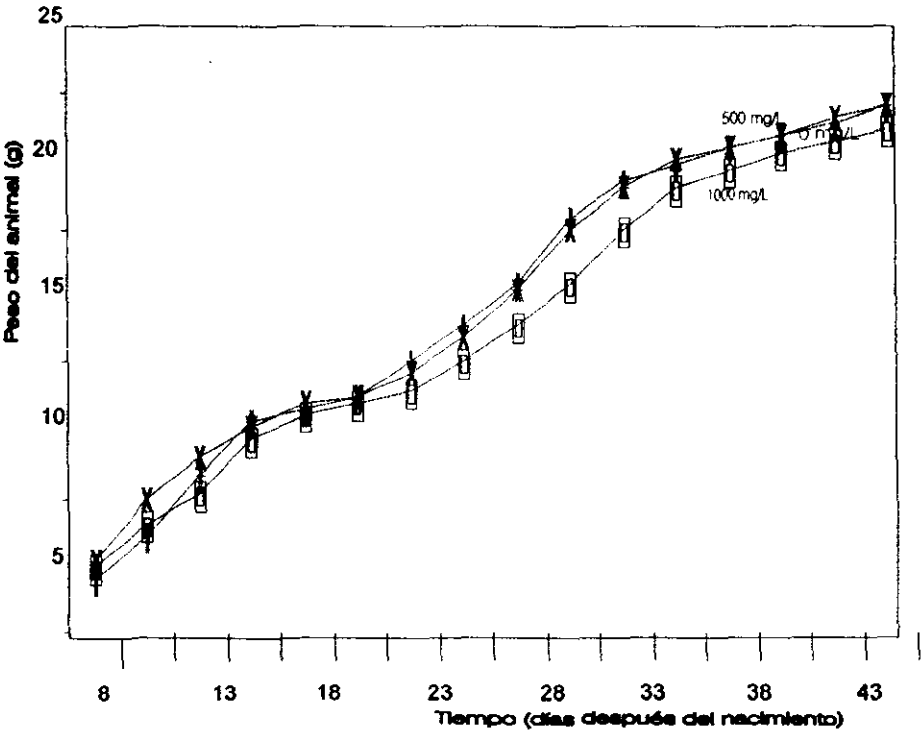
Los resultados se muestran como la media +/- la desviación estándar de 5 datos

Figura 7. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LOS ANIMALES CON LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS Y TRES SEMANAS DE EDAD



□ = 1000 mg/L, X = 500 mg/L, † = 0 mg/L
 Diferencias no significativas

Figura 8. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LOS ANIMALES SUPLEMENTADOS CON LAS DISTINTAS DOSIS DE ZINC, COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL A LAS SEIS SEMANAS DE EDAD.



□ = 1000 mg/L,
 X = 500 mg/L,
 † = 0 mg/L
 Diferencias no significativas

7. DISCUSION

La suplementación con zinc en dosis moderadas durante las etapas de gestación, lactancia y destete, aumentó el índice tímico de los animales a las seis semanas de edad; tiempo en el que se conoce que la involución tímica fisiológica ha empezado en el ratón (4 semanas de edad).

En diversos trabajos se ha reportado un “recrecimiento” tímico después de la administración de este elemento traza en niños malnutridos y en animales y humanos de edad avanzada (Golden 1977, Mocchegiani 1990, Chandra 1992, Rosado 1997). Otros estudios como los realizados por Beach *et al*, muestran el efecto de la deficiencia de Zn en el desarrollo del bazo y del timo, encontrándose que la carencia del elemento produce atrofia e hipoplasia de estos órganos linfoides. También se ha visto que el número total de células linfoides en el timo es menor en un animal con deficiencia del metal comparado con el control. (Beach 1982) Todos estos trabajos indican que el zinc tiene una función importante en el timo, lo cual es apoyado por los resultados obtenidos en esta tesis.

Aunque no se conocen los eventos moleculares implicados, que puedan explicar estos hallazgos, se puede mencionar que el Zn afecta la estructura y función membranal, que puede influir en el contacto y reconocimiento de diversos tipos celulares; procesos esenciales para el

desarrollo y diferenciación normales. También se conoce que el zinc es un componente esencial de muchas enzimas y, además, puede regular la expresión genética, estabilizando algunos factores de transcripción de relevancia inmunológica; además, se ha propuesto que la suplementación con Zn puede reactivar o mantener la cascada enzimática necesaria para la síntesis de hormonas tiroideas. (Wellinhausen 1997, Mocchegiani et al 1995^a, Fabris et al 1990)

El efecto que el Zn parece tener en la involución tiroidea es de especial interés en la actualidad, ya que se ha incrementado sorprendentemente el promedio de vida, y la generación de grandes urbes ha llevado consigo la aparición de nuevas enfermedades. Por ejemplo, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), induce algunas deficiencias nutricionales y cambios gastrointestinales que llevan a mala absorción; más aún, el timo de los pacientes infectados con este virus muestra involución y destrucción en su arquitectura (Wang 1994, Cunningham 1990).

Dado que los estudios realizados hasta ahora están encaminados a ver el efecto de la suplementación de zinc en etapas adultas, o se han enfocado a inducir una deficiencia de zinc en modelos experimentales, el presente trabajo complementa las observaciones realizadas por otros grupos. A diferencia de los otros trabajos en los que se observa un "recrecimiento" del timo por el tratamiento, en este estudio se observa que la suplementación con zinc

durante las etapas perinatales inhibe o retrasa la involución tímica. (Gráficas 1 y 2)

Como se demostró, el timo a las seis semanas de edad ha comenzado a involucionar, ya que aunque la variación en el peso absoluto del órgano aún no es significativa, el peso relativo (índice tímico) presenta una disminución significativa a las seis semanas comparado con las tres semanas de edad.

Cuando se relaciona el peso corporal con el peso del timo (gráfica 3), se pueden observar varios aspectos interesantes, ya que la pendiente de la curva es positiva en aquellos ratones que recibieron la suplementación con Zn en cualquiera de las dosis. De manera inversa es negativa en los animales control, es decir, que en los grupos con tratamiento, el peso tímico sigue aumentando conforme su peso corporal, sin embargo, el peso del timo de los animales control parece disminuir con la edad (tomando el peso corporal como medida de esta). De lo anterior se puede proponer que el proceso normal de involución aún no ocurre o se retarda en los animales tratados.

Se conoce que al ocurrir la involución tímica en el humano, el tejido linfóide se reemplaza por tejido adiposo, por lo que el índice tímico en el humano no es indicador de la involución. Sin embargo, el modelo murino proporciona una gran ventaja ya que no existe la sustitución del tejido linfóide y la pérdida de los componentes tímicos conduce a una disminución en el

peso del órgano.

Las observaciones realizadas en nuestro trabajo apoyan los experimentos de Mulhem, que mostró que el índice tímico de ratones C57BL/6J a los que se les dio un exceso de zinc (2000 mg/L) en los períodos de gestación lactancia y destete, fue significativamente mayor que el de los animales control; a diferencia de lo que se observó en el bazo de los animales tratados, los que sufrieron una reducción en el peso de este órgano y en el peso corporal.

El timo, proporciona el microambiente en el cual las células progenitoras derivadas de la médula ósea pueden proliferar y madurar, estableciéndose el repertorio de células T responsable de la respuesta inmune celular específica. Debido a la trascendencia de este órgano en el sistema inmune es importante realizar experimentos encaminados a analizar la funcionalidad de las distintas poblaciones celulares en el timo de los animales tratados con un suplemento de zinc y observar su concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo, lo que sugeriría que los cambios asociados a la involución tímica fisiológica no son irreversibles, sino que pueden ser manipulados a través de la suplementación con zinc.

Se conocen otras propiedades del zinc relacionadas con la estructura y función tímica que pueden estudiarse. Por ejemplo, es bien sabido que la

hormona tímica, timulina en su forma activa tiene unido zinc. Esta hormona se puede unir a los receptores de alta afinidad en los linfocitos T y promover su maduración y la producción de citocinas.

También se tienen reportes que los animales con deficiencia de zinc muestran atrofia tímica como resultado de muerte celular apoptótica de timocitos. Otro de los aspectos observados es que el zinc parece ser un modulador de éste tipo de muerte celular. La deficiencia de zinc *in vitro* incrementa la apoptosis de líneas celulares linfoides y mieloides y por otro lado la adición del metal, también *in vitro*, inhibe la fragmentación del DNA inducida por dexametasona. Por lo tanto, sería interesante investigar el efecto de la suplementación con zinc *in vivo*, en la apoptosis de timocitos, durante etapas tempranas del desarrollo y el impacto de tal efecto en la inmunidad del animal.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que no existe una diferencia significativa entre el peso esplénico de los animales tratados con Zn y el grupo control, a diferencia de lo que ocurre con el timo. Esto tal vez se deba a que la suplementación se realizó en dosis moderadas y en un período no muy prolongado, ya que tampoco se

observaron cambios significativos en las concentraciones del metal en este órgano cuando se compararon los diferentes grupos de estudio.

Para nosotros fue importante estudiar el efecto que el zinc tiene en el bazo, ya que se conoce que a través de este circulan 80 millones de linfocitos cada hora en la rata, y en el humano 2.5×10^{11} linfocitos diariamente; por lo que conocer la concentración de zinc en este órgano linfoide fue indicativo del *status* de zinc y de los sitios de almacenamiento del metal en el organismo.

Por otra parte, el bazo es también un ejemplo clásico de órgano linfoide, sin embargo, éste no soporta los eventos de selección de linfocitos T ni experimenta la involución temprana del timo.

Aunque existe cierta controversia acerca de la disponibilidad de un marcador del *status* de zinc, con frecuencia la concentración del metal en el plasma se utiliza para identificar cambios metabólicos asociados con el consumo del elemento traza en la dieta. Para evaluar el contenido de zinc en los tejidos se determina la concentración del metal en linfocitos.

La concentración sérica de zinc aumentó conforme la dosis administrada, observándose una diferencia significativa entre los diferentes grupos de tratamiento. Esto parece lógico ya que el zinc que se administró en

el agua de bebida es absorbido en el intestino delgado por las células intestinales, incorporado al torrente circulatorio, en donde será transportado y distribuido a los tejidos.

Recordemos que a diferencia de otros elementos traza, el zinc no parece almacenarse en un órgano específico, por lo que la deficiencia del metal se desarrolla rápidamente cuando la ingesta se reduce. Sin embargo, en los animales con deficiencia, la concentración de zinc en el músculo se conserva mientras que las concentraciones en el hueso, el hígado, las vesículas seminales y el plasma descienden. Esto podría explicar de alguna manera el aumento en la concentración sérica del metal con la suplementación.

En los diferentes trabajos clínicos revisados se utilizó comúnmente el medir los niveles plasmáticos de Zn para relacionarlos con diferentes variables. Por ejemplo, observaron que la ingesta adecuada de este microelemento durante el embarazo, correlaciono con las concentraciones plasmáticas de las madres, y que las concentraciones plasmáticas adecuadas de Zn durante este periodo tienen un efecto positivo en el peso del producto a la fecha del nacimiento, la edad gestacional al parto, el crecimiento y preeclampsia. (Jameson 1993, Goldenberg 1995)

Gracias a diversos estudios realizados en algunos países o pequeñas comunidades que por su tipo de alimentación presentan una deficiencia moderada de zinc se conoce el efecto que tiene este elemento traza en el desarrollo y crecimiento humano. Además, existen algunos trabajos que investigaron el efecto de la deficiencia de Zn en diferentes modelos animales, observándose de manera general anomalías en el crecimiento y desarrollo e infecciones recurrentes.

Por esto en el presente trabajo, se realizaron las curvas de crecimiento de la progenie de los diferentes grupos de tratamiento, en los cuales se observó un comportamiento muy similar. Sin embargo, se ve una tendencia a la baja en el peso corporal de los animales tratados con la dosis más alta del microelemento, en los períodos de seis y nueve semanas de tratamiento, correspondientes a 3 y 6 semanas de edad.

De estos resultados se puede suponer que la suplementación con 1000 mg/L durante estos períodos representa una dosis no óptima que podría producir efectos no deseados en el animal; esto concuerda con las observaciones de Mulhern que indican que la exposición a una dosis excesiva de zinc durante la gestación reduce el crecimiento post-destete y otros experimentos realizados en nuestro laboratorio que indican que la suplementación con 1000mg/L tiene un efecto negativo en el hematocrito y en la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos. Por lo cual se debe tener

en cuenta que tanto la deficiencia como el exceso de zinc pueden conducir a reacciones adversas y por esto se debe estudiar minuciosamente el esquema de suplementación a seguir, dependiendo de las condiciones y de la etapa del desarrollo.

Es necesario continuar esta línea de investigación, ya que únicamente se estudió el cambio en el índice tímico con la suplementación, como medida de la involución, sin embargo, los eventos funcionales y moleculares que se supone deberían correlacionar con el retardo en la involución no se han confirmado.

Sería interesante estudiar los cambios que ocurren en las poblaciones celulares y los factores que se producen en el timo durante estos periodos en animales tratados *in vivo* con dosis moderadas de zinc en comparación con los respectivos controles. .

COROLARIO

- De acuerdo con los resultados obtenidos de este trabajo, la involución tímica (representada por el índice tímico) se ha iniciado en aquellos animales de seis semanas de edad que no recibieron el tratamiento con zinc, lo cual es normal ya que existen numerosas evidencias que refieren el comienzo de la involución tímica fisiológica en el ratón a las cuatro semanas de edad. Sin embargo, aquellos ratones a los que se les administró el suplemento (500, 1000 mg/L de zinc), tuvieron un índice tímico superior que los controles y también el cambio en la relación entre el peso tímico y el peso corporal mostró una pendiente diferente, sugiriendo que el zinc inhibió la involución tímica o la retardó en aquellos grupos que recibieron el elemento.

- El índice esplénico no se vio afectado por la suplementación.

- La concentración sérica mostró un incremento en la concentración de zinc de acuerdo a la cantidad suplementada del metal.

ANEXO I

Espectroscopia de absorción atómica

La técnica de absorción atómica se basa en la absorción de energía radiante por átomos.

Al hacer incidir un haz de luz de una determinada longitud de onda sobre una llama que contiene una nube de átomos en estado fundamental, estos absorben energía, por lo que la intensidad de luz se ve disminuida en una cantidad determinada por la concentración de átomos en la llama; dicha luz se dirige sobre un detector que mide la intensidad de luz disminuida, la cantidad de luz absorbida se determina al comparar la intensidad inicial y la disminuida.

Absorbancia es el término más conveniente para caracterizar la absorción de luz en la espectrofotometría de absorción, pues esta cantidad guarda una relación lineal con la concentración. La ley de Beer define esta relación :

$$A=abc$$

En donde "A" es la absorbancia; "a" es el coeficiente de absorción constante que es la característica de las especies que absorben; "b" es la longitud del paso de luz ocupado por la celda de absorción, y "c" es la concentración de las especies absorbantes en la celda de absorción. Esta ecuación simplemente establece que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbantes para unas condiciones instrumentales dadas.

Mediante estas bases las muestras de tejidos y sueros fueron analizadas y se determinó su concentración de zinc interpolando los resultados sobre una curva de zinc. Los resultados se reportan en partes por millón (mg/L)

El proceso anteriormente descrito requiere el uso de un espectrofotómetro, que consta de las siguientes partes:

Fuente de luz: Se emplean lámparas de cátodo hueco que emiten la luz como un haz, condición requerida para que sea absorbida por los átomos, de la longitud de onda específica del elemento a analizar.

Atomizador : El dispositivo de atomización consiste en un nebulizador y un quemador. El nebulizador transforma la muestra líquida en un aerosol fino que se introduce de inmediato en la llama; el quemador aspira la muestra y la disocia en átomos.

En la absorción atómica de flama, la muestra requiere estar en estado líquido.

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

Monocromador: Su función es colectar la luz proveniente del atomizador y dirigirla al detector, en forma de una sola línea del espectro generado por el elemento analizado.

Detector: Consta de fotomultiplicadores, que están compuestos de una serie de electrodos que amplifican la luz emitida, transformándola en señales eléctricas.

(Skoog y West 1989, The Perkin Elmer Corporation 1979)

BIBLIOGRAFIA

1. **Abbas AK, Lichman AH, Pober JS.** Cellular and Molecular Immunology Philadelphia: Saunders, 1997
2. **Anderson G, Jenkinson E.** Piecing together the thymic puzzle *Immunol Today* 1997; 18:363-364.
3. **Ardavin C.** Thymic dendritic cells *Immunol Today* 1997; 18:350-361
4. **Barbieri D, Troiano L, Grassilli E, Agnesini C, Cristofalo EA., Monti D., Capri M., Cossarizza A., Franceschi C.** Inhibition of apoptosis by zinc: a reappraisal *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:1256-1261
5. **Beach RS, Gershwin ME, Hurley LS.** Growth and development in postnatally zinc-deprived mice *J Nutr* 1980;110:201-211
6. **Beach RS, Gershwin ME, Hurley LS.** Reversibility of developmental retardation following murine fetal zinc deprivation *J Nutr* 1982; 112:1169-118
7. **Beach RS, Gershwin ME, Hurley LS.** Persistent immunological consequences of gestation zinc deprivation *Am J Clin Nutr* 1983;38:579-90
8. **Beisel WR.** Zinc and the immune system. In: Roitt I (Ed). *Encyclopedia of Immunology*, Academic Press 1992; 3:1577-1578
9. **Boukalba N, Flament C, Acher S, Chappuis P, Piau A, Fusselier M, Dardenne M, Lemonnier D.** A physiological amount of zinc supplementation: effects on nutritional, lipid and thymic status in an elderly population. *Am J Clin Nutr* 1993;57:566-72
10. **Boyd RL, Tucek CL, Godfrey DL, Izon DJ, Wilson TJ, Davidson NJ, Bean AGD, Ladyman HM, Ritter MA, Hugo P.** The thymic microenvironment *Immunol. Today* 1993;14:445-459
11. **Bramblia CEM., González VE.** Zinc: Función e interacción con las moléculas de los sistemas biológicos. *Boletín de Educación Bioquímica* 1994; 13:36-45
12. **Brandão-Neto J, Stefan V, Mendonça BB, Bloise W, Castro AVB.** The essential role of zinc in growth. *Nutr Res* 1995;15:335-358
13. **Bremner I, Beattie JH.** Copper and zinc metabolism in health and disease:speciation and interactions. *Proc Nutr Soc* 1995;54:489-499

14. **Çavdar AO, Bahçeci M, Akar N, Erten J, Yavuz H.** Effect of zinc supplementation in a turkish woman with two previous anancephalic infants. *Ginecol Obstet Invest* 1991;32:123-125
15. **Chandra RK,** Nutritional regulation of immunity and risk of infection in old age. *Immunology*, 1989;67:141-147
16. **Chandra RK.** Nutrition and immunity: Lessons from the past and new insights into the future *Am J Clin Nutr* 1991;53 :1087-1101.
17. **Chandra RK.** Nutrition and the Immune System. In: Roitt I Ed). *Encyclopedia of Immunology*, Academic Press. 1992; 3: 1173-1175
18. **Clarke AG, Kendall M.D.** The thymus in pregnancy: the interplay of neural, endocrine and immune influences. *Immunol Today* 1994;15:545-551
19. **Cousins RJ.** Absortion, transport and hepatic metabolism of cooper and zinc: special reference to metallotionein and ceruloplasmin. *Phis Rev* 1985; 65:283-309
20. **Cherry FF, Sandstead H.H, Wickremasinghe A.R.** Adolescent pregnancy: zinc supplementation and iron effects. *Ann N Y Ac Sci* 1993; 678:330-337
21. **Cohen JJ.** Apoptosis *Immunol. Today* 1993; 14:126-130
22. **Cunningham-Rundles S, Bockman RS, Lin A., Giardina PV, Hilgartner MW, Caldwell-Brown D, Carter DM.** Physiological and Pharmacological Effects of Zinc on Immune Response. *Ann N Y Acad Sci.* 1990; 587:113-122
23. **da Silva FJ, Williams RJP.** The biological chemistry of the elements: The inorganic chemistry of life Clarendon Press Oxford 1991
24. **Driessen C., Hirv K, Kirchner H, Rink L.** Zinc regulates cytokine induction by superantigens and lipopolysaccharide. *Immunology* 1995;84: 272-277
25. **Duke RC,** Apoptosis in cell mediated immunity In: Apoptosis: The molecular basis of cell death 1991 Cold spring harbor laboratory press
26. **Fabris N, Mocchegiani E, Muzzioli M, Provinciali M.** Zinc, Immunity, and Aging. In: Goldstein A.L ed. Biomedical Advances in Aging. Plenum Press 1990:271-281
27. **Fosmire GJ.** Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr* 1990; 5:225-227
28. **Fraker PJ, Osati-Ashtiani F, Wagner MA., King LE,** Possible roles for

glucocorticoids and apoptosis in the suppression of lymphopoiesis during zinc deficiency: a review. *J Am Coll Nutr* 1995;14:11-17

29. **Fraker PJ, Telford WG.** A Reappraisal of the role of zinc in life and death decisions of cells *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;215:229-236
30. **Garg HK, Singhal KC, Arshad Z.** A study of the effect of oral zinc supplementation during pregnancy on pregnancy outcome *Indian J Physiol Pharmacol* 1993;37:276-284.
31. **George AJ, Ritter MA.** Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today* 1996 ; 17:267-272
32. **Golden MH, Jackson AA, Golden BE.** Effect of zinc on thymus of recently malnourished children *Lancet* 1977; 2:1057-1059
33. **Golden MH.** Zinc and immunocompetence in protein-energy malnutrition *Lancet* 1978;1:1226-1230
34. **Goldenberg RL, Tamura T, Neggers Y, Copper RL, Johnston KE, DuBard MB, Hauth JC.** The effect of zinc supplementation on pregnancy outcome *JAMA* 1995;274: 463-468
35. **Graham TW, Thurmond MC, Gershwin ME, Picanso JP, Garvey JS, Keen CL.** Serum zinc and copper concentrations in relation to spontaneous abortion in cows: implications for human fetal loss *J Repr Fertility* 1994; 102 253-262.
36. **Hadden JW.** Thymic Endocrinology *Ann N Y Acad Sci* 1998; 840: 352-358
37. **Hallquist NA, Khoo C, Cousins RJ.** Lipopolysaccharide regulates cysteine-rich intestinal protein, a zinc finger protein, in immune cells and plasma *J Leukoc Biol* 1996; 59:172-177
38. **Hambidge MK.** Zinc deficiency in young children *Am J Clin Nutr* 1997; 63:160-161
39. **Hirokawa K, Utsuyama M, Kasai M.** Role of the thymus in aging of the immune system. In: Goldstein AL ed. *Biomedical Advances in Aging.* Plenum Press 1992:375-384
40. **Janeway C, Travers P. ed.** Immunobiology London and New York: Current Science and Galard, 1996
41. **Jameson S.** Zinc status in pregnancy: The effect of zinc therapy on perinatal mortality, prematurity, and placental ablation. *Ann N Y Acad Sci*

42. Keen CL, Taubeneck MW, Daston GP, Rogers JM, Gershwin ME. Primary and secondary zinc deficiency as factors underlying abnormal CNS development *Ann N Y Ac Sci* 1993;678:37-47
43. Kirskey A, Wachs TD, Yunis F, Srinath U, Rahmanifar A, McCabe GP, Galal OM, Harrison GG, Jerome NW. Relation of maternal zinc nutriture to pregnancy outcome and infant development in an Egyptian village *Am J Clin Nutr* 1994; 60:782-92
44. King JC. Assesment of zinc status *J Nutr* 1990;120:1474-1479
45. King LE. and Fraker PJ. Flow cytometryc analysis of the phenotypic distribution of splenic lymphocytes in zinc-deficient adult mice. *J Nutr* 1991; 121:1433-1438
46. King LE., Osati-Ashtiani F., Fraker PJ. Depletion of cells of the B lineage in the bone marrow of zinc-deficient mice. *Immunology* 1995; 85:69-73
47. Lastra MD, Espinosa E. Efectos del zinc como inmunomodulador *.Bioquimia*, 1993; 18:17-21
48. Lastra MD, Aguilar AE, Pastelin R, Herrera M, Orihuela VD, Effect of zinc supplements on immune responses during perinatal stages *Arch Med Research* 1996;28:67-72
49. Lesourd BM. Nutrition and immunity in the elderly: modifications of immune responses with nutritional treatments. *Am J Clin Nutr* 1997;66:478S-84S
50. Linder MC. Nutrition and metabolism of the trace elements. In: Linder MC.ed *Nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications.* Appleton & Lange 1991: 417-419
51. Lindsay Y, Duthie LM, Mcardle HJ, Zinc levels in the ral fetal liver are not determined by transport across the placental microvillar membrane or the fetal liver plasma membrane *Biol Reprod* 1994;51:358-365
52. Lockitch G. Trace elements in pediatrics. *JIFCC*, 1996;9: 46-51
53. Luecke RW, Fraker PJ. The effect of varying dietary zinc levels on growth and antibody-mediated response in two strains of mice *J Nutr* 1979;109:1373-1376
54. Martínez LE, Solé J, Arola L, Mas A. Changes in plasma copper zinc during rat development *Biol Neonate* 1993;64:47-52

55. **McConkey DJ** The regulation of apoptosis in thimocytes *Biochem Soc Trans* 1994; 2:606-610
56. **Michel I, Lavigne C, Desrosiers T.** Soluble and Lipid-Bound Calcium and Zinc During Processing of Infant Milk Formulas. *J Food Sci*, 1993;58:756-760
57. **Mocchegiani E, Santarelli L., Muzzioli M, Fabris N.** Reversibility of the thymic involution and of age related peripheral immune dysfunctions by zinc supplementation in old mice. *Int J Immunopharmac* 1995a;17:703-718
58. **Mocchegiani E, Fabris N,** Age-related thymus involution: zinc reverses in vitro the thymulin secretion defect. *Int J Immunopharmac* 1995b;17:745-49
59. **Moreno J.** Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad México:Noriega 1996:40-73,87,100
60. **Morgan PN, Keen CL,Lönnnerdal B.** Effect of varying dietary zinc intake of weanling mouse pups during recovery from early undernutrition on tissue mineral concentrations, relative organ weights, hematological variables and muscle composition. *J Nutr* 1988;118:699-711
61. **Mulhern SA, Vessey AR, Taylor GL, Magruders LE.** Supression of antibody response by excess dietary zinc exposure during certain stages of ontogeny *Proc Soc Exp Biol Med* 1985;180:453-461
62. **Murray MJ, Wilson FD, Fisher GL, Erickson KL,** Modulation of murine lymphocyte proliferation by parenteral zinc. *Clin Exp Immunol* 1983;53:744-749
63. **Owen JJ, Jenkinson EJ.** Apoptosis and T-cell repertoire selection in the thymus. *Ann N Y Acad Sci* 1993;678:305-310
64. **Palmer DB, Hayday A, Owen MJ,** Is TCR β expression an essential event in early thymocyte development? *Immunol. Today* 1993; 14: 460-461
65. **Paul WE., ed.** Fundamental Immunology. New York:Raven Press, 1993:152-161
66. **Penny ME, Lanata CF,** Zinc in the managment of diarrhea in young children *N Engl J Med* 1995; 353:873-875
67. **Perkin Elmer ed.** Conceptos, Instrumentación y técnicas de espectrofotometría por absorción atómica. The Perkin Elmer Corporation USA 1979.

68. Prasad AS, Meftah S, Abdalalah J, Kaplan J., Brewer GJ, Bachc JF, Dardenne M, Serum thymulin in human zinc deficiency. *J Clin Invest* 1988; 82:1202-1210
69. Provinciali M, Stefano G, Fabris N. Dose-dependent opposite effect of zinc on apoptosis in mouse thymocytes. *Int J Immunopharmac* 1995;17:735-44
70. Rhodes D, Klug A. Zinc Fingers. *Sci Am*, 1993;268 :56-59
71. Ritter MA, Boyd RL, Development in the thymus: it takes two to tango *Immunol. Today* 1993; 14: 462-468
72. Rosado JL, López P, Muñoz E, Martínez H., Allen LH, Zinc supplementation reduced morbidity, but neither zinc nor iron supplementation affected growth or body composition of Mexican preschoolers *Am J Clin Nutr* 1997;65:13-19
73. Scuderi P. Differential effects of cooper and zinc on human peripheral blood monocyte cytokine secretion *Cell Immunol* 1990;126:391-405
74. Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr* 1998;68:447S-63S
75. Skoog DA, West DM. Análisis Instrumental 2ª ed. Mcgraw-Hill 1989:324-341
76. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Inmunología básica y clínica. México-Bogotá:El Manual Moderno 1996.
77. Suster S, Rosai J. Histology of the normal thymus. *Am J Surg Pathol*, 1990; 14: 284-303
78. Tamura T, Goldenberg RL, Freeberg LE, Cliver SP, Cutter GR, Hoffman HJ, Maternal serum folate and zinc concentrations and their relationships to pregnancy outcome *Am J Clin Nutr* 1992; 56:365-70
79. Treves S, Trentini PL, Ascanelli M, Bucci G, Di Virgilio F. Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes *Exp Cell Res* 1994;211: 339-343
80. Walsh CT, Sandstead HH, Prasad AS, Newberne PM, Fraker PJ. Zinc: Health Effects and Research Priorities for the 1990s. *Environ Health Perspect* 1994;102:5-46
81. Wang Y, Huang DS, Liang B, Watson RR. Nutritional status and immune responses in mice with murine AIDS is normalized by vitamin E

supplementation *J Nutr* 1994;124:2024-2032

82. **Weinberg K., Parkman R :** Age, the thymus, and T lymphocytes *N Engl J Med* 1995;332(3):182-183
83. **Wellinghausen N, Fischer A, Kirchner H, Rink L.** Interaction of zinc ions with human peripheral blood mononuclear cells. *Cell Immunol* 1996;171:255-261
84. **Wellinghausen N, Kirchner H, Rink L.** The immunobiology of zinc *Immunol. Today* 1997; 18:519-521
85. **Westbrook GL, Mayer ML.** Micromolar concentrations of Zn²⁺ antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature* 1987;328:640-643
86. **Zuñiga-Pflücker J.C, Jiang D, Lenardo M.J,** Requirement for TNF- α and IL-1 α in fetal thymocyte commitment and differentiation *Science* 1995; 268:1906-1908