

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

CONCENTRACIÓN DE ZINC EN TEJIDOS DE RATONES CD1 INFECTADOS
Y NO INFECTADOS CON *Giardia lamblia*

POR

ANA GABRIELA MALDONADO FONLLEM

TESIS APROBADA POR LA DIRECCIÓN DE NUTRICIÓN COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

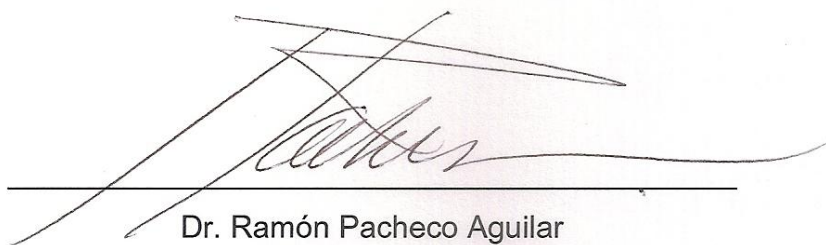
HERMOSILLO, SONORA

DICIEMBRE 2011

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ramón Pacheco', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General


APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Q.B.C. Ana Gabriela Maldonado Fonllem, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

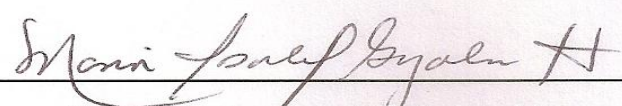


Dr. Luis Quihui Cota
Director de Tesis

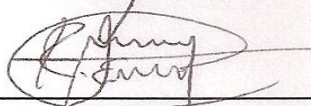
Dr. Humberto Astiazarán García
Asesor



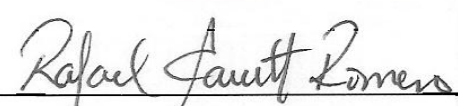
M.C. Rosa Olivia Méndez Estrada
Asesora



M.C. María Isabel Grijalva Haro
Asesora



Dr. Julián Esparza Romero
Asesor



M.C. Rafael Canett Romero
Asesor externo

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado durante la realización de mis estudios de maestría.
- Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD, A.C.) por la oportunidad y facilidades brindadas para realizar y cumplir con una meta más en mi vida.
- A todos los integrantes del comité: Dr. Luis Quihui Cota, Dr. Humberto Astiazarán García, M. C. Rosa Olivia Méndez Estrada, Dr. Julián Esparza Romero, M. C. María Isabel Grijalva Haro y al M. C. Rafael Canett Romero, por todo el apoyo proporcionado durante esta investigación, por la paciencia y la motivación que recibí de su parte. Gracias a cada uno de ustedes.
- Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, DIPA, de la Universidad de Sonora por el apoyo brindado al habilitarnos las instalaciones del bioterio y del laboratorio de Molinos y Panificación, para la elaboración de las dietas.
- A la M. C. Rosy Cabrera, por su apoyo en el trabajo realizado en el laboratorio de Minerales.
- A la QB. Berthita Pacheco, por sus enseñanzas en el laboratorio de Patología Experimental.
- A la QBC. Tere Maciel, por tener tanta paciencia y explicarnos todo lo que sabe y pudo de *Giardia*, gracias Tere.

- Al M. C. Luis Enrique González, por su ayuda brindada durante el trabajo en el laboratorio de Proximal.
- A Fernando Leyva por toda su gran ayuda para conseguir rápidamente el material bibliográfico. Gracias por aguantar tanta carrilla.
- A Iván Rivero por brindarnos todo su apoyo en el bioterio y enseñarnos todo lo que pudo del mantenimiento de los ratones. Muchas gracias.
- A todos mis compañeros del CIAD, pero muy especialmente a Melissa, Kary Gagu, Camelia, Cynthia, Karina, Vianey, Anita (pre y post-chicharito), Montse, Karlita, Lilys. Muchísimas gracias por su amistad; formamos una pequeña familia sonoreNSE, me encantó haberlas conocido y las extrañaré un chorro.
- A Gemma por ser mi cómplice en todas las aventuras del bioensayo, gracias muchacha por todos los momentos agradables y tan divertidos que pasamos con y sin los ratones.
- A mis amigas casi hermanas Zaye, Caro, Annie, Daniela y Erika, las quiero mucho muchachas, gracias por ser mi pañuelo de lágrimas y escucharme cuando más lo necesitaba.
- A todos mis familiares que siempre están presentes.

DEDICATORIA

A mi abuela **Panchita**, usted sería una de las más emocionadas por esta meta que estoy logrando. Hace dos años y medio que nos dejó y la seguimos extrañando como el primer día, esto es para usted.

A mis padres **Francisco y Any** por ser un ejemplo, por su apoyo, por siempre creer en mí, por motivarme, por su amor, por todo...Son los mejores padres que uno pueda tener.

A mi hermano **Ariel** por tu genio que a veces me saca de quicio y también por ser tan ocurrente, pues siempre me sacabas mis buenas carcajadas cuando más lo necesitaba.

Por aguantarme todos mis enojos y corajes durante todo este tiempo, sé que fue difícil, pero lo logramos. Esto fue por y para ustedes, los amo...

Gaby

ÍNDICE

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	II
APROBACIÓN.....	III
DEDICATORIA.....	VI
ÍNDICE.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
RESUMEN.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
Zinc y sus funciones biológicas.....	2
Homeostasis del zinc.....	2
Fuentes Alimentarias y Consumo.....	3
Deficiencia y Repercusiones.....	4
Exceso y Efectos.....	6
Metabolismo de Zinc.....	7
Distribución Corporal.....	7
Absorción.....	9
Disponibilidad.....	10
<i>Giardia lamblia</i>	11
Características Morfológicas.....	11
Ciclo de Vida.....	12
Giardiasis.....	13
Malabsorción de Zinc y su Asociación con Giardiasis.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	19

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Diseño del Estudio.....	20
Área de Bioterio, Número de Ratones Estudiados y su Mantenimiento	21
Elaboración de Dietas Experimentales	22
Cultivos de <i>G. lamblia</i>	23
Establecimiento de Infección en Ratones.....	24
Categorización de los Grupos Experimentales	24
Recolección de Muestras Biológicas	25
Sangre	25
Tejidos	25
Digestión de Muestras para el Análisis de Zinc	26
Dietas Experimentales	26
Tejidos	27
Análisis de Muestras por Absorción Atómica.....	27
Análisis Estadístico.....	28
RESULTADOS.....	30
Experimento 1. Giardiasis y la Concentración de Zinc en Tejidos	30
Experimento 2. Dieta experimental y Peso Corporal	32
Experimento 3. Giardiasis y Peso Corporal	33
DISCUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....	35
Experimento 1. Giardiasis y la Concentración de Zinc en Tejidos.....	35
Experimento 2. Dieta experimental y Peso Corporal	36
Experimento 3. Giardiasis y Peso Corporal	37
CONCLUSIÓN	39
BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de zinc en tejidos humano y de otros animales (mg/kg de peso seco).....	8
Tabla 2. Composición alimentaria de una dieta adecuada administrada a los grupos de ratones en el estudio.....	22
Tabla 3. Dietas experimentales utilizadas en otros estudios con modelo murino.....	23
Tabla 4. Grupos y número de ratones machos CD1 usados durante el curso del bioensayo.....	25
Tabla 5. Concentración de zinc en las dietas experimentales elaboradas para los ratones CD1 (mg Zn/kg dieta).....	28
Tabla 6. Número de ratones CD-1 utilizados en el experimento de giardiasis y concentración de zinc en tejidos.....	30
Tabla 7. Condiciones basales del contenido de zinc en tejidos de los ratones CD-1.....	31
Tabla 8. Comparación de la concentración de zinc en los diferentes tejidos entre los grupos de ratones CD1 con giardiasis y sin giardiasis al final del ensayo.....	32
Tabla 9. Peso corporal de los ratones sujetos a las diferentes dietas experimentales.....	33
Tabla 10. Peso corporal de los grupos de ratones infectados y no infectados con <i>G. lamblia</i>	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización principal del flujo de zinc.....	9
Figura 2. Esquema de la anatomía y morfología de <i>G. lamblia</i>	12
Figura 3. Diseño planteado para el seguimiento de los grupos de ratones en el bioensayo.....	20

RESUMEN

Introducción y Justificación. La asociación entre giardiasis y bajos niveles séricos de zinc en ratones apenas comienza a ser investigado. Se reconoce mundialmente la asociación de giardiasis con la desnutrición y malabsorción de micronutrientes. Por otra parte, no hay estudios que indiquen los niveles de zinc en diferentes tejidos en modelo murino ante una infección. La evaluación de la asociación entre el contenido de zinc en diferentes tejidos y suero en el modelo murino CD-1 con *G. lamblia* proporcionará nuevo conocimiento sobre la interacción entre giardiasis y zinc. **Objetivo.** Determinar los cambios en la concentración de zinc en intestino delgado, hígado, riñones, testículos, huesos largos y suero de ratones machos (CD1) y su asociación con giardiasis (*G. lamblia*, cepa GS/M83-H7). **Métodos.** Setenta y dos ratones CD-1 (machos 4-5 semanas) fueron categorizados en 4 grupos en base a las dietas experimentales a probar [zinc bajo (ZnB, 12.8 mg/kg de dieta), zinc normal (ZnN, 24.6 mg/kg de dieta), zinc alto (ZnA, 57.9 mg/kg de dieta) y zinc muy alto (ZnMA, 309.3 mg/kg de dieta)]. A su vez, la mitad de los grupos de ratones fue infectada con *G. lamblia*. Las muestras se obtuvieron en el inicio y 30 días post-infección. Las concentraciones de zinc fueron determinadas por Absorción Atómica. Los análisis estadísticos se efectuaron con el programa NCSST (2007) y la significancia estadística se estableció a $p < 0.05$. **Resultados.** La giardiasis se asoció al bajo contenido de zinc en suero, testículos, riñones, intestino delgado y huesos largos ($p < 0.05$); excepto en hígado ($p > 0.05$) en los ratones infectados en comparación con los no infectados. **Conclusión.** Se probó que la giardiasis impacta sobre los niveles de zinc en tejidos de ratones a excepción del hepático. Esto podría explicarse debido a que probablemente la infección está causando malabsorción de zinc, como resultado de la presencia del

parásito en el intestino delgado, o a la inmediata utilización del mineral en otros procesos, como en el sistema inmunitario.

INTRODUCCIÓN

El zinc es un mineral indispensable para un correcto funcionamiento del organismo, pues participa en múltiples procesos del metabolismo y de regulación. De acuerdo a la National Research Council (1995), el requerimiento diario de los roedores es de 30 mg Zn/kg de dieta. Al ser constitutivo del organismo, tiene una gran importancia como parte de los componentes biológicos (Hambidge y cols., 2007). Con esto, su relevancia nutricional es alta, ya que es primordial mantener un nivel adecuado de su consumo (Aydemir y cols., 2009).

La relación de giardiasis con los niveles de zinc en ratones, comienza a ser investigada. En el estudio de Quihui y cols. (2011) se evalúa el efecto que tiene la giardiasis sobre los niveles de zinc sérico en roedores. El interés por indagar en este aspecto es debido al desconocimiento que se tiene del metabolismo del zinc ante una giardiasis. Lo que se busca es colaborar con el conocimiento que se tiene, para de alguna manera tratar de resolver la discrepancia de resultados que existe, en relación a un bajo nivel de zinc sérico y la presencia de giardiasis en los niños, que son el grupo más vulnerable (Olivares y cols., 2000; Karakas y cols., 2001; Ertan y cols., 2002; Demirci y cols., 2003).

ANTECEDENTES

Zinc y sus funciones biológicas

Existen varias investigaciones en las que se comprueba la importancia del zinc en los animales y que su privación conlleva serias consecuencias en su desarrollo (Heth y cols., 1966; Beach y cols., 1982; Giugliano y cols., 1984; Bentley y cols., 1991). La función biológica del zinc se reconoce en la estructura y actividad de proteínas, incluidas varias enzimas, factores de transcripción, receptores hormonales y membranas biológicas (Hambidge y cols., 2007). El zinc tiene además, diversas funciones centrales en el metabolismo del ADN y ARN (Dufner-Beattie y cols., 2004).

Homeostasis del zinc

La habilidad para mantener un estado interno constante variando las condiciones externas es esencial para la supervivencia (King y cols., 2000). De acuerdo con Kirchgessner (1993), se puede hablar de homeostasis cuando el flujo del nutriente dentro de un organismo se encuentra en un estado de equilibrio (tomado de King y cols., 2002). Para el caso del zinc, la homeostasis de las células, incluyendo aquéllas del sistema inmune, se mantiene a través de una regulación estricta del ingreso, egreso y distribución de zinc a los organelos intracelulares (Aydemir y cols., 2009). Como el zinc participa activamente con las proteínas para que estas cumplan sus funciones estructurales y catalíticas,

las células deben captar suficiente zinc para garantizar un suministro adecuado, aún cuando se tengan condiciones de bajo consumo nutrimental (Beyersmann, 2002).

Por otra parte, el zinc es mantenido en 3 almacenes temporales: (A) unido fuertemente a una gran variedad de proteínas, especialmente las metalotioneínas, (B) los transportadores de zinc en la membrana plasmática y (C) acumulado en el lumen de las vesículas citoplasmáticas u organelos (Maret, 2001; Beyersmann, 2002; Kambe y cols., 2004). Este tercer almacén temporal ha sido nombrado en varias ocasiones, como “zincosoma” (Beyersmann y cols., 2001).

Todo el zinc intracelular libre debe ser controlado gracias a sus tres almacenes temporales. Primeramente, la captación de zinc a través de la membrana plasmática por medio de las proteínas de la familia ZIP. Seguido del movimiento del zinc hacia los zincosomas por proteínas de la familia ZnT. Si el zinc no ha ingresado a los zincosomas o no se ha dirigido al núcleo, será expulsado al exterior de la célula por medio de estas mismas proteínas. Finalmente, el núcleo sufrirá la activación del factor de transcripción MTF-1 por iones de zinc y la inducción de metalotioneínas que unen fuertemente al mineral. El mecanismo que explica la liberación de zinc de los zincosomas no ha sido elucidado (Beyersmann, 2002).

Fuentes Alimentarias y Consumo

La National Research Council ha propuesto un consumo diario apropiado para los roedores en 30 mg Zn/kg de dieta, que durante el embarazo y la lactancia estos requerimientos se incrementan. A diferencia de otros elementos, este mineral no se acumula en el cuerpo para formar almacenes permanentes (Valko

y cols., 2005). Aunque el zinc se encuentra en la mayoría de los alimentos, su absorción completa es difícil.

El intercambio rápido al que está sometida la reserva reducida de zinc, es importante para la división celular y metabolismo, y depende de una fuente dietaria constante (Trumbo y cols., 2001). Sus fuentes varían ampliamente y es abundante en carnes rojas, ciertos mariscos como las ostras y granos enteros (Black, 2003).

Deficiencia y Repercusiones

Debido a que los modelos experimentales son mantenidos en cautiverio y se cuida completamente su dieta, se asegura que éstos mantengan una dieta adecuada, que cumpla con todos sus requerimientos. Son numerosos los estudios que se han realizado para investigar el efecto de una depleción de zinc dietario en los roedores, donde optan por no incluir nada del mineral en sus dietas (McMahon y cols., 1998; Liuzzi y cols., 2001; King y cols., 2005). En dichos estudios se han encargado de evaluar el efecto que tiene la depleción de zinc sobre los niveles de zinc sérico. Una disminución en su consumo del mineral, afectó negativamente sus niveles de zinc en suero, en comparación con los grupos de animales que se encontraban con un consumo de zinc adecuado.

El interés por estudiar los efectos que tiene la depleción de zinc en modelos experimentales se incrementa debido a que la deficiencia del mineral en humanos resulta en un gran número de problemas en la salud. Entre otros, están la incapacidad de crecimiento, maduración celular, capacidad de aprendizaje, funciones inmunológicas y del sistema nervioso central, susceptibilidad a infecciones y retraso en cicatrización (Kaya y cols., 2009). Por el contrario, los altos niveles de zinc pueden llegar a ser citotóxicos, por lo que

se requiere mantener un estricto control celular sobre sus niveles (Dufner-Beattie y cols., 2004).

Los estudios realizados en modelos experimentales tratan de colaborar con información que ayude a comprender el metabolismo del zinc y tratar de explicar el porqué se presenta la deficiencia del mineral en los humanos. Ante una deficiencia de zinc, el sistema inmune se ve comprometido y es demostrado mediante tres hechos. Primero, para el 2004 la OMS estimó que el 35% de las muertes a nivel global, en menores de 5 años son causadas por su deficiencia, junto con el hierro, yodo y vitamina A (Mathers y Mascarenhas, 2009). Segundo, la enfermedad acrodermatitis enteropática, es causada por la absorción deficiente de zinc (Prasad, 1998), que en la mayoría de los casos, se debe a una mutación autosómica recesiva del transportador Zip4. Tercero, hay una relación entre la disminución del funcionamiento del sistema inmune y la edad. Se ha demostrado que la suplementación con zinc, tiene el potencial de mejorar la respuesta inmune en ancianos (Haase y cols., 2009).

En el 2004, la OMS establece que la deficiencia de zinc conduce a un incremento en la susceptibilidad a infecciones y a enfermedades parasitarias, debido a los daños en la función del sistema inmune (Mathers y Ma Fat, 2008). La deficiencia en México, ha sido demostrada en mujeres y niños, gracias a dos investigaciones (Hunt y cols., 1987; Rosado y cols., 1995). En el caso de Sonora, en el estudio de Chavarría-Quintero (2005), realizado en algunas zonas de Hermosillo de bajo nivel socioeconómico, encontró una prevalencia del 10.4% de deficiencia de zinc en niños de 3 a 5 años, que formaban parte de un programa de abasto social (Liconsa). Para 1999, la Encuesta Nacional de Nutrición estimó que del 19% al 24% de los escolares mexicanos presentaba consumos de zinc dietario por debajo del límite recomendado; mientras que la población del norte del país presentaba un consumo de zinc (4 mg Zn/día) menor a las recomendaciones dietarias establecidas (7 mg Zn/día) (Rivera-Dommarco y cols., 2001).

La suplementación con zinc promueve la actividad y posiblemente, el desarrollo motor, en los infantes más vulnerables a las enfermedades infecciosas (Black, 2003). En el sistema nervioso central, el zinc se concentra en las vesículas sinápticas dentro de un subconjunto llamado “neuronas que contienen zinc”, pertenecientes al grupo de neuronas glutamatérgicas (Frederickson y cols., 2000). Ésta, puede ser una de las razones del porqué ante una deficiencia de zinc, los niños se ven afectados notablemente en su desarrollo mental. Además, la incapacidad de solventar normalmente las actividades de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, conducirá a los infantes a un retraso en el crecimiento (Dufner-Beattie y cols., 2004). La deficiencia de zinc, puede afectar las emociones y la respuesta ante el estrés, factores que pueden influenciar negativamente el desarrollo infantil (Black, 2003).

Exceso y Efectos

De acuerdo a la National Research Council los roedores son relativamente resistentes a la toxicidad por zinc. Aughey y cols. (1977) en su estudio, no encontraron un efecto significativo en los roedores con un consumo de zinc de 500 mg/L de agua en los 14 meses que duró su investigación. Se tiene el dato de que la dosis letal media (DL50) de las sales de zinc, como el cloruro de zinc, es de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal (Osweiler, 1996).

La privación de zinc por ayuno o por su quelación provoca que las células mueran por medio de apoptosis (muerte celular programada) (Truong-Tran y cols., 2001). Asimismo el zinc puede ser citotóxico si se supera la capacidad homeostática del sistema. El alto contenido de zinc altera el transporte del mineral a través de la membrana plasmática. De esta manera se incrementa el nivel de zinc intracelular con la consecuente activación de muerte

celular programada (apoptosis) (Haase y cols., 1999; Beyersmann y cols., 2001).

Metabolismo de Zinc

Las concentraciones celulares de iones libres de zinc son controladas y mantenidas a niveles picomolares. Las herramientas fisiológicas que utiliza el organismo, permiten un flujo y movilización de zinc, que hace posible su distribución a cada órgano, tejido y secreción. De esta manera se asegura el flujo adecuado del mineral y se logra su equilibrio en el organismo (Valko y cols., 2005).

Distribución Corporal

Ciertos tejidos como el hígado, riñón, hueso, retina, próstata y músculo, se caracterizan por ser ricos en zinc (Prasad, 1979) (tabla 1). Debido a que la disponibilidad del zinc se incrementa cuando se consume junto a proteínas, estos tejidos pueden acumular zinc incluso cuando el consumo de éstas es bajo (Oberleas y cols., 1969). En los testículos y la piel del hombre, el contenido de este mineral no ha sido determinado con precisión, aunque clínicamente estos tejidos son sensibles a la depleción de zinc (Prasad, 1979). En la Tabla 1 se resumen los resultados del estudio de Prasad y cols. (1967), en el cual se analizaron los niveles de zinc en los huesos, testículos, músculos, esófago y riñones de los ratones sometidos a una dieta deficiente en zinc.

Tabla 1. Concentraciones de zinc en tejidos humano y de otros animales (mg/kg de peso seco).

	Humano	Ratón		Becerro		Cerdo	
		Normal	Deficiente en Zn	Normal	Deficiente en Zn	Normal	Deficiente en Zn
Hígado	141-245	101±13	89±12	101	84	150.8±12	96.1±8
Riñón	184-230	91±3	80±3	73	76	97.8±3	90.8±4
Pulmón	67-86	81±3	77±9	81	72		
Músculo	197-226	45±5	31±6	86	78		
Páncreas	115-135					139.5±4	88.3±4
Corazón	100	73±16	67±9				
Hueso	218	168±8	69±6	78	63	95±1.8	47±1.6
Próstata							
Normal	520						
Hiperplasia	2330						
Cáncer	285						
Ojo							
Retina	571						
Coroides	562						
Cuerpo ciliar	288						
Testículo		176±12	132±16	79	70	54±2	59±2
Esófago		108±17	88±10			88.1±3	97.6±5

Zn, zinc (Tomado de Halsted, 1974; adaptado de Prasad, 1967).

Los estudios en ratones han demostrado una correlación positiva entre el contenido de zinc en la dieta, plasma y hueso (Smith y cols., 1970). En ocasiones, las concentraciones de zinc en riñón e hígado no disminuyen con la deficiencia del mineral (Halsted y cols., 1974). Por otra parte, gracias a los resultados de los estudios en metabolómica, se han establecido como sitios principales del flujo de zinc al intestino delgado, eritrocitos, riñones, hígado y páncreas (figura 1). El epitelio intestinal ha sido definido como el sitio de

absorción de zinc; mientras que la secreción de zinc pancreática, es la fuente principal de pérdida endógena. Por otra parte, el epitelio renal, se encarga de realizar una reabsorción extensiva de zinc. A pesar de esto, se ha inferido que los sitios principales del flujo metabólico de zinc, son los hepatocitos y eritrocitos (Lichten y cols., 2009).

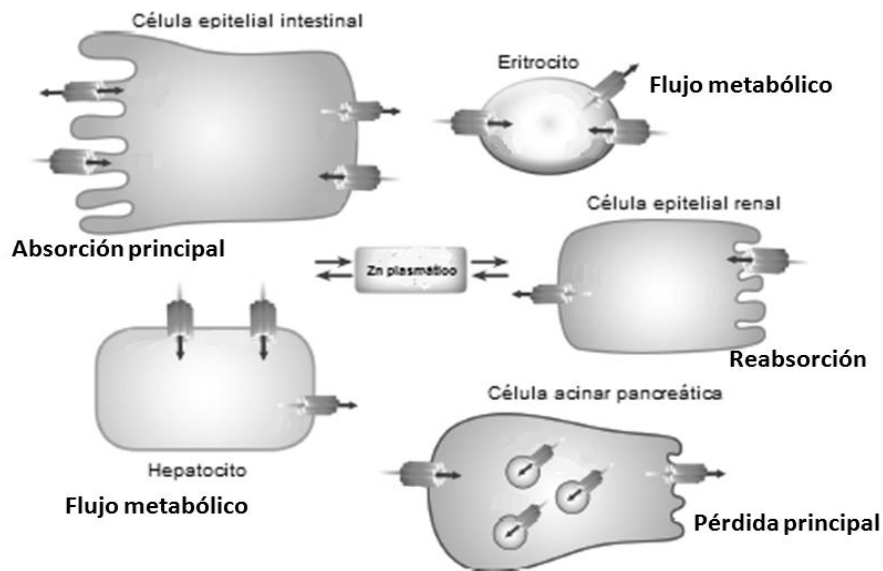


Figura 1. Localización principal del flujo de zinc (Adaptado de Lichten y cols., 2009).

Absorción

En la revisión de Prasad (1979), se menciona que Becker y Hoekstra (1971) concluyeron que la absorción de zinc es variable y que depende de varios factores, tales como el tamaño corporal, niveles de zinc en la dieta, presencia de otros componentes en la dieta que interfieran con su absorción. Con una reducción en el consumo de zinc, se incrementa la capacidad de absorción del mismo en el intestino, contrario a lo que sucedería en condiciones normales de consumo (King y cols., 2000).

McMahon y cols. (1998) y Liuzzi y cols. (2001), realizaron estudios en ratas Sprague-Dawley machos, alimentándolas con diferentes concentraciones de zinc dietario. No encontraron diferencias significativas en zinc sérico entre los grupos con consumo adecuado (30 mg Zn/kg de dieta) y el alto en zinc (180 mg Zn/kg de dieta); mientras que en el de bajo consumo (5 mg Zn/kg de dieta) sí las hubo con respecto a los grupos adecuado y alto. Esto se puede deber a que el grado de absorción es un proceso saturable (Trumbo y cols., 2001), que evidencia una relación directa entre el consumo de zinc y su nivel sérico.

Disponibilidad

La biodisponibilidad de zinc, es decir, la capacidad que tendrá este mineral en ser captado y absorbido en el organismo, para su posterior aprovechamiento, puede ser afectada por muchos factores en varios sitios del organismo. El intestino es el órgano principal en el que las variaciones de disponibilidad afectan los requerimientos de zinc dietario. Entonces, se podría suponer que alguna infección que alterara el tejido intestinal (Scott y cols., 2000), pudiera afectar negativamente el área de absorción de los componentes dietarios. El ambiente dentro del tracto gastrointestinal afecta drásticamente la solubilidad del zinc y su eficiencia absorptiva. La tendencia del mineral a unirse a los ligandos provistos por los constituyentes dietarios se acentúa con un pH prácticamente neutro del lumen intestinal (ACS, 1989). Así, será capaz de unirse con elementos exógenos y endógenos en este sitio (Trumbo y cols., 2001).

Giardia lamblia

El parásito *Giardia* fue descrito por primera vez por Anton van Leeuwenhoek en 1681, cuando observó unos pequeños animáculos en excremento acuoso. A partir de entonces, varios estudiosos investigaron el grupo *Giardia*. En 1952, Francis Filice diferenció tres especies principales, basándose en la morfología y morfometría de los trofozoítos. Éstas fueron: *G. agilis*, *G. muris* y *G. duodenalis* (Simjee, 2007).

Con el paso del tiempo y consecuentes estudios, se han logrado identificar hasta 6 especies, cuyas características han sido determinadas por técnicas como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El grupo “*duodenalis*”, engloba a organismos como “*lamblia*”, aislado a partir del humano, e “*intestinalis*”, a partir de otros mamíferos. La diversidad del grupo se ve afectada, debido a las variaciones genéticas que existen entre ellos (Simjee, 2007).

Características Morfológicas

G. lamblia o *intestinalis* o *duodenalis*, es un protozooario, flagelado y unicelular, que posee simetría bilateral y es piriforme. Además de ser aislada del humano, también lo ha sido de una amplia variedad de otros mamíferos. El trofozoíto, que es su estadio reproductivo, mide aproximadamente de 12 a 15 µm de largo y de 5 a 9 µm de ancho (Simjee, 2007). El citoesqueleto incluye uno o dos cuerpos parabasales o mediales, que se localizan transversalmente y semejan una garra, cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral) y el disco ventral, donde están localizados dos núcleos (Adam, 2001). En la Figura

2, se aprecia un esquema de la anatomía y morfología del trofozoíto de *G. lamblia*.

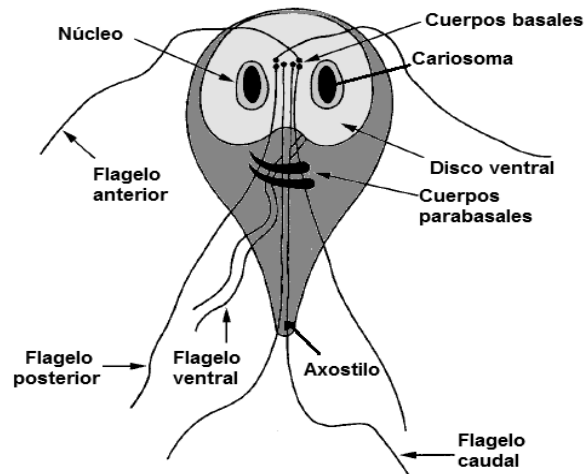


Figura 2. Esquema de la anatomía y morfología de *G. lamblia* (Adaptado de Faubert, 2000).

Por otra parte, en el enquistamiento la división nuclear pero no citoplasmática, ocurre para producir los quistes tetranucleados maduros (Simjee, 2007). Tienen aproximadamente unos 15 μm de longitud y 10 μm de ancho y están cubiertos por una pared de 0.3 a 0.5 μm de espesor, además de las capas externa e interna, que tiene dos membranas (Adam, 2001). Los quistes, son los encargados de llevar a cabo la infección y son muy resistentes (Simjee, 2007).

Ciclo de Vida

Las especies de *Giardia* tienen dos estadios principales en su ciclo de vida (Adam, 2001), en forma de quiste y de trofozoíto. Los trofozoítos se fijan a la superficie luminal de los enterocitos de duodeno y yeyuno, donde se dividirán asexualmente. Después de un periodo de 4 a 7 días, los trofozoítos se liberan

de los enterocitos para llevar a cabo la enquistación. Dicho proceso es consecuencia de su paso a través del intestino delgado, que los expone a las sales biliares y el pH alcalino (Simjee, 2007).

Durante el enquistamiento, los trofozoítos adquieren una forma redondeada y su arquitectura externa se reabsorbe. Así, desaparecen los flagelos y el disco ventral, para dar paso al quiste inmaduro binucleado, que al llegar a la madurez divide sus núcleos. Los quistes son infecciosos para otros hospederos susceptibles inmediatamente después de la excreción (Simjee, 2007). Una vez que el quiste maduro tetranucleado ha sido ingerido por el hospedero, con su división citoplasmática forma dos trofozoítos binucleados, que son los encargados de colonizar el intestino. De esta manera, el ciclo de vida del parásito se repite.

Giardiasis

Los estudios epidemiológicos realizados en diferentes países han demostrado que la situación social y económica de los individuos, es una causa importante de la prevalencia de parasitosis intestinales (Okyay y cols., 2004). Condiciones como bajos niveles educativos, entorno antihigiénico, servicios sanitarios y de agua potable deficientes y el hacinamiento, incrementan la prevalencia de giardiasis (Ratanapo y cols., 2008).

La contaminación en los humanos, sucede a partir de la presencia de quistes en heces y generalmente, es mínima la cantidad que se requieren para provocar la infección, aproximadamente 10 quistes (Grazioli y cols., 2006). Se inicia con la ingestión de agua o alimentos contaminados, aunque también puede ser por contacto fecal-oral directo (Núñez y cols., 2003).

Las manifestaciones clínicas de la giardiasis son muy variadas e inespecíficas. Algunos pacientes pueden sufrir de síntomas extraintestinales, como fiebre, erupciones maculopapulares, infiltrados pulmonares, linfadenopatía, poliartritis y urticaria (Grazioli y cols., 2006), aunque son casos esporádicos. Por lo general, se presentan síntomas como dolor abdominal, náuseas, vómito, en algunos casos se puede presentar diarrea severa, estados de desnutrición y pérdida de peso (Simjee, 2007).

Las personas que padecen de giardiasis asintomática pueden excretar quistes en sus heces (Faubert, 2000). Se ha intentado relacionar la presencia o ausencia de síntomas a la cepa *G. lamblia*, a la severidad de la infección o al sistema inmune del hospedero sin llegar a ser concluyentes (Moya-Camarena y cols., 2002). En algunos casos, si el sistema inmunitario del hospedero está sano y plenamente desarrollado, la fase aguda de la enfermedad se resuelve espontáneamente y los síntomas desaparecen (Faubert, 2000). En otros casos, pueden desarrollar manifestaciones clínicas, que van desde trastornos digestivos ligeros hasta diarrea crónica y malabsorción intestinal (Núñez y cols., 2003; Abou-Shady y cols., 2010).

Se han publicado estudios en animales infectados con *G. lamblia* (Belosevic y cols., 1984; Heyworth y cols., 1987; Byrd y cols., 1994; Figueroa y cols., 2003) y recientemente con el estudio de procesos de malabsorción de nutrientes en los animales infectados (Astiazarán-García y cols., 2000; Quihui-Cota y cols., 2011). Estos últimos surgen para tratar de responder a la incógnita de la posible relación de la giardiasis con las alteraciones del proceso de absorción de los nutrientes (Scott y cols., 2000).

El interés por descubrir dicha relación surge debido a que las infecciones intestinales, tanto en humanos como en otros mamíferos, son un problema mundial. Uno de los principales agentes causales es *G. lamblia* (Faubert, 2000; Adam, 2001). Según la Encuesta Nacional de Nutrición en 1999, gran parte de la población mexicana era portadora de dicho parásito, sobre todo aquéllas

localizadas en zonas de bajo ingreso (Rivera-Dommarco y cols., 2001). Actualmente, la prevalencia mundial entre los menores de 10 años es del 15% al 20 % (Pennardt, 2009). Mientras que en México en un estudio realizado en el 2000, se estimó una presencia del 30% para *G. lamblia* en una comunidad de la Ciudad de México (Sánchez-Vega y cols., 2000). Conjuntamente, según la Secretaría de Salud, en el 2006, Sonora se encontraba entre los 5 estados de mayor prevalencia de giardiasis (Rascón-Durán, 2008) por que la giardiasis, es considerada un problema de salud pública en Sonora.

Los esfuerzos gubernamentales realizados para el control de la giardiasis, posiblemente se ven obstaculizados debido a las limitaciones que existen en el conocimiento de los mecanismos celulares, moleculares y factores socioculturales de la interacción hospedero-patógeno. Sin embargo, pocos estudios se han enfocado en los efectos potenciales de una giardiasis moderada o asintomática, en la absorción de nutrientes y con ello, sus efectos en el nivel nutricional del huésped (Moya-Camarena y cols., 2002).

Malabsorción de Zinc y su Asociación con Giardiasis

El riesgo de morir de una enfermedad diarreica, es proporcional al grado de malnutrición. Estas enfermedades se caracterizan por tener un efecto adverso sobre la absorción intestinal y se puede explicar por medio de varios mecanismos. Se ha hipotetizado a partir de estudios en animales, que uno de ellos es la destrucción de los enterocitos o células de la cripta por el patógeno o bien por la respuesta inmune del individuo. Otro de los casos sería el incremento de la motilidad intestinal con una reducción del tiempo de tránsito. Finalmente, la absorción podría estar afectada por la disminución de los ácidos

biliares, ya sea por la pérdida fecal incrementada o hidrólisis bacteriana (O'Loughlin y cols., 1991; Semba y cols., 2008).

La asociación entre la deficiencia de zinc y la infección ha sido escasamente investigada, aunque hay evidencia de la asociación de *G. lamblia* con la desnutrición (McDonald, 2003) y la deficiencia de ciertos micronutrientes como la vitamina A (Astiazaran-Garcia y cols., 2010). Sin embargo, las causas de la deficiencia de zinc pueden ser multifactoriales y existe una gran discrepancia de los resultados de las investigaciones. Karakas y cols. (2001), encontraron un incremento en los niveles séricos de zinc en niños turcos después de su tratamiento antiparasitario contra giardiasis. Similarmente, Ertan y cols. (2002) y Demirci y cols. (2003), demostraron bajos niveles de zinc en niños con la infección, en comparación con el control. Contrario a lo anterior, Olivares y cols. (2000) en niños españoles de 9 años, no obtuvieron dicha asociación antes y después del tratamiento.

En el caso de México, Quihui y cols. (2010) encontraron que la giardiasis puede ser un factor de riesgo para la deficiencia de zinc en los escolares del noroeste de México. Además, señalan la relevancia de posteriores estudios que puedan aclarar el mecanismo implicado en la interacción de zinc y giardiasis.

Sin embargo, los estudios en modelos experimentales en relación a la giardiasis recién comienzan a surgir. El estudio realizado por Quihui y cols. (2011), se enfoca en la relación que hay entre los niveles de zinc sérico de ratones con giardiasis y cómo son afectados. De tal manera que dicho estudio, provee una pauta para posteriores estudios que indaguen más sobre el tema.

Al evaluar la respuesta, es decir, la capacidad que tienen los órganos de asimilar el zinc ante una giardiasis, se podría adquirir mayor conocimiento sobre el funcionamiento, movilización y metabolismo corporal de dicho mineral.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe una carencia de estudios que proporcionen información sobre el metabolismo del zinc. Por lo tanto, existe una necesidad de la misma y sobre los efectos que pueden presentarse sobre el estado nutricional de zinc del hospedero durante el curso de una infección.

Por lo tanto, este es un estudio exploratorio en el que se usa al ratón como modelo experimental, y con él se espera que giardiasis tenga efecto sobre los niveles de zinc y su distribución en los diferentes tejidos del ratón durante el curso de la misma. Por consiguiente, el propósito de este estudio fue el de establecer las bases para poder explicar si hay una asociación entre el estado de zinc y giardiasis, y proporcionar información adicional sobre el metabolismo del mismo durante el curso de una infección, con lo que se cuestiona lo siguiente:

¿Existe algún cambio en la distribución de zinc en un ratón con giardiasis?

HIPÓTESIS

La concentración de zinc en los diferentes tejidos de ratones machos de la cepa CD-1 disminuye a causa de la infección con *G. lamblia* de la clona GS/M83-H7.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en la concentración de zinc en intestino delgado, hígado, riñones, testículos, huesos largos y suero de ratones machos (CD-1) y su asociación con giardiasis (*G. lamblia*, cepa GS/M83-H7).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la cantidad de zinc en intestino delgado, hígado, riñones, testículos, huesos largos y suero de los ratones con giardiasis y sin giardiasis.
2. Determinar los cambios en las concentraciones de zinc en los diferentes tejidos de ratones con giardiasis y sin giardiasis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

En la figura 3 aparece un diagrama del diseño seguido para el desarrollo del bioensayo con el modelo murino. La duración del bioensayo fue de 37 días, durante el cual se tomaron muestras en dos ocasiones, una al inicio y otra al final de experimento.

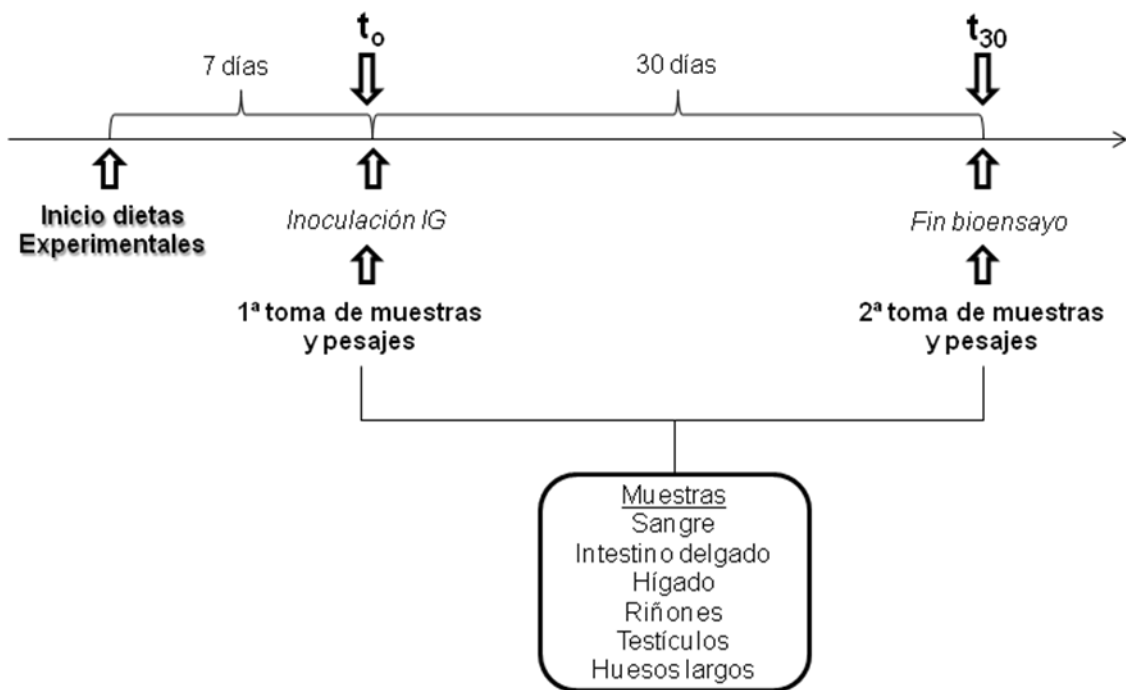


Figura 3. Diseño planteado para el seguimiento de los grupos de ratones en el bioensayo.

t_0 , tiempo de cero días; t_{30} , tiempo de treinta días de iniciado el bioensayo; IG es inoculación intragástrica.

Área de Bioterio, Número de Ratones Estudiados y su Mantenimiento

El área de bioterio de la Universidad de Sonora fue desinfectada con solución de hipoclorito de sodio al 10 % (Cuadras-Romo y cols., 2010). La ventilación del área fue mantenida con 10 a 14 recambios de aire por hora y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con acceso a agua y alimentación *ad libitum* (Rascón-Durán, 2008). Antes de iniciar el experimento, los ratones fueron mantenidos con la dieta normal 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable) 2018S, Teklad Global Diets (Cuadras-Romo y cols., 2010) por 7 días, para conseguir el equilibrio y homogeneización de los ratones. La cepa de ratones CD-1 con la que se trabajó era proveniente de “The Jackson Laboratory” (EUA). Esta cepa ha demostrado ser susceptible a la infección con *G. lamblia* (Scott y cols., 2000; Von Allmen y cols., 2004).

Cuando los ratones llegaron a los 28 días de nacidos, su dieta normal fue cambiada por las dietas experimentales (con diferentes niveles de zinc). Después de la adaptación de 7 días, los 72 ratones machos CD-1 (5-7 semanas) fueron categorizados en infectados y no infectados con *G. lamblia*, proceso que siguió con las subsecuentes tomas de muestras de tejidos y de sangre. Se usaron ratones machos, para poder evaluar el efecto que se tiene sobre los testículos. Además, los pesos de los ratones fueron monitoreados durante el curso del ensayo para observar el efecto de la dieta o de giardiasis sobre su crecimiento.

Elaboración de Dietas Experimentales

La National Research Council (1995) ha sido el organismo encargado de establecer la dieta adecuada para los roedores, tal como se aprecia en la Tabla 2. En base a la información sobre las dietas experimentales usadas en estudios previos con modelos murinos (tabla 3) se prepararon las dietas que se aplicaron durante el curso del estudio.

Tabla 2. Composición alimentaria de una dieta adecuada administrada a los grupos de ratones en el estudio.

Fuente dietaria	Cantidad agregada, durante la elaboración la dieta g/kg
Caseína (Dyets Inc. #400627)	200
Aceite de maíz (Comercial)	50
Fibra (Dyets Inc. #401850)	50
Mezcla de vitaminas (Dyets Inc. TD AIN-76A #300050)	10
Mezcla de minerales (Dyets. Inc AIN-93G-MX #215264)	35
Gluconato de zinc	--
Colina (Dyets Inc. #400750)	2
Almidón (Comercial)	653
Sucrosa	Suficiente en mezcla de minerales

Fuente: National Research Council (1995).

Tabla 3. Dietas experimentales utilizadas en otros estudios con modelos murinos.

Zinc en dieta	Contenido de Zinc, mg Zn/kg de dieta
Bajo, ZnB*	≤ 1
Normal, ZnN**	30
Alto, ZnA***	180
Muy alto, ZnMA	1000

ZnB, zinc bajo; ZnN, zinc normal; ZnA, zinc alto; ZnMA, zinc muy alto.

*Liuzzi y cols., 2001; **King y cols., 2005; ***McMahon y cols., 1998; ****Barone y cols., 1998; Tran y cols., 2003.

Teniendo los ingredientes, se elaboraron las dietas ZnB, ZnN y ZnA de 8 kilogramos cada una; mientras que la dieta ZnMA, fue de 4 kilogramos debido a que el número de ratones en el grupo era menor que en el resto. Se utilizó una balanza analítica Ohaus Champ, una mezcladora Hobart modelo AS200T y la suplementación fue con gluconato de zinc (Salgueiro y cols., 2002).

Cultivos de *G. lamblia*

El parásito *G. lamblia* se cultivó en el medio TYI-S33, suplementado con 10 % de suero bovino (SIGMA) y ceftriaxona al 0.2% (Astiazarán-García y cols., 2000). Una vez sembrada la cepa en tubo de 15x120, se incubó a una temperatura de 37°C en condiciones semi-anaeróbicas (Corral y cols., 2001; Barreras-Morales y cols., 2002; Figueroa y cols., 2003). La cepa de la clona GS/M83-H7 adquirida a la American Type Culture Collection (ATCC, 50581), fue proporcionada por el laboratorio de Patología Experimental, del Dr. Astiazarán.

Establecimiento de Infección en Ratones

Los cultivos de las cepas del parásito, se enfriaron en hielo por 15 minutos y se centrifugaron a 250 g por 10 minutos. Se ajustó la concentración del inóculo en 5×10^6 trofozoítos en 100 μ L de solución salina de fosfatos (PBS), a pH 7.2 (Byrd y cols., 1994). La viabilidad de los trofozoítos se confirmó mediante la prueba de exclusión del colorante azul de tripano, desarrollada por Kaltenbach y cols. (1958). Todos los animales fueron inoculados intragástricamente con los trofozoítos, exceptuando a los del grupo control (con PBS), a los 7 días después del periodo de adaptación con las dietas. La infección se realizó utilizando una cánula para alimentación forzada (Astiazarán-García y cols., 2000; Corral y cols., 2001; Barreras-Morales y cols., 2002; Figueroa y cols., 2003) al inicio del experimento y se mantuvieron por 30 días (Belosevic y cols., 1984; Velázquez y cols., 2005).

Categorización de los Grupos Experimentales

De acuerdo a lo anterior, los 72 ratones machos fueron categorizados en 4 grupos en base a las dietas a administrar y los que a su vez, fueron agrupados en infectados con *G. lamblia* y no infectados con *G. lamblia*. Durante el curso de la infección murieron 5 ratones del bioensayo, por lo que se trabajó con un total de 67 ratones. En la tabla 4 se muestra el número de ratones incluidos en cada uno de los grupos de ratones formados (McMahon y cols., 1998; Songur y cols., 2005).

Tabla 4. Grupos y número de ratones machos CD-1 usados durante el curso del bioensayo.

Giardiasis	ZnB	ZnN	ZnA	ZnMA
Infectado <i>n=33</i>	9	9	10	5
No infectado <i>n=34</i>	9	10	9	6

Recolección de Muestras Biológicas

Sangre

Se obtuvo un volumen de 0.8-1.0 mL de sangre total mediante punción cardiaca (Hoff, 2000), al inicio y al final del ensayo. Se almacenó en tubos cónicos de 1.5 mL (Eppendorf). Las muestras fueron incubadas por 30 minutos para favorecer la formación del coágulo de sangre. Una vez formado, se centrifugaron a 14000 rpm por 3 minutos para la separación del suero. Las muestras se almacenaron a -70°C para la determinación posterior de zinc sérico.

Tejidos

Después de la recolección de las muestras sanguíneas se extrajeron el intestino delgado, hígado, riñones y testículos de los ratones CD-1 para la determinación de zinc. Éstos fueron eutanizados con cloroformo al inicio y al final del bioensayo. Se colocaron en una cama de cirugía para roedores y se desinfectaron con alcohol (Cuadras-Romo y cols., 2010). Se intervino la región

abdominal con el uso de material quirúrgico estéril (Liuzzi y cols., 2001) y se llevo a cabo la punción cardiaca para la obtención de sangre. Los órganos individuales fueron extraídos y colocados en viales Eppendorf, para almacenarlos a -70°C, hasta que fueron procesados.

Posteriormente se secaron las muestras de los tejidos por 12 horas a 100°C, para poder obtener el peso seco. Se utilizaron cápsulas de porcelana, una balanza analítica (Sartorius Research R300S) y estufa de convección (VWR, Scientific Inc. # serie 1080104).

Digestión de Muestras para el Análisis de Zinc

Dietas Experimentales

Se colocaron 0.5 g de cada una de las dietas en vasos de digestión, por duplicado. Para la digestión ácida se utilizó como estándar de referencia Hígado bovino (SRM 1577). A cada uno de los vasos digestores que contenían las dietas experimentales y el control, se les añadieron 2 mL de H₂O deionizada y 8 mL de Ácido Nítrico (HNO₃). Cinco minutos después se cerraron las válvulas de liberación de presión de cada uno de los vasos digestores y finalmente, se procedió con la digestión por microondas (MDS-2000, CEM Microwave Innovation System, Modelo #924020).

Tejidos

Una vez secas las muestras de tejidos, se pesaron en su totalidad por duplicado en los vasos digestores utilizando como estándar de referencia hígado bovino (SRM 1577). A cada vaso se agregaron 6.4 mL de Ácido Nítrico (HNO_3) y 1.6 mL de H_2O deionizada. Posteriormente, al cabo de 5 minutos las válvulas de liberación de presión de los vasos digestores se cerraron y fueron introducidos en el microondas (MDS-2000, CEM Microwave Innovation System, Modelo #924020).

Análisis de Muestras por Absorción Atómica

Todas las muestras de dietas y de tejidos previamente digeridas, y las de suero fueron analizadas para la determinación de zinc usando un Espectrofotómetro de Absorción Atómica con Atomizador en Flama Aire-Acetileno (Varian-SpectrAA-20) (Devergnas y cols., 2004) con registros de lectura a una longitud de onda de 214 nanómetros (Prasad y cols., 1967) y con lámpara de zinc de cátodo hueco. Para el análisis de suero, se utilizó la técnica 999.11 de la AOAC (2000). Dicha técnica utiliza 0.4 mL de suero, que son diluidos con 2 mL de solución Brij 35 al 0.03%. Se usó como control una muestra certificada de leche NIST SRM Nonfat Milk 1549 con un intervalo de confianza al 95% y con una concentración de $46.1 \pm 2.2 \mu\text{g Zn/mL}$. Para el análisis de las muestras de tejido, se manejó como control el hígado bovino, previamente mencionado, con una concentración de $127 \pm 16 \mu\text{g Zn/dL}$.

Las concentraciones finales de las dietas elaboradas con las que se trabajó, aparecen en la tabla 5.

Tabla 5. Concentración de zinc en las dietas experimentales elaboradas para los ratones CD-1 (mg Zn/kg dieta).

ZnB	ZnN	ZnA	ZnMA
12.8 ± 1.4	24.6 ± 6.2	57.9 ± 5.5	309.3 ± 2.9
CV: 11%	CV: 25%	CV: 9.5%	CV: 1%

Datos aparecen como $\bar{x} \pm DS$ (ZnB, zinc bajo; ZnA, zinc alto). CV es coeficiente de variación.

Análisis Estadístico

Experimento 1. Durante el estudio de la asociación entre giardiasis y la concentración de zinc corporal, los valores de las concentraciones de zinc en tejidos al final del bioensayo son descritos como medianas y sus respectivos rangos intercuartílicos. Los tamaños de muestra utilizados para cada tejido fue: n = 4 (Giardiasis), n = 4 (Sin giardiasis). Fueron analizados por la prueba U de Mann-Whitney y la significancia estadística a $p < 0.05$, usando el paquete estadístico NCSS (2008).

Experimento 2. Los datos de peso corporal de los ratones en relación a la dieta experimental aparecen como medianas (rangos intercuartílicos). Se analizaron con las pruebas de Kruskal-Wallis y la significancia estadística a $p < 0.05$, en el paquete estadístico NCSS (2008). Los tamaños de muestras fueron los siguientes: n = 6 (ZnB), n = 6 (ZnN), n = 7 (ZnA), n = 4 (ZnMA), para cada una de las dietas.

Experimento 3. Los resultados del peso corporal de los ratones en relación a la giardiasis, aparecen como medianas (rangos intercuartílicos). Se trabajaron los siguientes tamaños de muestra: n = 12 (Giardiasis), n = 11 (Sin giardiasis), y

fueron analizados con la prueba U de Mann-Withney y la significancia estadística a $p < 0.05$ en el paquete estadístico NCSS (2008).

RESULTADOS

Experimento 1. Giardiasis y la Concentración de Zinc en Tejidos

Para el análisis estadístico de los resultados del experimento, se trabajó con el tamaño de muestra que aparece en la tabla 6. Se trabajó con pools de ratones generados a partir del sacrificio de 3 ratones por grupo, de tal manera que en total se tenía un tamaño de muestra de 4 pools.

Tabla 6. Número de ratones CD-1 utilizados en el experimento de giardiasis y concentración de zinc en tejidos.

Grupo inicial	Giardiasis	Sin giardiasis
ZnB	1 pool = 3 ratones	1 pool = 3 ratones
ZnN	1 pool = 3 ratones	1 pool = 3 ratones
ZnA	1 pool = 3 ratones	1 pool = 3 ratones
ZnMA	1 pool = 3 ratones	1 pool = 3 ratones
Total	4 pools	4 pools

Tamaño de muestra considerado al inicio y al final del experimento.

La tabla 7 presenta las condiciones iniciales correspondientes a las concentraciones de zinc para cada uno de los tejidos de ratones infectados y no infectados con giardiasis. Para el caso del zinc sérico, se obtuvo una mediana de la concentración de 1.2 µg/mL con un rango intercuartílico de 0.7 µg Zn/mL.

Tabla 7. Condiciones basales del contenido de zinc en tejidos de ratones CD-1.

Muestras <i>n=4 pools/tejido</i>	Concentración de Zinc (mg Zn/kg peso seco)	RIQ
Hígado	77.4	16.5
Intestino delgado	116.9	8.8
Testículos	114.9	8.7
Huesos largos	139.8	18.8
Riñones	66.4	4.5

Valores expresados como medianas; RIQ, rango intercuartílico.

En la tabla 8 se exhiben los resultados de la concentración de zinc en los diferentes tejidos de los grupos de ratones con giardiasis y sin giardiasis a los treinta días post-infección. No se observó cambio en las concentraciones de zinc hepático entre los grupos infectados y no infectados ($p=0.34$); mientras que en el resto de los tejidos se observa una reducción en la concentración de zinc asociada a la infección ($p<0.05$). La mediana que se obtuvo para la concentración de zinc sérico fue de $0.83 \mu\text{g Zn/mL}$ para el grupo de ratones con giardiasis; mientras que el grupo libre de giardiasis tuvo $1.32 \mu\text{g Zn/mL}$, que resultó ser una diferencia significativa ($p=0.03$).

Tabla 8. Comparación de la concentración de zinc en los diferentes tejidos entre los grupos de ratones CD-1 con giardiasis y sin giardiasis al final del ensayo.

Concentración de zinc (mg Zn/kg peso seco)			
Tejidos	Giardiasis	Sin giardiasis	p*
	<i>n = 4 pools</i>	<i>n = 4 pools</i>	
<i>Testículos</i>	104.05 (12.3)	128.16 (25.6)	0.029
<i>Hígado</i>	81.39 (14.01)	86.55 (24.05)	0.34
<i>Riñones</i>	57.57 (3.6)	76.97 (6.56)	0.03
<i>Intestino delgado</i>	106.13 (18.3)	136.99 (7.32)	0.028
<i>Huesos largos</i>	108.2 (35.7)	159.8 (22.27)	0.03

Valores expresados como medianas, entre paréntesis rangos intercuartílicos.

*Prueba U de Mann-Whitney, significancia con $p < 0.05$.

Experimento 2. Dieta experimental y Peso Corporal

En un inicio, los ratones seleccionados entre edades de 4 a 5 semanas tuvieron un peso inicial promedio de 31.9 ± 1.8 g. Se midió el peso corporal de los ratones para evaluar el cambio que tuvieron al final del bioensayo. En la tabla 9 se observa que la ganancia de peso es significativa para los grupos de ratones con dietas normal ($p=0.04$) y alta en zinc ($p=0.02$); y aunque en las dietas baja ($p=0.8$) y muy alta en zinc ($p=0.1$) no hubo ganancia significativa, se observó una tendencia de aumento.

Tabla 9. Peso corporal de los ratones sujetos a las diferentes dietas experimentales.

Peso corporal (g)				
Dieta	Inicial	Final	ΔG	Valor de *p
ZnB <i>n=6</i>	31 (1.7) ^a	31.5 (4.8) ^e	0.5 ⁱ	p=0.8
ZnN <i>n=6</i>	32.1 (2.1) ^b	33.5 (4.8) ^f	1.4 ^j	p=0.04
ZnA <i>n=7</i>	31 (1.3) ^c	33.5 (3.8) ^g	2.5 ^k	p=0.02
ZnMA <i>n=4</i>	30.9 (0.7) ^d	36.4 (5) ^h	5.5 ^l	p=0.1

Valores expresados como medianas, entre paréntesis rangos intercuartílicos.

ΔG , ganancia de peso.

*Prueba de Wilcoxon, significancia con $p < 0.05$.

Comparación abcd, Kruskal-Wallis, $p = 0.2$.

Comparación efgh, Kruskal-Wallis, $p = 0.09$.

Comparación ijkl, Kruksal-Wallis, $p = 0.02$.

Experimento 3. Giardiasis y Peso Corporal

Los resultados de la relación entre el peso corporal de los ratones y la presencia de giardiasis, se incluyeron en la tabla 10. Se observó que en presencia de la infección, la ganancia de peso no fue significativa ($p=0.2$); mientras que en el grupo sin giardiasis, la ganancia de peso fue significativa ($p=0.004$).

Tabla 10. Peso corporal de los grupos de ratones infectados y no infectados con *G. lamblia*.

Peso corporal (g)				
Infección	Inicial	Final	ΔG	Valor de *p
Giardiasis	31 (1.1) ^a <i>n</i> =12	31.6 (3.1) ^c <i>n</i> =12	0.6 ^e	<i>p</i> =0.2
Sin giardiasis	31.4 (1.7) ^b <i>n</i> =11	35.7 (2.2) ^d <i>n</i> =11	4.3 ^f	<i>p</i> = 0.004

Valores expresados como Medianas (RIQ, rango intercuartílico). ΔG, ganancia de peso.

*Prueba de Wilcoxon, significancia con $p < 0.05$.

Comparación ab, prueba U de Mann-Whitney, $p = 0.2$.

Comparación cd, prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.01$.

Comparación ef, prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.01$.

DISCUSIÓN Y RECOMENDACIONES

Experimento 1. Giardiasis y la Concentración de Zinc en Tejidos

En el trabajo, la giardiasis tuvo un efecto negativo sobre la concentración de zinc sérico en los grupos de ratones, 30 días post-infección. Existen varios estudios en humanos, en los que igualmente se demuestra el efecto negativo que tiene la giardiasis sobre los niveles de zinc sérico de niños (Karakas y cols., 2001; Ertan y cols., 2002; Demirci y cols., 2003; Abou-Shady y cols., 2010). Se podría considerar que la giardiasis probablemente representa un factor de riesgo para la deficiencia de zinc, independientemente del consumo de zinc dietario. Por otra parte, en estudios en animales de experimentación, se ha encontrado un efecto negativo en la concentración de zinc sérico asociado a giardiasis en ratones infectados (Quihui-Cota y cols., 2011).

En este estudio se encontró que la giardiasis tiene un efecto negativo sobre el contenido de zinc en intestino delgado, a los 30 días post-infección. Se ha reconocido que las enfermedades intestinales como la giardiasis pueden afectar la absorción intestinal en el hospedero (O'Loughlin y cols., 1991; Semba y cols., 2008). A pesar de que en la actualidad se desconoce el mecanismo exacto por el cual *G. lamblia* compromete el metabolismo de zinc, existen ciertas hipótesis que podrían explicar la disminución de zinc sérico: a) el daño en la mucosa intestinal y microvellosidades derivado de la infección, que podría conducir a la malabsorción de zinc con impacto en el zinc sérico, y/o b) de la posible redistribución del zinc en circulación hacia aquellos sitios donde se le es requerido para los procesos inmunológicos en contra de giardiasis (O'Loughlin y

cols., 1991; Scott y cols., 2000), lo cual explicaría también una disminución del zinc sérico.

Dicha redistribución del zinc en circulación, podría explicar los bajos niveles en la concentración de zinc en riñones, huesos largos y testículos de nuestros ratones infectados con *G. lamblia*. Puede ser que el zinc de estos tejidos se movilice para suministrar al sistema inmunitario. Sin embargo, en la actualidad no hay trabajos realizados en relación a esta parte de nuestro estudio.

La giardiasis no tuvo efecto sobre el contenido de zinc en el tejido hepático de los ratones a los 30 días post-infección. El hígado representa uno de los principales sitios de flujo metabólico del zinc (Lichten y cols., 2009). Si el mineral se encuentra en constante movimiento debido a su flujo metabólico en el hepatocito, esto dificultaría el intento por encontrar un cambio de zinc en este órgano, lo cual podría explicar una ausencia de su cambio entre ratones infectados y no infectados.

Experimento 2. Dieta experimental y Peso Corporal

En este estudio se observó la relación entre bajo zinc dietario y bajo peso corporal en los grupos de ratones CD-1. Se observó que entre menor es la cantidad de zinc dietario, menor será la ganancia en peso de los ratones. Las diferencias que hubo entre los pesos corporales de los diferentes grupos dietarios, resultaron ser significativas. Estudios en animales, como los de Blalock y cols. (1988), Shi y cols. (1998), King y cols.(2005), publicaron resultados similares a los encontrados en este estudio. Ellos encontraron una disminución en el peso de los ratones sujetos a dietas pobres en zinc dietario. Sin embargo, hay estudios en los que la dieta baja en zinc no tuvo ningún

impacto en la ganancia de peso de los ratones estudiados (Filteau y cols., 1982). La ausencia de diferencias en este último estudio, puede ser debido a que ellos realizaron el pesaje de los ratones a los 20 días post-infección. Probablemente sea un tiempo insuficiente para observar cambios en el peso corporal de los ratones, en comparación con el tiempo post-infección transcurrido en este estudio. Por otra parte, existen varios estudios en humanos que muestran que la consecuencia de una dieta baja en zinc, puede conducir a enanismo o retraso en el crecimiento (Prasad y cols., 1963; Brown y cols., 1998; Ackland y cols., 2006).

Experimento 3. Giardiasis y Peso Corporal

La infección por giardiasis presentó un impacto negativo en el peso corporal de los ratones en este estudio 30 días post-infección. En estudios como el de Fraker y cols. (1982), publicaron resultados similares a este trabajo en los que tripanosomiasis promovía una menor ganancia de peso en los ratones infectados, en comparación con los del grupo no infectado a los 10 días post-infección. De manera similar se encontró en el estudio de Fiore y cols. (1996), que los ratones infectados con *S. mansoni* mostraban una menor ganancia de peso en ratones infectados por 8 semanas. Se ha comprobado que las infecciones parasitarias tienen un efecto negativo sobre la absorción de nutrientes como la vitamina A (Long y cols., 2006; Astiazaran-Garcia y cols., 2010) y un efecto negativo sobre la proteína y energía (Muniz-Junqueira y cols., 2002). Por ello, podríamos suponer que la giardiasis está impidiendo la ganancia de peso de los ratones debido a la malabsorción de los nutrientes dietarios.

Por otra parte, una limitación en este estudio es la no aleatorización de los grupos de ratones. En futuros estudios, se aconseja seguir los lineamientos apropiados para conseguir la aleatorización en las muestras y poder inferir con mayor certeza sobre los resultados, sin embargo el análisis de los cambios confirma los resultados. El hecho de analizar los cambios, ajusta por las posibles diferencias en los grupos formados no de manera aleatoria.

Sin embargo, la información posibilita el estudio de la distribución y el comportamiento que tiene el zinc durante el curso de una giardiasis. Por ello se recomienda la realización de estudios incrementando el tamaño de muestra, para poder seguir explorando el mecanismo que explique los cambios observados en los niveles de zinc en los tejidos durante el curso de una infección por *G. lamblia*. Similarmente, los estudios enfocados en la medición de los transportadores de zinc, podrán proporcionar resultados a nivel celular mucho más específicos y certeros, debido a su alta sensibilidad por el zinc.

Además, se desconoce si realmente la infección está causando malabsorción del zinc, al ser alojado el parásito en el intestino delgado. Los estudios posteriores en este respecto, así como de los transportadores de zinc, podrán contribuir con el conocimiento acerca del metabolismo, distribución y movilización del mineral en el organismo, ya sea con modelos experimentales o en humanos. La información obtenida puede ser compartida con las autoridades a cargo de las campañas de fortificación y de desparasitación, para asegurar que la población no se encuentre en riesgo a una deficiencia de zinc.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se observó que a la giardiasis se le encuentra asociada con el bajo contenido de zinc en suero, testículos, riñones, intestino delgado y huesos largos de ratones CD-1, a excepción del tejido hepático. De igual forma, se observó un peso corporal en presencia de la misma. Con lo anterior se puede sugerir que giardiasis representa un factor de riesgo para un bajo nivel de zinc en tejidos de ratones CD-1. Esta información puede contribuir al conocimiento del estudio del metabolismo del zinc y su comportamiento fisiológico ante una infección en modelos experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Shady, O., El Raziky, M., Zaki, M. y Mohamed, R. 2010. "Impact of Giardia lamblia on Growth, Serum Levels of Zinc, Copper, and Iron in Egyptian Children." *Biological Trace Element Research*: 1-6.
- Ackland, M. y Michalczyk, A. 2006. "Zinc deficiency and its inherited disorders-A review." *Genes & Nutrition* **1**(1): 41-49.
- ACS, A. C. S. 1989. *Theoretical and Practical Aspects of zinc uptake and absorption*. New York, Plenum Press.
- Adam, R. 2001. "Biology of Giardia lamblia." *Clinical microbiology reviews* **14**(3): 447.
- Astiazarán-García, H., Espinosa-Cantellano, M., Castañón, G., Chávez-Munguía, B. y Martínez-Palomo, A. 2000. "Giardia lamblia: effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of gerbils (*Meriones unguiculatus*)." *Experimental parasitology* **95**(2): 128-135.
- Astiazaran-Garcia, H., Lopez-Teros, V., Valencia, M. E., Vazquez-Ortiz, F., Sotelo-Cruz, N. y Quihui-Cota, L. 2010. "Giardia lamblia Infection and Its Implications for Vitamin A Liver Stores in School Children." *Annals of Nutrition and Metabolism* **57**(3-4): 228-233.
- Aughey, E., Grant, L. y FurmanWilliam F, B. L. 1977. "The effects of oral zinc supplementation in the mouse." *Journal of comparative pathology* **87**(1): 1-14.
- Aydemir, T., Liuzzi, J., McClellan, S. y Cousins, R. 2009. "Zinc transporter ZIP8 (SLC39A8) and zinc influence IFN- γ expression in activated human T cells." *Journal of leukocyte biology* **86**(2): 337.
- Beach, R., Gershwin, M. y Hurley, L. 1982. "Reversibility of developmental retardation following murine fetal zinc deprivation." *Journal of Nutrition* **112**(6): 1169.
- Belosevic, M., Faubert, G., Guy, R. y MacLean, J. 1984. "Observations on natural and experimental infections with Giardia isolated from cats." *Canadian journal of comparative medicine* **48**(3): 241.
- Bentley, P. y Grubb, B. 1991. "Effects of a zinc-deficient diet on tissue zinc concentrations in rabbits." *Journal of animal science* **69**(12): 4876.
- Beyersmann, D. 2002. "Homeostasis and cellular functions of zinc." *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **33**(12): 764-769.
- Beyersmann, D. y Haase, H. 2001. "Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells." *Biometals* **14**(3): 331-341.
- Black, M. 2003. "The evidence linking zinc deficiency with children's cognitive and motor functioning." *Journal of Nutrition* **133**(5): 1473S.

- Black, R. 2003. "Zinc deficiency, infectious disease and mortality in the developing world." *Journal of Nutrition* **133**(5): 1485S.
- Blalock, T., Dunn, M. y Cousins, R. 1988. "Metallothionein gene expression in rats: tissue-specific regulation by dietary copper and zinc." *Journal of Nutrition* **118**(2): 222.
- Brown, K. H., Peerson, J. M. y Allen, L. H. 1998. "Effect of zinc supplementation on children's growth: a meta-analysis of intervention trials." *Bibliotheca nutritio et dieta* **54**, 76-83.
- Byrd, L., Conrad, J. y Nash, T. 1994. "Giardia lamblia infections in adult mice." *Infection and immunity* **62**(8): 3583.
- Demirci, M., Delibas, N., Altuntas, I., Oktem, F. y Yonden, Z. 2003. "Serum iron, zinc and copper levels and lipid peroxidation in children with chronic giardiasis." *Journal of Health Population and Nutrition* **21**(1): 72-75.
- Devergnas, S., Chimienti, F., Naud, N., Pennequin, A., Coquerel, Y., Chantegrel, J., y cols. 2004. "Differential regulation of zinc efflux transporters ZnT-1, ZnT-5 and ZnT-7 gene expression by zinc levels: a real-time RT-PCR study." *Biochemical Pharmacology* **68**(4): 699-709.
- Dufner-Beattie, J., Kuo, Y., Gitschier, J. y Andrews, G. 2004. "The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5." *Journal of Biological Chemistry* **279**(47): 49082.
- Ertan, P., Yereli, K., Kurt, Ö., Balcio lu, I. y Ona , A. 2002. "Serological levels of zinc, copper and iron elements among Giardia lamblia infected children in Turkey." *Pediatrics International* **44**(3): 286-288.
- Faubert, G. 2000. "Immune response to Giardia duodenalis." *Clinical Microbiology Reviews* **13**(1): 35.
- Filteau, S. y Woodward, B. 1982. "The effect of severe protein deficiency on serum zinc concentration of mice fed a requirement level or a very high level of dietary zinc." *Journal of Nutrition* **112**(10): 1974.
- Fiore, M., Moroni, R., Alleva, E. y Aloe, L. 1996. "Schistosoma mansoni: influence of infection on mouse behavior." *Experimental parasitology* **83**(1): 46-54.
- Fraker, P. J., Caruso, R. y Kierszenbaum, F. 1982. "Alteration of the immune and nutritional status of mice by synergy between zinc deficiency and infection with Trypanosoma cruzi." *The Journal of nutrition* **112**(6): 1224.
- Frederickson, C., Suh, S., Silva, D. y Thompson, R. 2000. "Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron." *Journal of Nutrition* **130**(5): 1471S.
- Giugliano, R. y Millward, D. 1984. "Growth and zinc homeostasis in the severely Zn-deficient rat." *British Journal of Nutrition* **52**(03): 545-560.
- Grazioli, B., Matera, G., Laratta, C., Schipani, G., Guarnieri, G., Spiniello, E., y cols. 2006. "Giardia lamblia infection in patients with irritable bowel syndrome and dyspepsia: a prospective study." *World Journal of Gastroenterology* **12**(012): 1941-1944.

- Haase, H. y Beyersmann, D. 1999. "Uptake and intracellular distribution of labile and total Zn (II) in C6 rat glioma cells investigated with fluorescent probes and atomic absorption." *Biometals* **12**(3): 247-254.
- Haase, H. y Rink, L. 2009. "Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells." *Annual review of nutrition* **29**: 133-152.
- Halsted, J., Smith Jr, J. y Irwin, M. 1974. "A conspectus of research on zinc requirements of man." *Journal of Nutrition* **104**(3): 345.
- Hambidge, K. y Krebs, N. 2007. "Zinc deficiency: a special challenge." *Journal of Nutrition* **137**(4): 1101.
- Heth, D., Becker, W. y Hoekstra, W. 1966. "Effect of calcium, phosphorus and zinc on zinc-65 absorption and turnover in rats fed semipurified diets." *The Journal of nutrition* **88**(3): 331.
- Hintze, J. 2008. NCSS. NCSS, LLC. Kaysville, Utah.
- Hoff, J. 2000. *Methods of Blood Collection in the Mouse. Lab Animal. Technique*, Nature Publishing Co. **29**: 47-54.
- Hunt, I., Murphy, N., Martner-Hewes, P., Faraji, B., Swendseid, M., Reynolds, R., y cols. 1987. "Zinc, vitamin B-6, and other nutrients in pregnant women attending prenatal clinics in Mexico." *American Journal of Clinical Nutrition* **46**(4): 563.
- Kaltenbach, J., Kaltenbach, M. y Lyons, W. 1958. "Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells* 1." *Experimental Cell Research* **15**(1): 112-117.
- Kambe, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Sasaki, R. y Nagao, M. 2004. "Overview of mammalian zinc transporters." *Cellular and molecular life sciences* **61**(1): 49-68.
- Karakas, Z., Demirel, N., Tarakcioglu, M. y Mete, N. 2001. "Serum zinc and copper levels in southeastern Turkish children with giardiasis or amebiasis." *Biological trace element research* **84**(1): 11-18.
- Kaya, M., Küçükyumuk, Z. y Erdal, I. 2009. "Phytase activity, phytic acid, zinc, phosphorus and protein contents in different chickpea genotypes in relation to nitrogen and zinc fertilization." *African Journal of Biotechnology* **8**(18): 4508-4513.
- King, J. C., Shames, D. M. y Woodhouse, L. R. 2000. "Zinc homeostasis in humans." *The Journal of nutrition* **130**(5): 1360S.
- King, L., Frentzel, J., Mann, J. y Fraker, P. 2005. "Chronic zinc deficiency in mice disrupted T cell lymphopoiesis and erythropoiesis while B cell lymphopoiesis and myelopoiesis were maintained." *Journal of the American College of Nutrition* **24**(6): 494.
- Lichten, L. y Cousins, R. 2009. "Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation." *Annu. Rev. Nutr*(29): 153-176.
- Liuzzi, J., Blanchard, R. y Cousins, R. 2001. "Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats." *Journal of Nutrition* **131**(1): 46.

- Long, K. Z., Santos, J. I., Rosado, J. L., Lopez-Saucedo, C., Thompson-Bonilla, R., Abonce, M., y cols. 2006. "Impact of vitamin A on selected gastrointestinal pathogen infections and associated diarrheal episodes among children in Mexico City, Mexico." *Journal of Infectious Diseases* **194**(9): 1217.
- Maret, W. 2001. "Zinc biochemistry, physiology, and homeostasis—recent insights and current trends." *Biometals* **14**(3): 187-190.
- McDonald, V. 2003. "Parasites in the gastrointestinal tract." *Parasite immunology* **25**(5): 231-234.
- McMahon, R. y Cousins, R. 1998. "Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(9): 4841.
- Moya-Camarena, S., Sotelo, N. y Valencia, M. 2002. "Effects of asymptomatic *Giardia intestinalis* infection on carbohydrate absorption in well-nourished Mexican children." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **66**(3): 255.
- Muniz-Junqueira, M. I. y Queiróz, E. F. O. 2002. "Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **35**(2): 133-142.
- Núñez, F., López, J., De la Cruz, A. y Finlay, C. 2003. "Factores de riesgo de la infección por *Giardia lamblia* en niños de guarderías infantiles de Ciudad de La Habana, Cuba." *Cad. Saúde Pública* **19**(2): 677-682.
- O'Loughlin, E., Scott, R. y Gall, D. 1991. "Pathophysiology of infectious diarrhea: changes in intestinal structure and function." *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **12**(1): 5.
- Oberleas, D. y Prasad, A. 1969. "Growth as affected by zinc and protein nutrition." *American Journal of Clinical Nutrition* **22**(10): 1304.
- Okuyay, P., Ertug, S., Gultekin, B., Onen, O. y Beser, E. 2004. "Intestinal parasites prevalence and related factors in school children, a western city sample-Turkey." *BMC Public Health* **4**(1): 64.
- Olivares, J. L., Fernández, R., Fleta, J., Rodríguez, G. y Clavel, A. 2000. "Serum mineral levels in children with intestinal parasitic infection." *Digestive Diseases* **21**(3): 258-261.
- Osweiler, G. D. 1996. *Veterinary toxicology. Toxicology*. E. A. Nieginski y M. Cann. Pennsylvania, USA, Wiley-Blackwell: 491.
- Pennardt, A. 2009. "eMedicine Specialties> Emergency Medicine> Infectious Diseases."
- Prasad, A. 1979. *Zinc in human nutrition*. Boca Raton, Florida, United States, CRC Press, Inc.
- Prasad, A. 1998. "Zinc and immunity." *Molecular and cellular biochemistry* **188**(1): 63-69.
- Prasad, A., Oberleas, D., Wolf, P., Horwitz, J., Collins, R. y Vazquez, J. 1967. "Studies on zinc deficiency: changes in trace elements and enzyme

- activities in tissues of zinc-deficient rats." *Journal of Clinical Investigation* **46**(4): 549.
- Prasad, A. S., Schulert, A. R., Miale, A., Farid, Z. y Sandstead, H. H. 1963. "Zinc and iron deficiencies in male subjects with dwarfism and hypogonadism but without ancylostomiasis, schistosomiasis or severe anemia." *The American Journal of Clinical Nutrition* **12**(6): 437.
- Quihui-Cota, L., Méndez Estrada, R. O., Astiazarán-García, H., Morales-Figueroa, G. G., Moreno-Reyes, M. J., Cuadras-Romo, D., y cols. 2011. "Changes in Serum Zinc Levels Associated with Giardiasis and Dietary Zinc Intake in Mice." *Biological trace element research*: 1-7.
- Quihui, L., Morales, G., Mendez, R., Leyva, J., Romero, J. y Valencia, M. 2010. "Could giardiasis be a risk factor for low zinc status in schoolchildren from northwestern Mexico? A cross-sectional study with longitudinal follow-up." *BMC Public Health* **10**(1): 85.
- Ratanapo, S., Mungthin, M., Soontrapa, S., Faithed, C., Siripattanapipong, S., Rangsin, R., y cols. 2008. "Multiple modes of transmission of giardiasis in primary schoolchildren of a rural community, Thailand." *The American journal of tropical medicine and hygiene* **78**(4): 611.
- Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., González de Cossío, T., Hernandez-Prado, B. y Sepúlveda, J. 2001. *Encuesta Nacional de Nutrición, 1999. Estado Nutricio de Niños y Mujeres en México. Cuernavaca, Morelos, México, Instituto Nacional de Salud Pública.*
- Rosado, J., Bourges, H. y Saint-Martín, B. 1995. "Deficiencia de vitaminas y minerales en México. Una revisión crítica del estado de la información: I. Deficiencia de minerales." *Salud Publica Mex* **37**(2): 130-139.
- Salgueiro, M. J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Caro, R., Weill, R. y Boccio, J. 2002. "Fortification strategies to combat zinc and iron deficiency." *Nutrition reviews* **60**(2): 52-58.
- Sánchez-Vega, J. T., Tay-Zavala, J., Robert-Guerrero, L., Romero-Cabello, R., Ruíz-Sánchez, D. y Rivas-García, C. 2000. "Frecuencia de parasitosis intestinales en asentamientos humanos irregulares." *Revista da Facultad de Medicina de UNAM* **43**: 80-83.
- Scott, K., Logan, M., Klammer, G., Teoh, D. y Buret, A. 2000. "Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris*-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6." *Infection and immunity* **68**(6): 3412.
- Semba, R. y Bloem, M. 2008. *Nutrition and health in developing countries*, Springer Verlag.
- Shi, H. N., Scott, M. E., Stevenson, M. M. y Koski, K. G. 1998. "Energy restriction and zinc deficiency impair the functions of murine T cells and antigen-presenting cells during gastrointestinal nematode infection." *The Journal of nutrition* **128**(1): 20-27.
- Simjee, S. 2007. *Foodborne diseases*, Humana Pr Inc.

- Smith, J. y Halsted, J. 1970. "Clay ingestion (geophagia) as a source of zinc for rats." *Journal of Nutrition* **100**(8): 973.
- Songur, A., Kus, I., Sahin, S., Sarsilmaz, M. y Yaman, M. 2005. "The changes of Zinc, Copper, and Iron levels in lung tissue after formaldehyde inhalation during the early postnatal period of Rats." *European Journal of General Medicine* **2**(2).
- Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, C. o. A. N., Board on Agriculture, National Research Council. 1995. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*. Washington, D.C., National Academy Press.
- Trumbo, P., Yates, A., Schlicker, S. y Poos, M. 2001. "Dietary Reference Intakes Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc." *Journal of the American Dietetic Association* **101**(3): 294-301.
- Truong-Tran, A. Q., Carter, J., Ruffin, R. E. y Zalewski, P. D. 2001. "The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death." *Biometals* **14**(3): 315-330.
- Valko, M., Morris, H. y Cronin, M. 2005. "Metals, toxicity and oxidative stress." *Current Medicinal Chemistry* **12**(10): 1161-1208.
- Velázquez, C., Beltran, M., Ontiveros, N., Rascon, L., Figueroa, D., Granados, A., y cols. 2005. "Giardia lamblia infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice." *Parasite Immunology* **27**(9): 351.
- Von Allmen, N., Bienz, M., Hemphill, A. y Muller, N. 2004. "Experimental infections of neonatal mice with cysts of Giardia lamblia clone GS." *Infection and immunity* **72**(8): 4763-4771.