
Disminución de las concentraciones plasmáticas de Cinc y alteraciones numéricas de subpoblaciones de linfocitos en pacientes con síndrome de Down.

Marisol Soto-Quintana¹, Francisco Álvarez-Nava¹, Alicia Rojas-Atencio¹, Victor Granadillo², Denny Fernández², Ana Ocampo², Ealys López³ y Waleska Fulcado⁴.

¹Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, ²Laboratorio de Instrumentación Analítica, Facultad de Ciencias, ³Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, ⁴Hospital Clínico de Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Cinc, síndrome de Down, subpoblaciones linfocitarias.

Resumen. Se ha reportado alteración de los niveles plasmáticos de cinc y trastornos del sistema inmunitario en los pacientes con síndrome de Down (SD), lo que se ha asociado con alta tasa de enfermedades infecciosas, las cuales representan una de las principales causas de mortalidad en los individuos afectados. El objetivo de este trabajo fue determinar las concentraciones plasmáticas de cinc y evaluar el sistema inmunitario en pacientes con SD. Para esto se tomaron muestras de sangre periférica de 43 pacientes con SD con promedio de edad \pm DE, de $2,3 \pm 2$ años; que asistieron a la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia en Maracaibo, Venezuela. Como controles se estudiaron 40 niños aparentemente sanos con promedio de edad de $2,5 \pm 2,2$ años. A todos los pacientes se les realizó el cariotipo según la técnica convencional, determinación de cinc por espectrofotometría de absorción atómica y citometría de flujo para evaluar el sistema inmunitario. Todos los pacientes presentaban trisomía libre del cromosoma 21. Se observó una disminución significativa de los niveles de cinc; del porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD4), de la relación entre éstos y los linfocitos T citotóxicos (CD4/CD8) así como también, del porcentaje de células B (CD19) al compararlos con los controles. También se observó un aumento en CD8. Al comparar las subpoblaciones linfocitarias en los pacientes con SD que presentaron valores normales de cinc con aquellos que tenían valores disminuidos no se encontró diferencia estadísticamente significativa. Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que probablemente no sólo la deficiencia de cinc está involucrada en las alteraciones del sistema inmunitario observada en los pacientes con SD; otros factores previamente descritos, tales como las alteraciones tóxicas y las anormalidades moleculares debidas a la sobreexpresión de genes

localizados en el cromosoma 21, podrían estar involucrados. Aunque se recomienda la suplementación de cinc en estos pacientes con deficiencia de este oligoelemento, se necesitan estudios con diseño a doble ciego de placebo versus cinc para evaluar los potenciales efectos beneficiosos del tratamiento con cinc en pacientes con SD.

Disminished Zinc plasma concentrations and alterations in the number of lymphocyte subpopulations in Down's syndrome patients.

Invest Clín 2003; 44(1): 51-60

Key words: Zinc, Down syndrome, lymphocyte subpopulations.

Abstract. Alterations of plasma levels of zinc and in the immune system in Down's syndrome (DS) have been reported. These alterations have been associated with a high rate of infectious diseases, which represent the main cause of mortality in affected individuals. The objectives of this study were to determine plasma zinc levels and to evaluate the immune system in DS patients. Peripheral blood samples were obtained from 43 DS patients examined at the Unidad de Genética Médica, Universidad del Zulia in Maracaibo, Venezuela. Their mean age (\pm SD) was 2.3 ± 2.0 years. As control group, 40 healthy children were studied (mean \pm SD 2.3 ± 2.0 years). Karyotypes by a standard technique, the determination of plasma levels of zinc by atomic absorption spectrophotometry and the evaluation of the immune system by flow cytometry were carried out in the study groups. All DS patients had free trisomy 21. Significantly diminished zinc plasma levels, helper T lymphocyte (CD4) percentage, helper/cytotoxic (CD4/CD8) ratio and B- cells (CD19) were found in DS patients by matching with control group. An increase in CD8 was also found. No significant difference in the lymphocyte subpopulations between DS patients with diminished plasma levels of zinc and DS patients with normal zinc were found. These findings suggest that zinc deficiency is not the sole etiology involved in the disorders of immune system seen in DS patients. Other factors, such as thymic alterations and molecular abnormalities due to gene overexpression of loci located on chromosome 21 could be involved. Although, zinc supplementation is recommended in these patients with zinc deficiency, further studies with a double-blind, placebo versus zinc design are needed to evaluate the potentially beneficial effects of zinc treatment in DS patients.

Recibido: 22-04-2002. Aceptado: 18-09-2002.

INTRODUCCIÓN

El cinc es un elemento traza esencial para el humano que está presente en todos los tejidos del organismo; su concentración es relativamente constante y su ausencia o deficiencia producen anormalidades estructurales y fisiológicas que son prevenidas o revertidas por la adición del elemento (1, 2). Desde hace más de tres décadas se conoce que este elemento, está involucrado en varios procesos celulares esenciales tales como: síntesis o degradación de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (ADN y ARN); es componente de más de 20 metalo-enzimas y es cofactor de múltiples reacciones enzimáticas que regulan el crecimiento celular y los niveles hormonales. Igualmente, se considera un elemento importante en los procesos de respuesta inmunitaria, tanto celular como humoral ya que actúa como mitógeno en la transformación de células T y B (3-7). Se ha sugerido que el cinc se requiere para la activación de la timulina, una hormona circulante que estimula la diferenciación y desarrollo de las funciones de los linfocitos T (8-10).

El síndrome de Down (SD) es la principal causa genética de retardo mental, con una tasa de ocurrencia estimada en 1 por cada 700 nacidos vivos (11). Su alta frecuencia y su gran importancia clínica hace que ésta sea la anomalía cromosómica más estudiada en humanos (12). Este trastorno es causado por la presencia total o parcial de un cromosoma 21 extra. Clínicamente se caracteriza por la presencia de rasgos dismórficos que están acompañados de numerosas anomalías sistémicas que incluyen problemas cardíacos y neurológicos. Sin embargo, a pesar de los avances en el manejo clínico de este trastorno, las enfermedades infecciosas representan la principal causa de muerte en estos pacientes durante los primeros años de vida. Los índices de morbi-mortalidad en

el SD subrayan la gran susceptibilidad a las infecciones y enfermedades autoinmunes lo que sugiere que los pacientes con SD tienen, con frecuencia, problemas de inmunodeficiencia (13-15).

Se ha reportado en pacientes con SD, alteración en los niveles de cinc así como trastornos del sistema inmunitario que abarcan la inmunidad celular, humoral y función fagocítica y aunque no se ha dilucidado completamente el origen de dichas alteraciones, éstas se han asociado con la alta tasa de enfermedades infecciosas, presentes en esta condición (16-20). Además en pacientes con SD, se ha asociado la reducción de las concentraciones séricas de cinc con niveles bajos de timulina (8-10). Por lo tanto, es lógico suponer que exista una asociación entre la alteración de los niveles plasmáticos de cinc frecuentemente visto en pacientes con SD y los trastornos inmunitarios descritos en esta condición. Sin embargo, existen datos contradictorios reportados en la literatura que abarcan, entre otros, niveles anormales de inmunoglobulinas, involución tímica, disminución del número circulante de células B y T, alteraciones de las subpoblaciones linfocitarias, anormalidades en la función fagocítica, disminución de los niveles de los factores tímicos y disminución de la producción de Interleucinas (21).

Desafortunadamente, la mayoría de los estudios del sistema inmunitario en pacientes con SD se han realizado en adultos o niños mayores. Por lo tanto, existe la posibilidad que la maduración del sistema inmunitario y/o mecanismos compensatorios enmascaren las anormalidades inmunitarias primarias en este síndrome (22).

En vista de la existencia de hallazgos controversiales con respecto al tema y de la gran importancia clínica que estos problemas tienen en la morbi-mortalidad en el SD el objetivo de este trabajo fue determinar los

niveles plasmáticos de cinc y evaluar el sistema inmunitario en pacientes con SD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de sangre periférica de 43 pacientes con SD (21 hembras y 22 varones), con promedio de edad \pm DE, de $2,3 \pm 2$ años y un rango de edad comprendida entre 1 mes y 6 años; quienes asistieron a la consulta de asesoramiento genético en la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia en Maracaibo, Venezuela. El grupo control estuvo constituido por 40 niños aparentemente sanos (20 hembras y 20 varones) con promedio de edad \pm DE, de $2,5 \pm 2,2$ años y rango de edad comprendida entre 4 meses y 6 años.

Tanto el grupo de estudio como los controles fueron evaluados nutricionalmente (parámetros antropométricos, clínicos, bioquímicos y dietéticos) obteniéndose un diagnóstico nutricional integral. En el parámetro dietético se utilizó el método del recordatorio de un día tipo de la alimentación y la frecuencia de consumo de alimentos para una semana (23). Esto se realizó con la finalidad de determinar si estos niños tenían déficit de ingesta de cinc en la dieta y/o problemas relacionados con la absorción del elemento.

A todas las muestras de los pacientes con SD se les determinaron cariotipo y cinc y se sometieron a citometría de flujo para evaluar las subpoblaciones linfocitarias. A las muestras controles sólo se le realizaron estas dos últimas determinaciones (cinc y citometría de flujo) debido a que ningún niño presentó rasgos dismórficos, displasias esqueléticas, baja talla, bajo peso y/o microcefalia que pudieran sugerir anomalías cromosómicas. Ningún niño presentó infección o enfermedad aguda al momento de la toma de la muestra.

Para determinar el cariotipo, las muestras se cultivaron según la técnica citogené-

tica convencional y los cromosomas obtenidos fueron coloreados con bandas G (24).

Las concentraciones de cinc se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (25). Las muestras de sangre se tomaron luego de 12 horas de ayuno, entre 8 y 9 a.m., para evitar posibles variaciones circadianas (2, 26, 27) utilizando heparina como anticoagulante. Las mismas se colocaron en tubos de polipropileno a los cuales previamente se les había realizado el siguiente tratamiento: los tubos se colocaron durante 24 horas en una solución de ácido nítrico 0,01M; posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada y se pasaron por una solución jabonosa no fosfatada (sodasil) por 24 horas; seguidamente se enjuagaron tres veces con agua destilada y luego tres veces con agua desionizada. Los tubos se colocaron en estufa a 30-50°C para su secado (25). Esto se realizó con la finalidad de eliminar la posible contaminación ambiental con el metal. Las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 3000 rpm y el plasma obtenido fue almacenado a 70°C hasta el momento del análisis.

Los niveles bajos de cinc se definieron en nuestro laboratorio en función de los valores referenciales normales de las concentraciones plasmáticas de cinc obtenidas a partir del grupo control.

Para evaluar el sistema inmunitario y caracterizar el fenotipo celular a través de la citometría de flujo se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales: Leu 4, Leu 3a, Leu 2a, Leu 12, y Leu 11b que reconocen antígenos específicos en la superficie de la célula (CD3, CD4, CD8, CD16 y CD19) determinando así el porcentaje de las moléculas asociadas al receptor de células T (CD3), células T cooperadoras o ayudadoras (CD4), células T citotóxicas o supresoras (CD8), relación CD4/CD8, células NK (CD16) y células B (CD19). Además, se determinó el porcentaje de linfocitos totales (28).

Los resultados fueron reportados como promedio \pm desviación estándar y se utilizó la prueba *t* de Student para el análisis estadístico. Se realizó análisis de ANOVA para comparar el grupo control, el grupo de pacientes con SD con concentraciones plasmáticas disminuidas de cinc y el grupo de pacientes con SD con concentraciones plasmáticas normales de cinc. Esto para saber si existía diferencia entre los hallazgos encontrados en la evaluación inmunitaria entre estos grupos.

RESULTADOS

Todos los pacientes estudiados presentaron trisomía libre del cromosoma 21. La Tabla I muestra los resultados de las concentraciones plasmáticas de cinc y de las subpoblaciones linfocitarias en niños con SD y controles. Se puede observar una disminución de los niveles de este elemento en los niños trisómicos en comparación con los controles siendo la diferencia altamente significativa ($p < 0,0001$).

Del total de niños con SD analizados en este estudio el 58,6% presentó concentraciones de cinc por debajo de los valores referenciales considerados como normales (867,7-1201,5 $\mu\text{g/L}$).

Con respecto al fenotipo de los linfocitos, se apreció, en los pacientes con SD, una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD4), de la relación entre éstos y los linfocitos T citotóxicos (CD4/CD8) así como también, en el porcentaje de células B (CD19) al compararlos con los controles. A pesar de estas disminuciones específicas de linfocitos se pudo detectar un incremento significativo de los linfocitos T citotóxicos/supresores (CD8) en los niños con SD con relación a los controles. No se observaron en las poblaciones estudiadas diferencias significativas entre los resultados obtenidos para los linfocitos totales, CD3 y células NK (CD16).

Al comparar las subpoblaciones linfocitarias en los pacientes con SD que presentaron valores normales de cinc con aquellos que tenían valores disminuidos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla II). El análisis de ANOVA, el cual compara los tres grupos (control, pacientes con SD con concentraciones disminuidas de cinc y pacientes con SD con concentraciones normales de cinc), no arrojó diferencias estadísticamente significativas.

TABLA I
CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE CINCO Y ANÁLISIS DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN NIÑOS CON SÍNDROME DE DOWN Y CONTROLES

| Determinaciones Realizadas | Síndrome de Down | Controles | p |
|--|-------------------|--------------------|----------|
| Concentración plasmática de cinc ($\mu\text{g/L}$) | 809,0 \pm 228,9 | 1034,6 \pm 166,9 | < 0,0001 |
| Linfocitos Totales* | 45,2 \pm 10,4 | 47,5 \pm 12,2 | NS |
| CD3 | 57,1 \pm 19,1 | 63,6 \pm 14,6 | NS |
| CD4 | 31,1 \pm 9,6 | 39,2 \pm 5,7 | < 0,01 |
| CD8 | 37,5 \pm 16,8 | 26,6 \pm 4,2 | < 0,05 |
| CD4/CD8 | 1,02 \pm 0,6 | 1,49 \pm 0,23 | < 0,05 |
| CD16 | 14,9 \pm 13,6 | 11,0 \pm 2,5 | NS |
| CD19 | 13,8 \pm 9,5 | 20,4 \pm 5,4 | < 0,05 |

*Los valores de las subpoblaciones linfocitarias están expresados en porcentajes y representan los promedios \pm las desviaciones estándar.

TABLA II
ANÁLISIS DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN NIÑOS CON SÍNDROME DE DOWN CON CONCENTRACIONES DE CINC NORMALES Y BAJAS

| Citometría de Flujo | Cinc Normal | Cinc Bajo | p |
|---------------------|-------------|-------------|----|
| Linfocitos Totales* | 46,8 ± 11,5 | 44,1 ± 9,9 | NS |
| CD3 | 60,8 ± 18,3 | 54,5 ± 19,8 | NS |
| CD4 | 31,5 ± 9,1 | 30,9 ± 10,2 | NS |
| CD8 | 40,5 ± 13,7 | 35,3 ± 18,7 | NS |
| CD4/CD8 | 0,87 ± 0,3 | 1,1 ± 0,8 | NS |
| CD16 | 10,1 ± 4,7 | 18,3 ± 16,7 | NS |
| CD19 | 13,1 ± 11,9 | 14,4 ± 7,7 | NS |

*Los valores de las subpoblaciones linfocitarias están expresados en porcentajes y representan los promedios las desviaciones estándar.

DISCUSIÓN

Desde hace mucho tiempo se conoce que el cinc es un metal esencial para el ser humano; su gran importancia ha hecho que este elemento sea objeto de múltiples investigaciones tanto en individuos saludables como en enfermos (3, 11, 29, 30).

En individuos aparentemente sanos se ha reportado que los niveles de cinc son relativamente constantes (11, 30, 31), aunque algunos investigadores han observado que este elemento tiende a incrementarse con la edad (29, 32-34). Burguera y col. (32) encontraron, en niños venezolanos sanos con edades comprendidas entre 0 y 72 meses, que las concentraciones séricas de cinc estaban en el rango de 800-1200 $\mu\text{g/L}$, lo cual es similar a los valores obtenidos en nuestra población control (867,7-1201,5 $\mu\text{g/L}$) cuyas edades estaban comprendidas entre 4 y 72 meses. Se han conseguido valores disminuidos del elemento en diversas condiciones patológicas tales como: infecciones, cáncer, trastornos hepáticos y SD (35).

La disminución de las concentraciones plasmáticas de cinc encontradas en este estudio se corresponde evidentemente con las reportadas por otros investigadores (8, 11, 17, 21, 36); sin embargo, difiere del estudio realizado por Noble y Warren quienes no consiguieron esta disminución (22).

Se ha reportado que las deficiencias de cinc podrían deberse a diversas causas; entre éstas se pueden mencionar: elevadas concentraciones de fitatos en la dieta, disminución de la ingesta de proteínas, geofagia o coprofagia, parasitosis intestinales, y síndromes de mala absorción (1, 6, 19, 37). En esta investigación los valores de cinc disminuidos en sujetos con SD no pueden ser atribuidos a estos factores ya que a todos los pacientes se les realizó una evaluación previa que abarcó aspectos clínicos, bioquímicos, antropométricos y dietéticos, descartándose una disminución de cinc debida a una mala absorción o baja ingesta de este elemento. Sin embargo, se han reportado otras causas que pueden llevar a deficiencias del elemento, las cuales incluyen: requerimiento incrementado, biodisponibilidad disminuida y fallas en la utilización. Se ha sugerido que la deficiencia de cinc en pacientes con SD pudiera estar relacionada con la activación de sistemas enzimáticos dependientes de este elemento, los cuales están involucrados en la respuesta inmunitaria (17) o con el transporte de este elemento (35). Esto último es debido a que una parte del cinc es transportado por una α_2 macroglobulina y se ha descrito que los niños con SD tienen niveles anormales de α_1 y α_2 globulinas (38). Aunque las razones

que explican la disminución de las concentraciones de cinc en sujetos con SD aun permanecen desconocidas (8), es necesario tener presentes estos hallazgos.

Con la finalidad de tratar de caracterizar el estado del sistema inmunitario en pacientes con SD se han realizado varias investigaciones; sin embargo, la confusión persiste ya que no está claro si las deficiencias inmunológicas observadas representan un defecto primario relacionado con la anomalía cariotípica o si son secundarias a otras causas (edad y ambiente) (21). Algunos trabajos han demostrado que el número total de linfocitos T circulantes es normal o está levemente disminuido en los pacientes con SD, pero la distribución de las subpoblaciones de células T muestra diferencias al compararla con los respectivos controles (20). La evaluación del sistema inmunitario en pacientes con SD en esta investigación, indica que los porcentajes de linfocitos totales, de las moléculas asociadas al receptor de células T (CD3) y las células NK (CD16) se encuentran dentro de límites normales y no se aprecian diferencias estadísticamente significativas al comparar los dos grupos estudiados, lo cual está de acuerdo con lo reportado por Cossarriza y col. (28).

Con respecto al sistema de linfocitos T, la disminución del porcentaje de linfocitos T ayudadores (CD4) y el incremento en el porcentaje de linfocitos T citotóxicos/supresores (CD8) observado, trajo como consecuencia una alteración de la relación CD4/CD8. En el análisis estadístico de estos parámetros se encontraron diferencias significativas al comparar los pacientes con SD con sus respectivos controles. Estos hallazgos han sido descritos previamente por varios grupos de investigadores (21, 22, 28, 39, 40) y en nuestro conocimiento, hasta ahora, sólo Gupta y col. no han encontrado tales alteraciones (41).

En cuanto al sistema de linfocitos B (CD19), la mayoría de los estudios ha de-

tectado que el número de células B circulantes en la sangre periférica de los pacientes con SD se halla dentro de límites normales (42). Sin embargo, en este estudio éstas se encontraron disminuidas, lo cual coincide con el trabajo realizado por Cossarriza y col. (28).

Se ha reportado que algunas de las anomalías del sistema de linfocitos T pueden afectar incluso a la regulación de las células B y que las respuestas de ambos tipos de células, las B y las T, están reguladas por subpoblaciones de células T, constituidas principalmente por las células T auxiliares y las células T supresoras (14). Las diferencias observadas entre los porcentajes de células y los parámetros evaluados entre éste y otros trabajos podrían deberse a toma de muestra inapropiada, diferencias metodológicas, edades de los pacientes, número de casos analizados, variaciones inter e intra individuos y tratamiento estadístico de los resultados.

En este trabajo la disminución del porcentaje de linfocitos B (CD19), de linfocitos T ayudadores (CD4), así como el aumento del porcentaje de linfocitos T citotóxicos (CD8) pueden ser explicados a través de la hipótesis de Murphy y col. (43) la cual sostiene que la sobreexpresión de productos proteicos codificados por genes sobre el cromosoma 21 produce una liberación ineficiente de células T maduras desde el timo hasta el bazo en pacientes con SD. Esto puede originar un aumento en la susceptibilidad a las infecciones virales y bacterianas encontradas en estos pacientes sobre todo en los primeros años de vida. Según estos autores, las alteraciones tímicas tanto histológicas como funcionales descritas en timos de fetos o neonatos con SD podrían originar una disminución marcada de CD4 los cuales son necesarios para la maduración óptima de los linfocitos B en el bazo. El aumento del porcentaje de CD8 visto en nuestro trabajo puede ser debido a un me-

canismo compensatorio inespecífico del sistema inmunitario celular, y aunque se espera que este aumento de CD8 proteja al individuo con SD de infecciones virales o bacterianas, esto no se observa en la práctica clínica debido a que es necesaria la cooperación de las células T CD4, para que los linfocitos T CD8 ejerzan su acción. Por tal motivo, los defectos en el timo, ya sean alteraciones histopatológicas o alteraciones en los factores tímicos solubles (p. ej., timulina) originan una disminución de CD4 que acarreará una disminución de CD19 (linfocitos B) con un aumento compensatorio pero ineficiente de CD8.

Es necesario resaltar que al comparar las subpoblaciones linfocitarias de los pacientes con SD que tenían valores de cinc normales con aquellos que tenían valores de cinc bajos, no se encontraron diferencias significativas lo cual corrobora los hallazgos previamente reportados por Stabile y col. (21). Aunque este estudio sugiere que aparentemente el cinc no es el único factor que está involucrado en las alteraciones inmunitarias observadas en los pacientes con SD, otros estudios han demostrado fehacientemente que, la deficiencia de cinc deprime el sistema inmunitario y que la administración de este elemento corrige las anormalidades y disminuye la susceptibilidad a infecciones presentada en estos pacientes (8, 18, 44).

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que probablemente no sólo la deficiencia de cinc está involucrada en las alteraciones del sistema inmunitario observada en los pacientes con SD; otros factores previamente descritos, tales como las alteraciones tímicas y las anormalidades moleculares (20) debidas a la sobreexpresión de genes (receptor del interferón y el CD18) localizados en el cromosoma 21, podrían estar involucradas y contribuir conjuntamente con la deficiencia de cinc a las alteraciones de la inmunidad mediada por

células observada en estos pacientes. Es recomendable, debido a la deficiencia de cinc observada en estos pacientes, suplementarlo según las dosis requeridas para cada caso y de esta manera corregir los defectos que la deficiencia de este oligoelemento pudiera estar condicionando en los pacientes con SD, y así, mejorar los índices de morbi-mortalidad en esta entidad clínica.

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia por el financiamiento de esta investigación, a la profesora Luz Marina Soto por su ayuda en el análisis estadístico de los datos, al personal médico de la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia por el envío de los pacientes, al personal técnico del laboratorio de citogenética de este centro por la colaboración prestada para la obtención de las muestras de los pacientes. Así mismo, agradecemos muy especialmente al Dr. Héctor Pons por su invaluable ayuda en la preparación de este manuscrito.

REFERENCIAS

1. **Estevez J, Chacin I, Bonilla E, Villalobos R.** Concentraciones de cobre y cinc en una población suburbana del estado Zulia (Venezuela). *Invest Clin* 1988; 29: 97-109.
2. **Reinhold J.** Trace Elements- A selective survey. *Clin Chem* 1975; 21: 476-500.
3. **Meyer H, Rune E, Riise T, Fosse G, Ramsten G.** Zinc in primary teeth from children in Norway. *The Science of the Total Environment* 1999; 226: 201-212.
4. **Vallee B.** Zinc: biochemistry, physiology, toxicology and clinical pathology. *Biofactors* 1988; 1: 31-36.
5. **Zanzonico P, Fernandes G, Good R.** The differential sensitivity of T-cell and B-cell mitogenesis to in vitro zinc deficiency. *Immunol* 1981; 60: 203-211.

6. **Lockitch G, Puterman M, Godolphin W, Sheps S, Tingle A, Quigley G.** Infection and immunity in Down syndrome: a trial of long-term low oral doses of zinc. *J Pediatr* 1989; 114: 781-787.
7. **Arcasoy A, Yildirmak T, Yildirmak Y, Tunc S, Sinav B, Kutluay I.** A test in the diagnosis of marginal zinc deficiency in the geriatric people: serum zinc binding capacity. *Trace Elem Electrolytes* 2001; 18 (3): 139-141.
8. **Licastro F, Mocchegiani E, Masi M, Fabris N.** Modulation of the neuroendocrine system and immune functions by zinc supplementation in children with Down's syndrome. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1993; 7: 237-239.
9. **Bach J, Dardenne M.** Clinical aspects of thymulin (FTS) In: Goldstein AL, Ed, *Thymic hormones and lymphokines*. New York: Plenum Press; 1984. p 593-600.
10. **Dardenne M, Pleauj, Nabarra B.** Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 5370-5373.
11. **Cengiz M, Seven M, Cengiz S, Yuskel A, Iscan M.** Vitamin and mineral status in Down syndrome. *Trace Elem Electrolytes* 2000; 17(3): 156-160.
12. **Soto M, Pineda L, Rojas A, Álvarez F, Cañizales J, Prieto M.** Síndrome de Down: origen parental, asociaciones de satélites y regiones organizadoras nucleolares. *Ciencia* 1997; 5(2): 121-129.
13. **Taylor G, Williams A, D'souza S, Ferguson W, Donnai D, Fennell J., Harris R.** The expression of CD18 is increased on trisomy 21 (Down syndrome) lymphoid cell. *Clin Exp Immunol* 1988; 71: 324-328.
14. **Rogers P, Coleman M.** Medical care in Down syndrome. A preventive medicine approach. 1st Ed. New York: Marcel Dekker, Inc; 1994. p 253-264.
15. **Oster J, Mikkelsen M, Nielsen A.** Mortality and life table in Down's syndrome. *Acta Paediatr Scand* 1975; 64: 322-326.
16. **Milunsky A, Hackley B, Halsted J.** Plasma, erythrocyte and leucocyte zinc levels in Down's syndrome. *J Ment Defic Res* 1970; 14: 99-105.
17. **Rascon M, Lorente F, Salazar A, Villalobos V.** Evaluation of plasma zinc levels in patients with Down syndrome. *Ann Esp Pediatr* 1992; 37 (5): 391-393.
18. **Bjorksten B, Back O, Gustavson K, Hallmans G, Hagglof B, Tarnvick A.** Zinc and immune function in Down's syndrome. *Acta Paediatr Scand* 1980; 69: 183-187.
19. **Kanavin O, Scott H, Fausa O, Johan E, Gaarder P, Brandtzaeg P.** Immunological studies of patients with Down's syndrome. *Acta Med Scand* 1988; 224: 473-477.
20. **Ugazio A, Maccario R, Notarangelo I, Burgio R.** Immunology of Down syndrome: a review. *Am J Med Genet* 1990; 7: 204-212.
21. **Stabile A, Pesaresi M, Stabile M, Pastore M, Sopo M, Ricci R, Celestini E, Segni G.** Immunodeficiency and plasma zinc levels in children with Down's syndrome: a long-term follow-up of oral zinc supplementation. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 58: 207-216.
22. **Noble R, Warren P.** Analysis of blood cell populations, plasma zinc and natural killer cell activity in young children with Down's syndrome. *J Ment Defic Res* 1988; 32: 193-201.
23. **DeHoog S.** Evaluación inicial del estado nutricional. En: Mahan K, Escott-Stump S. Eds. *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. 8^{va} Ed. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 1996. p 371-395.
24. **Moorhead P, Nowell P, Mellman W, Battips D, Hungerford D.** Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960; 20: 613-616.
25. **Tahán J, Granadillo V, Romero R.** Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of AL, Cu, Fe, V, and Zn in clinical samples and in certified environmental reference materials. *Anal Chim Acta* 1994; 295: 187-197.
26. **Hetland O, Brubakk E.** Diurnal variation in serum zinc concentration. *Scand J Clin Lab Invest* 1973; 32:225-226.
27. **Lifschitz MD, Henkin RI.** Circadian variation in copper and zinc in man. *J Appl Physiol* 1971;31: 88-92.

28. **Cossarizza A, Monti D, Montagnani G, Ortolani C, Masi M, Zannotti M, Franceschi C.** Precocious aging of the immune system in Down's syndrome: alteration of B lymphocytes, T-lymphocyte subsets, and cells with natural killer markers. *Am J Med Genet* 1990; 7:213-218.
29. **Soylak M, Saracoglu S, Divrikli U, Elci I.** Copper and zinc concentrations of serum samples of healthy people living in Tokat, Turkey. *Trace Elem Electrolytes* 2001; 18: 47-50.
30. **Ohtake M., Tamura T.** Serum zinc and copper levels in healthy Japanese children. *Tohoku J Exp Med* 1976; 120: 99-103.
31. **Tietz N.** *Fundamentals of Chemistry* Saunders, Philadelphia; 1987.
32. **Burguera J, Burguera M, Alarcon O.** Blood levels of zinc, cobalt, copper, iron, and manganese in children from Merida, Venezuela. *Trace Elem Med* 1992; 9: 194-197.
33. **Henking R, Schulman J, Schulman C, Bronzert D.** Changes in total, nondiffusible, and diffusible plasma zinc and copper during infancy. *J Pediatrics* 1973; 82: 831-837.
34. **Butrimovitz G, Purdy W.** Resolution of age-dependent reference intervals: polynomial regression methodology with applicability to plasma zinc levels in a childhood population. *Clin Biochem* 1979; 12: 33-36.
35. **Halsted J, Smith J.** Plasma-zinc in health and disease. *Lancet* 1970; 14: 322-324.
36. **Franceschi C, Chiricolo M, Licastro F, Zannotti M, Mocchegiani E, Fabris N.** Oral zinc supplementation in Down's syndrome: restoration of thymic endocrine activity and of some immune defects. *J Ment Defic Res* 1988; 32: 169-181.
37. **Walravens P.** Nutritional importance of copper and zinc in neonates and infants. *Clin Chem* 1980; 26 (2): 185-189.
38. **Parisi A, Vallee B.** Zinc metalloenzymes: characteristics and significance in biology and medicine. *Am J Clin Nutr* 1969; 22: 1222-1239.
39. **Burgio G, Ugazio A, Nespoli I, Macario R.** Down syndrome: a model of immunodeficiency. *Birth Defects* 1983; 19: 325-327.
40. **Philip R, Berger A, Memanus N, Warner N, Peacock M, Epstein I.** Abnormalities of the in vitro cellular and humoral responses to tetanus and influenza antigens with concomitant numerical alterations in lymphocytes subsets in Down syndrome (trisomy 21) *J Immunol* 1986; 136: 1661-1667.
41. **Gupta S, Fikring S, Mariano E, Quazi G.** Monoclonal antibody defined T cell subsets and autologous mixed lymphocyte reaction in Down's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1983; 53: 25-30.
42. **Levin S, Nir E, Mogilner B.** T-system immune deficiency in Down's syndrome. *Pediatrics* 1975; 56:123.
43. **Murphy M, Insoft R, Pike-Nobile L, Epstein L.** A hypothesis to explain the immune defects in Down syndrome. *Etiology and Pathogenesis of Down Syndrome.* Wiley-Liss, Inc; 1995, p 147-167.
44. **Beisel W.** Single nutrients and immunity. *Am J Clin Nutr* 1982; 35: 417-468.