



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

DETECCIÓN INTRACELULAR DE INTERLEUCINA 2,  
INTERLEUCINA 4 E INTERFERÓN GAMMA POR CITOMETRÍA  
DE FLUJO EN JÓVENES MEXICANOS SANOS

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**TERESA GARCÍA TÉLLEZ**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ

ASESOR DE TESIS: DR. RUBÉN MARROQUIN SEGURA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ***Dedicatoria***

*A la memoria de mi madre Gabina Téllez Ríos.*

*A mi abuelita Rosita por estar a mi lado desde la infancia, cuando más la necesitaba, dándome sus cuidados, su presencia maternal y que ahora con sus amorosas bendiciones acompaña mi vida día tras día.*

*A mi padre Claudio García Blanco con profundo agradecimiento, respeto y cariño por su admirable ejemplo de fortaleza y congruencia que ha guiado mis pasos y forjó en mí el amor al conocimiento, a la verdad, a los valores humanos y el anhelo de tener una profesión.*

## *Agradecimientos*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por la valiosa oportunidad brindada al ser aceptada como alumna desde el bachillerato, a la Universidad Autónoma Metropolitana donde se llevó a cabo mi tesis y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.*

*A mis asesores Dr. Rubén Marroquin Segura y Dra. Alda Rocío Ortiz Muñoz, titular del Departamento de Biología Celular y Citometría de Flujo de la UAM Iztapalapa por darme a desarrollar este interesante proyecto de tesis y facilitarme todos los recursos necesarios, en especial a la Mtra. Edith Cortés Barberena, investigadora de dicho departamento, quien con paciencia y dedicación me instruyó y orientó en la tecnología de la citometría de flujo.*

*A mis sinodales: Q.F.B. Ma. de las Mercedes Zamudio Durán, Q.F.B. Ma. de Lourdes Vega Navarrete por la revisión del trabajo escrito, particularmente a la Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera por la orientación clara y precisa en la elaboración del mismo.*

*A mis hermanos Lulú, Claudio, Alejandro, Rosy y Arturo por su invaluable apoyo, muy en especial a Francisco y a Lupita con quien comparto el gusto por las ciencias de la salud.*

*A todas mis amigas y amigos que han enriquecido mi vida con su presencia, su alegría, su ánimo, sus ideas, su ayuda, etc. especialmente a mi gran amigo de toda la carrera Q.F.B. Pablo Basilio Espeites, a Psic. Humberto Rosales Pastor por el reto-apoyo que tanto me ha fortalecido y a M.A.G. Mario Adolfo Montiel Melgoza por generar esa maravillosa luz que iluminó todo.*

# Í N D I C E

RESUMEN .....	01
INTRODUCCIÓN.....	02
1. MARCO TEÓRICO .....	03
1.1 Citometría de flujo.....	03
1.2 Fluorocromos.....	04
1.3 Conceptos sobre inmunofluorescencia .....	06
1.4 Aplicaciones de la citometría de flujo a la investigación básica.....	07
1.5 Aplicaciones clínicas de la citometría de flujo .....	07
1.6 El sistema inmunológico y las citocinas .....	08
1.7 Citocinas .....	11
1.7.1 Citocinas y respuesta inmune. ....	13
1.7.2 Interleucinas (IL) .....	13
1.7.3 Factores de necrosis tumoral (TNF) .....	15
1.7.4 Factores estimuladores de colonias (CSF).....	16
1.7.5 Interferones (INF).....	16
1.7.6 Quimiocinas.....	17
1.8 Relación entre nutrición e inmunidad.....	17
1.9 Modulación de la respuesta inmune por los nutrientes .....	18
1.9.1 Deficiencias de micronutrientes.....	19
1.10 Desnutrición .....	20
1.10.1 Desnutrición primaria .....	21
1.10.1.1 Desnutrición calórico proteica (DCP).....	22
1.10.1.2 Desnutrición proteica.....	22
1.10.2 Desnutrición secundaria.....	23
1.10.3 Infección crónica: HIV .....	24
1.11 Inmunocompetencia en la DCP .....	24
1.11.1 DCP y tejidos linfoides.....	25
1.11.2 Respuesta inmune celular .....	26
1.11.3 Respuesta inmune humoral.....	27
1.11.4 DCP y respuesta inespecífica.....	27
1.11.5 Inflamación en DCP .....	28
1.11.6 Inmunidad en mucosas en la DCP .....	30
1.12 Citocinas y DCP en el niño.....	30
1.13 La desnutrición infantil como un problema de salud.....	34
1.13.1 La desnutrición en el mundo.....	35

1.13.2 La desnutrición en México .....	35
1.13.3 Accesibilidad a la atención a la salud .....	36
1.13.4 El financiamiento.....	37
1.13.5 Calidad de la atención en salud.....	38
1.14 Desnutrición infantil y pobreza en México.....	39
1.14.1 Factores que inciden en la desnutrición .....	40
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	41
3. OBJETIVOS .....	41
4. HIPÓTESIS .....	41
5. POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	42
6. CRITERIOS DE SELECCIÓN .....	42
6.1 Criterios de inclusión.....	42
6.1.1 Índice de masa corporal .....	42
6.2 Criterios de exclusión .....	43
6.3 Criterios de eliminación.....	43
7. MATERIAL Y MÉTODO.....	44
7.1 Preparación de la muestra.....	47
7.2 Preparación de los reactivos .....	47
7.3 Muestra activada y controles .....	48
7.4 Tinción.....	49
7.5 Permeabilización y tinción intracelular .....	50
7.6 Análisis de muestras .....	50
8. CONTROL DE CALIDAD DEL CMF.....	53
8.1 Microesferas de calibración.....	53
8.2 Resumen y explicación del uso de las microesferas de calibración.....	53
8.3 Principios del procedimiento de calibración con las microesferas .....	54
8.4 Presentación de las microesferas de calibración. ....	55
8.5 Preparación de las suspensiones de prueba.....	56
8.6 Instalación del sistema.....	56
8.7 Optimización y control de calidad.....	57
8.8 Resultados de la calibración .....	57
8.9 Limitaciones .....	58
8.10 Resolución de problemas .....	58
9. RESULTADOS .....	59
10. DISCUSIÓN.....	66
11. CONCLUSIONES.....	68
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69

## TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Algunos fluorocromos utilizados en citometría de flujo.....	04
Tabla 2	Características celulares medibles por citometría de flujo.....	04
Tabla 3	Componentes de un citómetro de flujo.....	05
Tabla 4	Múltiples tejidos, células y moléculas intervienen en la respuesta inmune .....	09
Tabla 5	Resumen del descubrimiento y caracterización de las citocinas.....	12
Tabla 6	Tendencias internacionales en la prevalencia de desmedro en menores de 5 años .....	36
Tabla 7	Guía clínica para la identificación, evaluación y tratamiento de sobrepeso y obesidad .....	43
Tabla 8	Reactivos utilizados para la detección intracelular de citocinas por CMF .....	45
Tabla 9	Anticuerpos para la detección intracelular de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$ .....	46
Tabla 10	Preparación de tubos para la detección de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$ .....	52
Tabla 11	Cálculo de la respuesta específica de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$ de acuerdo al porcentaje de eventos positivos .....	65
Tabla 12	Análisis estadístico descriptivo de la detección intracelular de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$ por citometría de flujo en jóvenes mexicanos sanos.....	67
Figura 1	Dispersión de luz de un rayo láser por una célula .....	03
Figura 2	Sistemas de un citómetro de flujo .....	05
Figura 3	La síntesis de citocinas induce efecto autocrino y paracrino.....	10
Figura 4	Diagrama de flujo del procedimiento general para la detección intracelular de citocinas...	44
Figura 5	Estuche de reactivos (kit) BDIS FASTIMMUNE™ Cytokine System.....	46
Figura 6	Citómetro de flujo FACScan® de Becton Dickinson .....	46
Figura 7	Diagrama de flujo de preparación de muestra y control de activación.....	51
Figura 8	Método estandarizado para la detección intracelular de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$ por citometría de flujo.....	61
Figura 9	Gráficas obtenidas por muestra analizada para la detección intracelular de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$ por citometría de flujo en jóvenes mexicanos sanos.....	62
Figura 10	Gráfica de la respuesta específica de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$ relacionada con la edad de los donadores de las muestras analizadas. ....	68

# DETECCIÓN INTRACELULAR DE INTERLEUCINA 2, INTERLEUCINA 4 E INTERFERÓN GAMMA POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN JÓVENES MEXICANOS SANOS

## RESUMEN

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la Universidad Autónoma Metropolitana, *campus* Iztapalapa (UAM-I), es de los pocos lugares en México que cuentan con un citómetro de flujo y es utilizado como herramienta importante para el Proyecto de Investigación titulado “Evaluación de daño al DNA y su relación con la respuesta inmune en organismos infectados y desnutridos”, apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. De esta línea de investigación se derivó la necesidad de estandarizar un procedimiento para la detección intracelular de interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4) e interferón gamma (INF- $\gamma$ ) por citometría de flujo.

El procedimiento incluyó la permeabilización con brefeldina y la incubación de las células con anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluorocromos para determinar el fenotipo de las proteínas en la superficie celular y de manera intracelular de 10,000 células por medio de la fluorescencia emitida.

Con la metodología estandarizada se analizaron las muestras de dieciséis personas, sin enfermedad aparente, con edad comprendida entre los 20 y los 40 años. Se observó que los valores de la respuesta específica para IL-2 varían del 38%-65%, para INF- $\gamma$  entre 32%-54% y para IL-4 son inferiores al 5%.



## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el diagnóstico clínico ha experimentado profundas modificaciones debidas, en gran medida, a los avances producidos por los nuevos métodos cuantitativos de análisis celular. De entre ellos destaca la citometría de flujo, que ha alcanzado gran relevancia, además de la que ya tenía en la investigación básica (1).

La citometría constituye un complemento valioso de las técnicas clásicas utilizadas para el estudio de la morfología, biología y bioquímica celular. Aunque, desde el punto de vista cronológico, la citometría de flujo es una tecnología relativamente reciente, sus características especiales como técnica de análisis celular han hecho en la última década que su uso se haya extendido de forma rápida, desde los laboratorios de investigación básica hasta los laboratorios clínicos (2).

La citometría de flujo ha encontrado amplia utilidad en ciencias como la inmunología, hematología, oncología, anatomía patológica y biología celular (3). La conjugación de marcadores fluorescentes con anticuerpos monoclonales o policlonales ha hecho posible los estudios de la densidad y la distribución de determinantes y receptores de la superficie y del citoplasma celular, permitiendo identificar subpoblaciones celulares (4).

Por otra parte, en comparación con los métodos bioquímicos de análisis celular, en los que se obtiene un resultado promedio para toda la muestra, la citometría de flujo es capaz de proporcionar una información cuantitativa sobre cada célula en particular y permite identificar en una muestra subpoblaciones de células diferentes, incluso cuando están escasamente representadas.

Existe una relación estrecha entre el estado nutricional, el funcionamiento inmunitario y la susceptibilidad a las infecciones. La desnutrición es la causa más frecuente de inmunodeficiencia infantil en el mundo. La evaluación del estado inmunitario incluye la medición de citocinas. En el laboratorio de biología celular y citometría de flujo de la UAM-I se estudia la evaluación de daño al DNA y su relación con la respuesta inmune en organismos infectados y desnutridos, cuando se intentó llevar a cabo la detección intracelular de citocinas no se tuvo éxito por lo cual surgió la necesidad de estandarizar un procedimiento para la detección intracelular de interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4) e interferón gamma (INF- $\gamma$ ) por citometría de flujo para después poderlo aplicar en las diversas líneas de investigación. Por la cercanía de la población universitaria se optó por estudiar muestras sanguíneas de personas sin enfermedad aparente con edad comprendida entre los 20 y los 40 años.

El procedimiento incluyó la permeabilización con brefeldina y la incubación de las células con anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluorocromos para determinar el fenotipo de las proteínas en la superficie celular y de manera intracelular de 10,000 células por medio de la fluorescencia emitida medida con un citómetro de flujo FACScan®.

## 1.0 MARCO TEÓRICO

### 1.1 Citometría de flujo

La citometría de flujo (CMF) representa un método rápido objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión.

El principio en el que se basa esta tecnología es simple: hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz (figura 1) y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso.

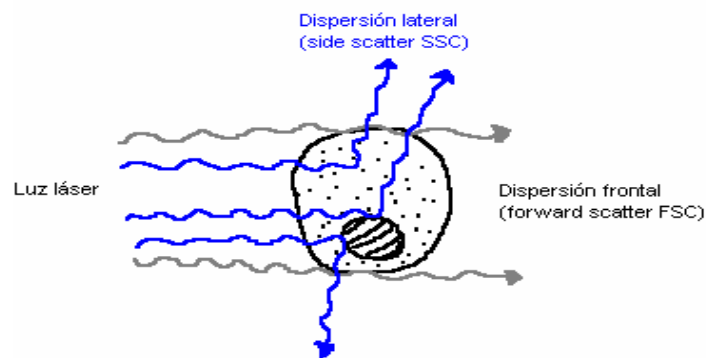


Figura 1. Dispersión de luz de un rayo láser por una célula (5).

Características de la dispersión frontal

- La luz es difractada en ángulos bajos entre 1 y 10 grados.
- Generalmente es proporcional al tamaño celular y otros factores.
- Es detectada a través del eje de la luz incidente en la dirección frontal.

Características de la dispersión lateral

- La luz es reflejada a grandes ángulos.
- Es proporcional a la granularidad y complejidad de la célula.
- Es detectada a  $90^\circ$  del eje de la luz incidente.

A partir de esta dispersión, cuando las células pasan alineadas en una fila única en un chorro fluido a una velocidad de 500 a 4000 células por segundo es posible medir:

- Tamaño relativo, por la dispersión frontal de la luz.
- Granularidad relativa o complejidad interna, por la dispersión lateral de la luz.
- Intensidad de fluorescencia (FL1, FL2 o FL3).

En citometría de flujo la fluorescencia es la cantidad de colorante fluorescente o fluorocromo, que se unirá a una célula y es proporcional a la cantidad de sitios de unión, esto es representado en la siguiente línea (5).

$$\text{Intensidad de fluorescencia emitida} \propto \text{sitios de unión}$$

## 1.2 Fluorocromos

Los fluorocromos son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente, se caracterizan por sus espectros de excitación y de emisión, por lo que su utilización está condicionada por el tipo de láser del que disponga el citómetro y de la longitud de onda a la que se exciten ellos mismos. La intensidad de fluorescencia también depende del fluorocromo utilizado, ya que hay fluorocromos que emiten con mayor intensidad que otros, los más utilizados son mostrados en la tabla 1. De este modo la citometría de flujo permite medir simultáneamente múltiples características físicas de una célula, ver tabla 2.

<i>Fluorocromo</i>	<i>Energía de excitación</i>	<i>Energía de emisión</i>
Proteína clorofila piridina (PerCP)	488 nm	677 nm
Ficoeritrina-R (PE)	488 nm	585 nm
Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	488 nm	515 nm

Tabla1. Algunos fluorocromos utilizados en citometría de flujo (5).

<i>PARÁMETROS MEDIBLES POR CMF</i>		
	<i>ESTRUCTURALES</i>	<i>FUNCIONALES</i>
<i>Intrínsecos</i>	Tamaño y forma celular	Estado de Red-Ox
	Granularidad citoplasma	
	Contenido pigmentos	
	Fluorescencia proteínas	
<i>Extrínsecos</i>	Contenido DNA, RNA	Estudios membrana
	Proporción de bases DNA	Actividad enzimática
	Estructura cormatínica	Endocitosis
	Proteínas toatales o básicas	Síntesis DNA
	Grupos químicos	Receptores
	Antígenos	Potencial de membrana
	Azúcares superficie	pH, calcio, carga superficie
Estructura citoesqueleto		

Tabla 2.Características celulares medibles por citometría de flujo (5)

Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora, ver figura 2 y tabla 3.

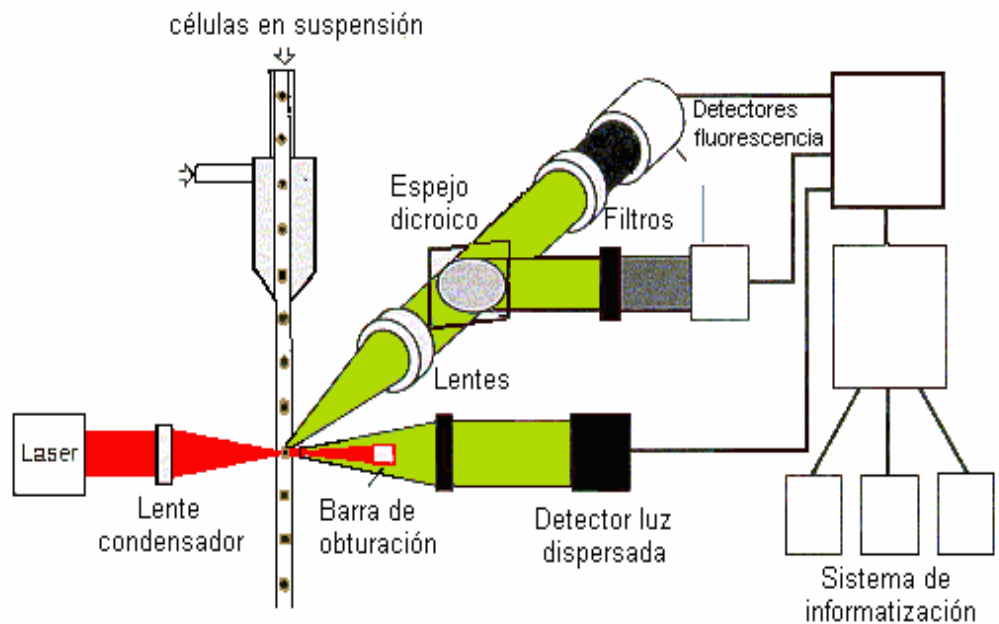


Figura 2. Sistemas de un citómetro de flujo (6).

SISTEMAS	COMPONENTES
Fluidico	<p>Fluido transportador: Solución salina isotónica.</p> <p>Muestra de células: Suspensión celular limpia de <math>5 \times 10^5</math> a <math>2 \times 10^7</math> células/mL.</p> <p>Aire presurizado: Muestra presurizada a 4.6 psig, 4.8 psig o 5.0 psig.</p>
Ópticos	<p>De excitación, consiste de:</p> <p>Un láser (iniciales de Light Amplification by Stimulated Emisión of Radiation) que emite luz monocromática, unidireccional y en fase.</p> <p>Lentes y prismas para formar y enfocar el rayo láser.</p> <p>De colección, consiste de:</p> <p>Sistema de espejos ópticos y filtros para seleccionar la longitud de onda específica para los detectores ópticos designados.</p>
Electrónico	<p>Conversión de señales ópticas a señales electrónicas proporcionales (pulsos de voltaje).</p> <p>Análisis de altura de pulsos de voltaje.</p> <p>Análisis computarizado y visualización en pantalla.</p>

Tabla 3. Componentes de un citómetro de flujo (6).

### 1.3 Conceptos sobre inmunofluorescencia

El término inmunofluorescencia se usa para describir las técnicas en que se emplea un fluorocromo para marcar un anticuerpo. Ya en 1941, Conos (7) informó de la aplicación de esta técnica para localizar antígenos y anticuerpos en secciones de tejido. El descubrimiento de los anticuerpos monoclonales por Kohler y Milstein en 1975 (8), incrementó dramáticamente el uso de la inmunofluorescencia para la identificación de antígenos de superficie celular.

La fluorescencia ha sido usada para visualizar ciertas moléculas y estructuras por medio de la microscopía óptica durante muchos años. Esta ha encontrado una extensa área de aplicación en la citometría de flujo. La capacidad para detectar simultáneamente la fluorescencia de dos, tres, cuatro o actualmente hasta 13 fluorocromos de diferentes longitudes de onda, abre completamente el campo del análisis multiparamétrico.

Cuando una molécula absorbe luz, y por tanto energía, algunos de sus electrones pueden alcanzar una órbita de mayor energía. Se dice entonces que la molécula ha alcanzado un estado de excitación, y puede volver a su estado basal cuando estos electrones vuelven a su órbita de menor energía. En algunos compuestos el electrón excitado cae rápidamente, usualmente en nanosegundos, al estado basal, emitiendo un cuanto de luz o fotón y desprendiendo energía. Esta transición radiante se denomina fluorescencia (9). A este tipo de compuestos se les denomina fluorescentes o fluorocromos.

El objetivo del análisis por inmunofluorescencia en citometría de flujo es asignar a cada célula a un grupo específico de células que compartan propiedades comunes. El primer paso es identificar las células de interés, por ejemplo, para el análisis de subpoblaciones linfocitarias se requiere seleccionar un área de trabajo distinguiendo los leucocitos por sus propiedades de dispersión de luz (tamaño contra complejidad celular). Una vez que las células de interés han sido distinguidas de los otros tipos celulares, se puede usar la inmunofluorescencia para determinar la proporción o el número de células que poseen un determinado marcador, por ejemplo, del marcador CD4 para monitorear el progreso de la enfermedad por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (10), entre muchas otras aplicaciones clínicas.

Un aspecto importante y que representa una ventaja de la citometría del flujo, es la posibilidad de medir tantos parámetros como anticuerpos se dispongan para ello, marcados con distintos fluorocromos. Así, es posible caracterizar una célula por su fenotipo de superficie y, al mismo tiempo, conocer el estado intracelular que guarda la célula como su patrón de secreción de citocinas, o bien, la etapa del ciclo celular en la que se encuentra.

#### **1.4 Aplicaciones de la citometría de flujo a la investigación básica**

Son innumerables las aplicaciones de la citometría de flujo a la investigación básica, desde campos como la microbiología, hematología, inmunología, citología, patología, biología celular y molecular, entre otros, Sin embargo, es posible intentar clasificar dichas aplicaciones, según el área específica en la que puede ser útil la citometría de flujo como herramienta de investigación, en seis aplicaciones generales: inmunofenotipificación de superficie, antígenos intracelulares, antígenos circulantes, inmunoproliferación, bioquímica intracelular y muerte celular en el sistema inmune. Ha sido utilizada en el monitoreo del contenido del ADN (11), expresión fenotípica, transporte de drogas, flujo de calcio (12), proliferación y apoptosis (13). Virtualmente es posible marcar cualquier molécula que sea de interés siempre que se disponga de un anticuerpo acoplado a un fluorocromo que pueda ser detectado por el citómetro de flujo, esto hace posible que las aplicaciones del citómetro de flujo se adapten prácticamente a cualquier necesidad de investigación. Actualmente, la relación entre la aplicación básica y clínica es cada vez más estrecha dando la oportunidad a su vez a la aplicación diagnóstica, pronóstica y de tratamiento en múltiples enfermedades.

#### **1.5 Aplicaciones clínicas de la citometría de flujo**

La citometría de flujo es una técnica que permite un análisis celular multiparamétrico de forma rápida, sensible y específica asimismo permite el análisis de un gran número de células (habitualmente entre 10,000 células por muestra). La aplicación de la citometría de flujo al análisis celular permite conocer aspectos físicos de la célula (tamaño y complejidad) y determinar la presencia o ausencia de determinados antígenos (habitualmente entre 3 y 4) en los diferentes compartimentos celulares (superficie celular, citoplasma, mitocondria y núcleo) lo que contribuye a aumentar, tanto la especificidad como la sensibilidad de la prueba. En otras áreas como en el diagnóstico y clasificación de las inmunodeficiencias primarias, en el monitoreo de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (14), el lupus eritematoso sistémico (15) y la artritis reumatoide (16), la citometría de flujo ha demostrado su utilidad. También se ha demostrado útil en el seguimiento de la recuperación inmune tras el trasplante de médula ósea (17), en la identificación precoz del rechazo en pacientes que han recibido un trasplante alogénico (18), o en el monitoreo terapéutico de los enfermos con anemia aplásica (19).

## 1.6 El sistema inmunológico y las citocinas

La función del sistema inmune es la defensa frente a las infecciones. Para ello cuenta con dos tipos de mecanismos que actúan de manera coordinada: unos innatos y otros adaptativos, los elementos de cada tipo se muestran en el tabla 4.

Los mecanismos efectores de destrucción innatos son de acción inmediata, con mecanismos de reconocimiento del patógeno inespecíficos, carentes de memoria inmunológica, encargados de combatir la infección desde el mismo momento de su inicio y durante las primeras fases de la misma. La inmunidad innata se basa en la activación del complemento por la vía alternativa y en los fagocitos (monocitos) macrófagos y neutrófilos. Existen otros mecanismos que no actúan inmediatamente, sino que son inducibles, como son la respuesta de fase aguda, las células citolíticas naturales (NK, *natural killer*), las citocinas y otros mediadores que producen inflamación.

Las respuestas adaptativas tienen unos mecanismos de reconocimiento del patógeno extremadamente específicos, presentan memoria y los responsables de realizarla son los linfocitos T y los linfocitos B. Para combatir a los patógenos extracelulares o sus productos, los linfocitos B secretan anticuerpos que se unen específicamente al patógeno o sus productos y actúan como adaptadores entre el patógeno y el mecanismo destructor innato o adaptativo (complemento activado por la vía clásica, fagocitos). Los linfocitos T no reconocen el antígeno en forma soluble, sino asociada a moléculas del sistema antigénico leucocitario humano (HLA) propias sobre otras células. Tienen varias funciones (muchas mediadas por la secreción de citocinas): unos ayudan a los linfocitos B a producir anticuerpos, otros ayudan a los macrófagos a destruir patógenos fagocitados por éstos y otros destruyen células infectadas por virus.

Todas las células del sistema inmune necesitan estar conectadas entre sí para elaborar de forma conjunta y ordenada una respuesta inmune que termine con la eliminación del patógeno. Para ello, las células utilizan dos medios principales de comunicación: uno es el contacto directo mediante las distintas moléculas de membrana; pero otra forma, igualmente importante, de relacionarse es mediante la síntesis de pequeñas proteínas que reciben el nombre genérico de citocinas. Estas citocinas son producidas en los primeros instantes de la activación celular, alertando a las diferentes células que poseen receptores de citocinas en la membrana de que hay una respuesta inmune en marcha.

	Inmunidad adaptativa	Inmunidad innata		
		Inmediata	Inducida	
Moléculas	Citocinas Anticuerpos Citolisinas	Complemento	Citocinas Mediadores de la inflamación	Proteínas de fase aguda
Células	Linfocitos T Linfocitos B Células dendríticas	Fagocitos (macófagos, neutrófilos)	Células NK Eosinófilos Basófilos/mastocitos	Endotelioцитos
Órganos y tejidos de interacción	Bazo Ganglios	Zonas infectadas		
Órganos y tejidos de producción	Timo (T) Médula ósea (B)	Hígado (complemento, fase aguda) Médula ósea (leucocitos)		
Sistemas de circulación	Linfa Sangre	Sangre		

Tabla 4. Múltiples tejidos, células y moléculas intervienen de manera coordinada en la respuesta inmune (20).

La unión de la citocina a su receptor en la célula diana genera, en algunos casos ayudado por otras proteínas de membrana, una señal intracelular en la que intervienen un gran número de proteínas, generalmente fosfatasa y cinasas. Como consecuencia de esta cascada de reacciones bioquímicas se induce la expresión de ciertos genes, originando dos efectos principales, en el figura 3 se muestra que en primer lugar hay un efecto autocrino: la propia célula productora es a la vez diana, induciéndose a su proliferación y su diferenciación. En segundo lugar, hay un efecto paracrino: la célula productora induce la expresión de receptores en la membrana de las diferentes células diana, y activa o inhibe su función celular.

Se denomina genéricamente citocinas al conjunto de proteínas de bajo peso molecular (6,000 a 60,000 kD), que sintetizan las células del sistema inmune en respuesta a un determinado estímulo. Dentro de este nombre se agrupan las proteínas llamadas linfocinas, monocinas, quimiocinas, **interleucinas**, **interferones** y factores estimuladores de colonias. Estos nombres hacen referencia al origen (linfocitos, monocitos) o función de las citocinas (quimiotaxis, inhibición viral, leucopoyesis) (21).



Los productores mayoritarios de estas proteínas son los macrófagos y los linfocitos T, ya que actúan como los principales reguladores de la respuesta inmune innata y específica, respectivamente, sin embargo, otras células del sistema inmune sintetizan distintas citocinas cuando se activan. Aunque hay un gran número de citocinas distintas todas comparten ciertas características:

- Son producidas *de novo* cuando comienza la activación celular y tienen una vida media muy limitada,
- Son potentes en extremo, actúan en concentraciones desde  $10^{-10}$  a  $10^{-15}$  mol/L,
- Sólo son capaces de estimular a aquellas células que posean receptores específicos, generalmente formados por varias cadenas polipeptídicas. Una misma citocina es capaz de actuar sobre distintos tipos celulares si éstos poseen el mismo receptor específico.

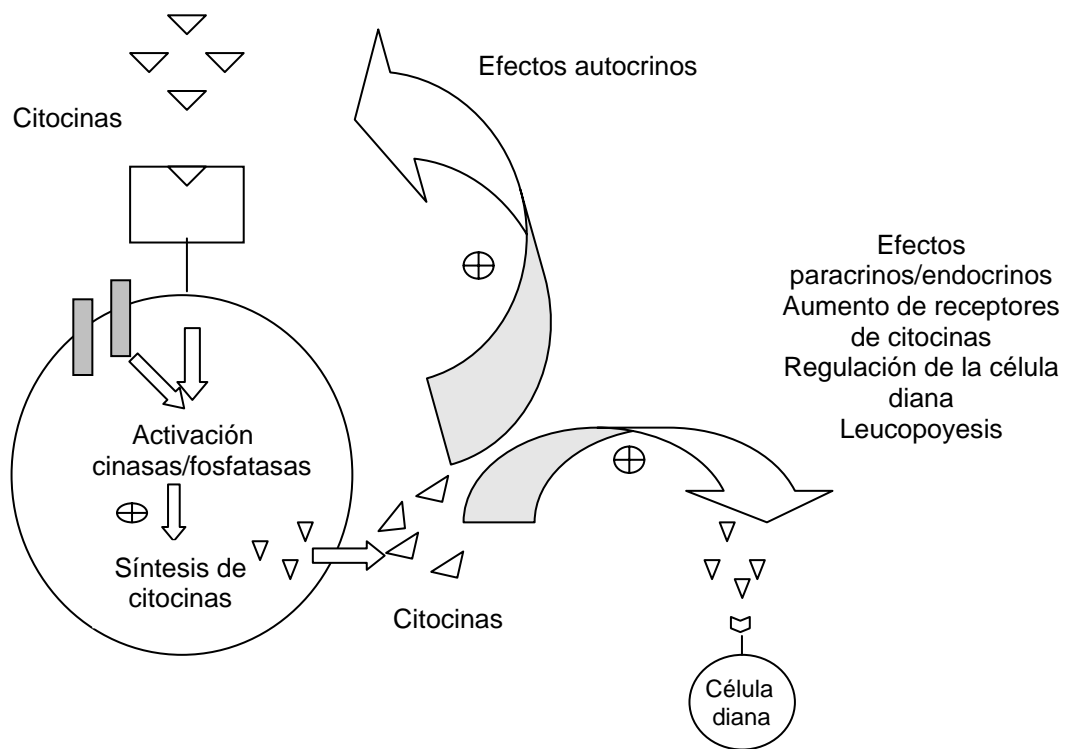


Figura 3. La síntesis de citocinas induce la actuación tanto en la propia célula (efecto autocrino) como sobre otras células que poseen el receptor para esa citocina (efecto paracrino) (21).

## 1.7 Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas que actúan como reguladores humorales del funcionamiento del sistema inmune a muy bajas concentraciones (picogramos/mL); el crecimiento, la diferenciación y función de una amplia variedad de células. Son producidas por cualquier tipo de célula cuando es estimulada convenientemente (destacan en especial los macrófagos y los linfocitos T), intervienen como mediadores de la respuesta inmunológica e inflamatoria, como factores de crecimiento y diferenciación (sobre todo de células hematopoyéticas), y participan en la apoptosis, reparación tisular (sobre todo por angiogénesis) y fibrosis celular. Su síntesis es temporalmente breve y transitoria, derivada de un proceso de activación celular, y su producción cesa al desaparecer el estímulo activador. Si bien pueden ejercer su efecto a distancia como las hormonas (aunque su espectro de acción es mucho más amplio que el de éstas), por lo general, actúan de forma local mediante un mecanismo autocrino (sobre la misma célula), paracrino (sobre células vecinas), yuxtacrino (sobre células vecinas pero interactuando intercelularmente) o retrocrino (sobre la misma célula o sobre células vecinas, pero a través de formas solubles de ciertos receptores de membrana).

En el ámbito mundial son cada vez más las investigaciones sobre citocinas debido a que se les ha encontrado involucradas en la patogénesis de algunas enfermedades, entre ellas el cáncer. Las principales clases de citocinas que se han evaluado en clínica son interferones, interleucinas, factores estimuladores de colonias y factores de necrosis tumoral.

Los primeros estudios sobre las citocinas se comenzaron desde 1950 y hasta 1970 sólo describían sobre todo los numerosos factores proteicos producidos por diferentes células que mediaban funciones particulares en bioanálisis particulares. En la tabla 5 se resumen los acontecimientos posteriores a estas décadas en la investigación de las citocinas.

El efecto que ejercen las diferentes citocinas sobre las células diana puede ser redundante o coincidente (p.ej. IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ), pleiotrópico (múltiples efectos de una misma citocina según el tejido involucrado, sinérgico o agonista, antagonista, o dependiente de otras circunstancias contextuales (concentración, estado de la célula diana, presencia de otras citocinas, según secuencia temporal de actuación con respecto a otras citocinas, etc).

<i>AÑO</i>	<i>ACONTECIMIENTOS</i>
1950 – 1970	<p>Primeros estudios sobre citocinas.</p> <p>Descubrimiento de interferones antivirales, pirógenos o productores de fiebre y factores activadores de macrófagos.</p>
Década 1970	<p>Purificación y caracterización parcial de muchas citocinas individuales.</p> <p>Producción de antisueros específicos neutralizantes.</p> <p>Surgió la hipótesis de que las citocinas eran sintetizadas principalmente por leucocitos y actuaban básicamente en otros leucocitos, y por ello podrían denominarse interleucinas.</p> <p>Preparaciones de citocinas disponibles solían ser impuras, y muchos de los anticuerpos anti-citocina no eran absolutamente específicos. Estas limitaciones metodológicas evitaron la identificación firme de los factores activados como la misma molécula o moléculas distintas.</p>
Década 1980	<p>Clonación y expresión molecular de moléculas de citocina individuales y por la producción de anticuerpos neutralizantes completamente específicos, a menudo monoclonales. Estos reactivos permitieron una identificación definitiva de la estructura y propiedades de moléculas de citocinas.</p> <p>Se descubrieron muchas citocinas nuevas y se revelaron muchas propiedades inesperadas de citocinas conocidas. Como resultado de estos estudios, ahora existe una riqueza de información sobre fuentes y actividades biológicas de citocinas particulares.</p>
Década 1990	<p>Jung, Picker y col. diseñaron un método novedoso para el análisis intracelular de las citocinas después de incubación con reactivos tales como monensin o brefeldina A (BFA). Este proceso interrumpe el transporte intracelular mediado por el aparato de Golgi y permite la acumulación de citocinas produciendo una señal aumentada que puede ser detectada por citometría de flujo.</p>

Tabla 5. Resumen del descubrimiento y caracterización de las citocinas (23).

### 1.7.1 Citocinas y respuesta inmune

La respuesta inmune a groso modo, y teniendo en cuenta los 2 tipos celulares mayormente involucrados en la producción de citocinas y sus principales efectos, se lleva a cabo con la intervención de los macrófagos (en respuesta a endotoxinas y peptidoglucanos bacterianos, ARNviral e/o IFN- $\gamma$  que median la inmunidad innata e inflamación por medio de citocinas como la IL-1, IL-12 y TNF- $\alpha$ , y con los linfocitos T (en respuesta a antígenos proteicos propios o extraños) que median la inmunidad adaptativa y la proliferación y diferenciación de clones de linfocitos, por medio de citocinas como la IL-2, IL-4 e IL-5. Los primeros pueden ser inhibidos por los corticosteroides y los últimos por la ciclosporina y el tacrolimus. Además, ciertas citocinas son capaces de regular, modular y favorecer una determinada respuesta (en detrimento de otra) a un estímulo adecuado por interacción con las células productoras de éstas, como así ocurre, p. ej., con la IL-10 e IL-13 que inhiben la respuesta inmune celular debida a las células LTh1 y con el IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-18 que inhiben la respuesta inmune humoral debida a las células LTh2 (22).

Las citocinas pueden dividirse en función de su origen, estímulo y efectos biológicos en 5 grupos:

1. Interleucinas (IL)
2. Factores de necrosis tumoral (TNF)
3. Factores estimuladores de colonias (CSF)
4. Interferones (IFN)
5. Quimiocinas

### 1.7.2 Interleucinas (IL)

**IL-1:** Es proinflamatoria. Se divide en IL-1 $\gamma$ , que actúa a nivel intracelular y no se detecta en suero, IL-1 $\beta$ , capaz de activar linfocitos T, macrófagos y células del endotelio vascular e IL-1RA, que es antagonista del receptor de la IL-1, compitiendo con la IL-1 $\gamma$  e IL-1 $\beta$  por su receptor (por lo que tiene carácter inhibitor de sus acciones). Las principales células productoras son, entre otras, los macrófagos.

**IL-2:** Promueve la proliferación de células T (LTh0  $\rightarrow$  LTh1; inmunidad celular). Ejerce su acción a través de un receptor de membrana formado por 3 subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). Tras su acción se libera y solubiliza la fracción  $\gamma$  (p55), como sIL-2R, que compete con el receptor por la IL-2, disminuyendo su biodisponibilidad. Las principales células productoras son, entre otras, los linfocitos LTh0 activados y los LTh1.

**IL-3:** Estimula el crecimiento y diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas. Las principales células productoras son, entre otras, los linfocitos T.

**IL-4:** Promueve la proliferación de células T (LTh0 ~~▲ LTh2; inmunidad humoral) y la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B. Al igual que la IL-2, al unirse a su receptor se solubiliza una cadena  $\alpha$  de éste, como sIL-4R, la cual disminuye su biodisponibilidad. Las principales células productoras son, entre otras, los Linfocitos Th0 activados y los mastocitos.

**IL-5:** Activación, proliferación y diferenciación de Linfocitos B, y principal factor regulador de la eosinofilia (por esto en algunos tumores productores de IL-5 aparece una franca eosinofilia). Las principales células productoras son, entre otras, los linfocitos Th2 y los mastocitos.

**IL-6:** Principal regulador de la respuesta inmunológica y de reacciones de fase aguda, interviene también en la hematopoyesis. Actúa a través de un receptor formado por 2 subunidades (R-IL-6 y gp130). Ambas subunidades se solubilizan tras unirse la IL-6, como sIL-6R y gp130 soluble, pero mientras el sIL-6R actúa como agonista de la IL-6, el gp130 soluble actúa como antagonista y reduce su biodisponibilidad. Tiene propiedades proinflamatorias y antiinflamatorias, predominando (al igual que otras citocinas que se unen al receptor gp130) la acción antiinflamatoria. Las principales células productoras son múltiples y de muy diferentes tipos, destacando los macrófagos activados, monocitos, fibroblastos y las células del endotelio vascular.

**IL-7:** Estimula el desarrollo de linfocitos pre-B y pre-T, y aumenta la producción de LT8 y células NK (las 2 células con actividad anti-tumoral). Las principales células productoras son, entre otras, las células del timo, médula ósea y queratinocitos.

**IL-8:** Moviliza (factor quimiotáctico) y activa a los neutrófilos, estimulando la fagocitosis. Es también angiogénico. Las principales células productoras son, entre otras, los monocitos.

**IL-9:** Es un mitógeno, induciendo la proliferación de linfocitos T. Ha sido implicada en el desarrollo de tumores de células T.

**IL-10:** Tiene efecto antiinflamatorio. Inhibe la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-2 por parte de los LTh1, y la síntesis de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  por parte de los macrófagos. Es también co-estimulador del crecimiento de varias células hematopoyéticas, incluyendo Linfocitos B y T. Las principales células productoras son, entre otras, los linfocitos Th2.

**IL-11:** Efectos antiinflamatorios, disminuyendo la síntesis de IL-1 y TNF- $\alpha$  por parte de los macrófagos. Induce la producción de las proteínas de fase aguda por las células hepáticas (junto con la IL-6), actúa sobre el desarrollo de células hematopoyéticas y protege y regenera las células epiteliales intestinales. Tiene escaso efecto sobre linfocitos. Las principales células productoras son, entre otras, las células de la médula ósea y mesenquimales.

**IL-12:** Induce la síntesis de IFN- $\gamma$  e IL-2 por los LTh1 e inhibe la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 por los LTh2. Además activa las células NK y aumenta la expresión de receptores para la IL-18. Las principales células productoras son, entre otras, los linfocitos B.

**IL-13:** Estimula e incrementa la producción de citocinas por los LTh2, e inhibe las citocinas proinflamatorias sintetizadas por los LTh1 y macrófagos, y factores quimiotácticos secretados por monocitos y linfocitos B. Induce la expresión de **CD23** en linfocitos B, eosinófilos y macrófagos. Del cribaje proteolítico del CD23 se solubilizan varias proteínas, denominadas todas ellas como **sCD23**, que son capaces de actuar como citocinas y regular la respuesta inmune (se consideran citocinas multifuncionales). Las citocinas sCD23 se han relacionado con una amplia variedad de enfermedades como las alérgicas (por su importante papel en la síntesis de IgE por parte de los linfocitos B), artritis reumatoide, rinitis, hepatitis y diversas hemopatías (tienen valor pronóstico en la leucemia linfática crónica). Las principales células productoras son, entre otras, los linfocitos Th2 y mastocitos.

**IL-14:** Factor de crecimiento de elevado peso molecular de los linfocitos B. Muestra una elevada homología con el factor Bb del sistema del complemento (vía alternativa).

**IL-15:** Actividad biológica similar a la IL-2, pero actuando sobre células diana distintas. Su receptor es igual al de la IL-2, salvo por su cadena  $\alpha$  que es distinto.

**IL-16:** Es proinflamatoria. También denominada factor quimioatrayente de linfocitos, aumenta la expresión de receptores para la IL-2 en linfocitos B y T, células NK, macrófagos y monocitos. Las principales células productoras son, entre otras, los linfocitos T8 activados.

**IL-17:** Aumenta la expresión de moléculas **ICAM-1** en la membrana de fibroblastos y estimula la secreción de IL-6, IL-8 y G-CSF por parte de células epiteliales, endoteliales y fibroblastos. Las principales células productoras son, entre otras, los linfocitos T4 estimulados.

**IL-18:** Acción similar a la IL-12 con la que actúa sinérgicamente. Es la mayor inductora de la producción de IFN- $\gamma$ . Las principales células productoras son, entre otras, los macrófagos activados.

### **1.7.3 Factores de necrosis tumoral (TNF)**

**TNF- $\alpha$ :** También denominado caquectina. Tiene efecto anti-tumoral (por 2 mecanismos: necrosis hemorrágica del tumor [es anti-angiogénico] y por aumento de la inmunidad anti-tumoral [en sinergia con el IFN- $\gamma$ ]), y actúa como mediador en el desarrollo del shock séptico y de la caquexia en enfermedades crónicas. Además activa potentemente a los macrófagos, estimula la producción de citocinas por muchos tipos celulares e incrementa la permeabilidad vascular. Las principales células productoras son, entre otras, los macrófagos, monocitos y los linfocitos T.

**TNF- $\beta$ :** También denominado linfotoxina. Tiene actividad citotóxica sobre algunos tipos tumorales, mediado sólo por necrosis hemorrágica. Las principales células productoras son, entre otras, los linfocitos T activados.

#### 1.7.4 Factores estimuladores de colonias (CSF)

**GM-CSF:** Estimula de forma preferencial la formación de células de granulocitos y monocitos, y en menor medida de eosinófilos. En combinación con la eritropoyetina interviene en el desarrollo de los eritrocitos. Las principales células productoras son, entre otras, los linfocitos Th1 y Th2, y macrófagos.

**G-CSF:** Interviene tardíamente en la hematopoyesis induciendo de forma específica la formación de colonias de granulocitos. Las principales células productoras son, entre otras, los monocitos, células endoteliales y epiteliales.

**M-CSF:** Interviene tardíamente en la hematopoyesis induciendo de forma específica la formación de colonias de monocitos. Las principales células productoras son, entre otras, los monocitos, células endoteliales y fibroblastos.

#### 1.7.5 Interferones (INF)

Constituidos por un amplio grupo de proteínas caracterizadas por tener una potente acción antiviral y antineoplásica, así como por su efecto regulador de las células del sistema inmune. Están:

**INF- $\alpha$ :** Formado por una familia de unas 14 proteínas, tiene actividad antiviral y estimula la expresión celular del CMH de clase I. Al igual que el INF- $\beta$ , ambos se unen al mismo receptor, por lo que se les denomina **INF tipo I**. Las principales células productoras son, entre otras, los macrófagos y linfocitos B.

**INF- $\beta$ :** INF tipo I, con cierta homología estructural y funcional al INF- $\alpha$ . Las principales células productoras son, entre otras, los fibroblastos y células epiteliales.

**INF- $\gamma$ :** Actúa sobre un receptor distinto a los anteriores, por lo que también se le denomina INF tipo II. Interviene en la activación de macrófagos, células NK, induce la expresión celular del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo I y II e intensifica la secreción de mediadores de inflamación en muchos tipos celulares. Además, incrementa la expresión de la subunidad  $\alpha$  del receptor para la IL-2 y actúa sinérgicamente con el TNF- $\alpha$  como anti-tumoral. Las principales células productoras son, entre otras, los linfocitos T activados y células NK.

#### 1.7.6 Quimiocinas

Citocinas de pequeño tamaño mediadoras de la inflamación por inducir la quimiotaxis y activación celular de muchos tipos celulares. Actúan a nivel de receptores pertenecientes a la

superfamilia de receptores que se unen a la proteína G. Generalmente no inducen la producción de otras citocinas, no generan fiebre ni son reactantes de fase aguda. Se dividen en 4 familias:

**$\alpha$ -quimiocinas o CXC:** Está formada por 2 subgrupos. El primero de ellos es quimioatractor y activador de los neutrófilos (al igual que la IL-8); el segundo es quimioatractor y activador de muchos tipos celulares (monocitos, linfocitos T y B, Células dendríticas, células NK, eosinófilos, etc.). Muchos tipos celulares del organismo son productoras de estas quimiocinas.

**$\beta$ -quimiocinas o CC:** Entre otras, forman parte de esta familia el MIP (que actúa sobre Macrófagos), RANTES (sobre linfocitos T) y Eotaxin (sobre LTh2 y eosinófilos). Son quimiotácticos y modulan la apoptosis, entre otros efectos.

**$\gamma$ -quimiocinas o C:** Formadas por la linfotactina y el SCM-1 (motivo C solitario). Activan e inducen la quimiotaxis de Linfocitos T y células NK.

**$\delta$ -quimiocinas o CX3C o CXXXC:** Familia formada por un sólo miembro, la fractalquina o neurotactina. Es la única quimiocina de membrana. Está implicada en la adherencia y quimiotaxis de monocitos y linfocitos T. Las principales células portadoras de esta quimiocina son las células endoteliales (23).

## 1.8 Relación entre nutrición e inmunidad

La existencia de alguna relación entre malnutrición e incremento de la susceptibilidad a la enfermedad ha sido reconocida desde épocas muy remotas. En el año 5000 a.C. las antiguas escrituras de la India mencionaban la asociación entre dieta y salud. Los registros de la iglesia en Inglaterra medieval anotan que las epidemias por enfermedades infecciosas eran precedidas por años consecutivos de pérdidas en los cultivos y hambruna.

Hay una relación estrecha entre el estado nutricional, el funcionamiento inmunitario y la susceptibilidad a las infecciones (24). Estas últimas se incrementan cuando la desnutrición es grave, ya sea de tipo general o específica para algún nutriente (25-32). La desnutrición es la causa más frecuente de inmunodeficiencia infantil en el mundo, aumenta la frecuencia y gravedad de las infecciones y sus efectos son más perniciosos sobre la inmunidad celular (33).

La necesidad de la nutrición comienza con el inicio de la vida, puesto que los procesos químicos esenciales para la función celular y para el crecimiento y desarrollo del individuo exigen el aporte de nutrientes que deben ser provistos del exterior. El conocimiento cabal del sistema inmune y sus estados de alteración, resulta de gran importancia en la evaluación y tratamiento del paciente pediátrico.



A pesar de la frecuencia y la gravedad de la desnutrición en todo el mundo, en particular entre los niños, la evaluación del fenómeno continúa atada a las antiguas mediciones antropométricas, sin que, por ejemplo, se haya podido avanzar en la consolidación de un sistema de evaluación nutricional basado en mediciones bioquímica o en un sistema antropométrico y bioquímico. Tradicionalmente, para clasificar el riesgo de desnutrición se elaboran índices antropométricos basados en el sexo, la edad, el peso y la talla del niño, tales como el peso para la edad (P/E), la talla para la edad (T/E) y el peso para la talla (P/T) (34). La prealbúmina puede reflejar mejor a corto plazo los cambios sucedidos en el metabolismo de las proteínas. También los niveles sanguíneos de albúmina, transferrina, apolipoproteína A1 y retinol (vitamina A) se han empleado para explorar el estado nutricional (35, 36). Hall propuso un índice de desnutrición en función de parámetros antropométricos y bioquímicos, considerando dentro de estos la albúmina y la prealbúmina, y lo llamó índice pronóstico inflamatorio y nutricional (35). Sin embargo, la evaluación estándar del estado y del riesgo nutricionales descansa todavía en los criterios antropométricos.

Por su parte, la evaluación del estado inmunitario incluye la medición de inmunoglobulinas G y M (IgG e IgM, respectivamente); citocinas, como las interleucinas, los interferones y los factores de necrosis tumoral; así como conteos de células sanguíneas, como leucocitos totales, linfocitos y sus subpoblaciones.

## **1.9 Modulación de la respuesta inmune por los nutrientes**

La desnutrición primaria causada por el inadecuado suplemento de macronutrientes o selectivos micronutrientes pueden llevar a deficiencias inmunes e infecciones en niños. Las infecciones son más frecuentes en los niños malnutridos y la interacción de la desnutrición crónica y las infecciones llevan a alterar poblaciones de células inmunes y un aumento de mediadores inflamatorios. La reducción de los leucotrienos con cambios en la acumulación de leucocitos y capacidad fagocítica altera la ingestión y muerte de los microorganismos. La deficiencia de micronutrientes selectivos también pueden causar deficiencias inmunes específicas. El sistema inmune celular es el que directamente se ve más afectado por la malnutrición que el sistema humoral. La estructura y función del timo es dañado. En contraste la seroconversión a corto plazo de vacunas inactivadas virales o polisacáridos bacterianos que reciben niños malnutridos puede ser normal.

El sobrepeso y la obesidad ha ido en aumento en la infancia. Los estudios sugieren que la leptina, que actúa como hormona que regula la saciedad y como una citocina inmunorreguladora y la grelina el ligando natural para el receptor de la hormona de crecimiento en la hipófisis vincula la regulación de grasa con el sistema inmune. La causa de desórdenes de la alimentación que involucra esos mecanismos explica por qué una deficiencia de la respuesta inmune se observa en paciente con anorexia y bulimia.

### 1.9.1 Deficiencias de micronutrientes

Las deficiencias de vitaminas B12, B6, C, E, folato, niacina o elementos trazas causan daños en el DNA, lesiones oxidativas o ambas. Los prematuros requieren de soporte nutricional para sus requerimientos metabólicos. La leche materna normalmente provee micronutrientes biodisponibles así como inmunoglobulina secretora y factores de crecimiento, sin embargo algunas leches maternas pueden ser carentes de zinc a pesar de valores plasmáticos normales, llevando a una condición fenotípicamente a la acrodermatitis enterohéptica.

Deficiencia de hierro: La suplementación de hierro puede ser adversa en ciertas condiciones como respuesta aguda a una infección, estrés o heridas. Sobredosis de hierro causada por transfusiones es una complicación de la  $\beta$ -talasemia produciendo toxicidad en ciertos órganos.

En la hemocromatosis hereditaria, hay paradójicamente deficiencia de hierro en los macrófagos, que puede llevar como resultado a un aumento de la resistencia bacteriana.

La terapia de quelación del hierro en la infección por *Plasmodium falciparum* puede aliviar el curso de la malaria cerebral en niños. Sin embargo esto parece ser por cambios en la generación de óxido nítrico, más que por la disminución del hierro disponible para el parásito.

El hierro es un cofactor crítico en la función inmune. En la anemia por deficiencia de hierro en niños, se asocia a disminución de la actividad fagocítica y niveles de inmunoglobulinas. La deficiencia de hierro altera la respuesta de las células T y la producción de IL-12.

Déficit de zinc y cobre: El zinc es un cofactor esencial para la actividad de muchas enzimas, entre ellas la hormona tímica. La deficiencia lleva a la reducción de citocinas Th1 y la actividad de la hormona tímica y linfopenia. La suplementación mejora la inmunidad celular patógeno-específica en niños desnutridos.

Un déficit prolongado lleva a la activación del eje HHS con la producción crónica de glucocorticoides que acelera la apoptosis de células T y B, el defecto autonómico recesivo de la absorción de zinc se presenta en la infancia con dermatitis, diarrea, alopecia y aumento de las infecciones por inmunodeficiencia. Los defectos van de una atrofia tímica y linfopenia profunda a alergia en pruebas cutáneas y alteración de la actividad de las NK. El defecto se encuentra en la proteína transportadora, y mejora con la suplementación.

El déficit de zinc gestacional causado por un imbalance entre los requerimientos aumentados y la ingesta, puede causar defectos en el transporte de zinc a la leche materna produciendo deficiencia de zinc en los lactantes. Las fórmulas fortificadas mejoran el crecimiento lineal y su inmunocompetencia (respuesta de pruebas cutáneas, proliferación linfocitaria y niveles de IgA).

La deficiencia de zinc y cobre es común en niños con hipoproteinemia y produce una reducción de la función antioxidante (medido por la actividad de superóxidodismutasa). El zinc compite con el cobre en su absorción gastrointestinal y puede inducir su déficit. La respuesta a IL-2 es reducida en el déficit de cobre. Los niveles de cobre o de ceruloplasmina reflejan la severidad de la desnutrición.

Deficiencia de selenio: En la cardiomiopatía juvenil (enfermedad de Keshan) están involucrados el déficit de selenio y la infección por enterovirus y ciertos estudios sugieren que la deficiencia de ese micronutriente modifica la virulencia viral y la progresión de la infección por VIH. Las selenoproteínas son un componente importante en el sistema de defensa antioxidante que afecta la función de los leucocitos y las células NK.

Deficiencia de vitaminas antioxidantes: Las vitaminas antioxidantes A,E,C y beta caroteno son cofactores en la respuesta inmune. Bajos niveles de vitamina A se observan en inmunodeficiencias primarias como la común variable, se asocia con la ocurrencia de infecciones intestinales crónicas y esplenomegalia. La suplementación de vitamina A mejora los niveles de IgA y el CD40 ligando IgG activado y lleva a la disminución de citocinas inflamatorias. Las infecciones gastrointestinales y respiratorias pueden ser signos de niveles subclínicos de vitamina A. Los niveles reducidos de transretinol sérico son comunes en niños de madres HIV (+).

La deficiencia de vitamina A altera la barrera mucosa y disminuye la función de los neutrófilos, macrófagos y NK.

La vitamina E es un fuerte antioxidante, e influencia la función de las células T por una regulación a la baja de prostaglandina E2 y ciertos estudios sugieren que puede modificar la virulencia de infecciones virales.

La vitamina C es un regulador de la activación y supervivencia de células inmunes, aumenta la síntesis de óxido nítrico inducible por los macrófagos activados por lipopolisacáridos y también regulan la fagocitosis por disminución de la producción de radicales libres. Nuevos estudios observan que durante el ejercicio estresante (extenuante), la contracción del músculo estriado es el principal factor del aumento de la IL-6 en plasma y que la suplementación con vitamina C atenúa esta respuesta (37).

## **1.10 Desnutrición**

Desnutrición puede definirse como un desbalance entre los aportes y requerimientos de uno o varios nutrientes, a la que el organismo responde con un proceso de adaptación, en la medida que ésta situación se prolongue en el tiempo. Un déficit de nutrientes de corta duración sólo compromete las reservas del organismo, sin alteraciones funcionales importantes; en cambio una desnutrición de larga duración puede llegar a comprometer funciones vitales.

La desnutrición se asocia en el niño a una frenación de la curva ponderal inicialmente, y luego del crecimiento en talla, siendo la repercusión en esta última recuperable sin gran dificultad, si se logra una recuperación nutricional oportuna, no así cuando ha existido un trastorno nutricional de largo tiempo, en que la recuperación de la talla será lenta y en ocasiones, sólo parcial.

El deterioro nutricional, aparte del consumo de las reservas musculares y grasas, y de la detención del crecimiento, compromete en forma importante y precoz la inmunidad del individuo, especialmente la inmunidad celular, produciéndose así una estrecha interrelación entre desnutrición e infección, con subsecuente agravamiento del problema, especialmente frente a condiciones ambientales adversas (37).

### **1.10.1 Desnutrición primaria**

Es la causa principal de inmunosupresión secundaria en el mundo. Las deficiencias involucran frecuentemente proteínas, y una variedad de micronutrientes, vitamina A, E, B6, folatos, zinc, hierro, cobre, selenio.

Con base a la severidad y formas de presentación se clasifica en desnutrición calórico proteica (DCP) (marasmo) que ocurre cuando existe deficiencia de todos los alimentos, y desnutrición proteica (DP) (kwashiorkor) ocurre cuando hay déficit de proteínas pero no de calorías.

El kwashiorkor es común después de la lactancia y se caracteriza por retardo del crecimiento, edema y hepatoesplenomegalia, e hipoalbuminemia marcada.

El marasmo aparece más tempranamente los lactantes tienen anemia grave con bajos niveles de transferrina y deficiencia de zinc. La falta de selenio es mayor en los niños con marasmo que con los de kwashiorkor.

La desnutrición primaria lleva a atrofia de órganos linfoides, deficiencia de linfocitos T y aumento de la susceptibilidad a patógenos, reactivación de infecciones virales y desarrollo de infecciones oportunistas. Los defectos en las células T son similares a los observados en aplasia congénita. Los defectos de barreras en membranas mucosas son críticos en la patogénesis de infecciones respiratorias, gastrointestinales y urinarias, asociado a cambios de la flora microbiana. La migración celular se ve afectada.

Los niveles de inmunoglobulina sérica son normales o aumentadas y los niveles de IgA1, IgA2 y C4 tienden a ser mayores en niños desnutridos que en normales después de la aplicación de vacunas con polisacáridos capsulares. Sin embargo los niveles de C3 y la proporción de células B son menores. Sin embargo en niños desnutridos con infestación parasitaria se observa aumento de IgE total, pero la memoria específica de la T cooperadora (CD4) y la respuesta IgE específica es reducida.

La activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HAA) es crucial en la inmunodeficiencia en la desnutrición. Los niveles de leptina normalmente aumentan durante la infección e inflamación. La atrofia tímica causada por la DCP está asociado con un desbalance hormonal, baja leptina y aumento de los niveles de glucocorticoides. Además la deprivación de nutrientes lleva a la activación del eje HHA con aumento de los niveles de cortisol. La DCP lleva a una susceptibilidad aumentada a las infecciones.

#### **1.10.1.1 Desnutrición calórico proteica (DCP)**

Se produce por una nutrición deficiente crónica -donde predomina especialmente el déficit calórico- y cantidad insuficiente de todos los nutrientes. Se caracteriza por un consumo progresivo de las masa muscular y tejido adiposo, sin alteraciones importantes a nivel de vísceras excepto la disminución del número y tamaño de las células, y compromiso de la velocidad de crecimiento. Se compromete principalmente la inmunidad celular. En su grado extremo, el "marasmo", aparece como una gran emaciación, piel de "viejo", deficiente capacidad de concentración renal, problemas con la homeostasis hidroelectrolítica y ácido-base, lo que favorece la deshidratación frente a cualquier aumento de las pérdidas (especialmente diarrea y vómitos). El marasmo nutricional no se asocia en forma importante a anemia ni a otras carencias, excepto en su periodo de recuperación, en que pueden manifestarse carencias de hierro, zinc, vitamina D, etc. La DCP grave prolongada durante los primeros dos años de vida puede alterar el desarrollo neurológico del individuo, aunque en realidad es la deprivación socio afectiva - que se le asocia con gran frecuencia - tiene el impacto mayor en este aspecto. Es la principal causa de inmunodeficiencia secundaria en el mundo.

#### **1.10.1.2 Desnutrición proteica**

La desnutrición proteica en países del tercer mundo se produce en relación al destete durante el segundo y tercer año de vida, en situaciones de extrema miseria. En un paciente menor de dos años que ingresa con desnutrición proteica debe sospecharse siempre una enfermedad celíaca descompensada, aún si no hay claros antecedentes de diarrea crónica. A éste se le debe considerar un paciente de alto riesgo, y no susceptible de manejo ambulatorio en esta fase. La desnutrición de predominio proteico se produce en corto plazo (semanas), frente a las siguientes situaciones:

- a) Dieta carente de proteínas, pobre en lípidos y calorías, y compuesta casi exclusivamente de hidratos de carbono
- b) Aportes restringidos en paciente hipercatabólico
- c) Mala absorción intestinal por diarrea prolongada o enfermedad celíaca

- d) Infección severa en paciente con desnutrición calórico proteica previa
- e) Paciente crítico con reacción inflamatoria sistémica
- f) Ayuno mayor a 7 días con suero glucosado como único aporte (en paciente quirúrgico, por ejemplo).

La desnutrición de predominio proteico se caracteriza por una relativa conservación del tejido adiposo, moderado compromiso muscular, y compromiso importante de las proteínas viscerales, en especial la albúmina, y las proteínas transportadoras, anemia, hipocalcemia, hipofosfemia, hipomagnesemia, hipocalemia, hipoprotrombinemia, déficit de zinc y hierro, carencias vitamínicas y folato. Existe un grave compromiso de la inmunidad humoral y celular, y puede deteriorarse la capacidad de absorción intestinal.

Si la albúmina plasmática desciende a 2.5 mg./dL o menos, se agrega una alteración importante de la osmolaridad plasmática que lleva a producir un síndrome edematoso agudo, o "kwashiorkor". A causa de los trastornos electrolíticos y las pérdidas renales y digestivas aumentadas, el paciente puede estar hipovolémico a pesar del edema importante; al reponer volumen o albúmina, debe considerarse que el paciente puede tener una contractibilidad cardíaca deficiente, secundaria al déficit de proteínas y de algunos electrolitos. Frente a infecciones graves, puede evolucionar fácilmente a una falla multiorgánica, con trastornos de la coagulación, función hepática, etc.

### **1.10.2 Desnutrición secundaria**

Se le llama a la asociada a otras condiciones como infecciones crónicas, cardiopatías congénitas, alteraciones genéticas y la solución está en el tratamiento de la enfermedad de base. La nutrición parenteral puede ser usada en muchos casos, asociándose deficiencias nutricionales específicas y por lo tanto defectos inmunes, sin embargo en revisiones sistemáticas, no se observó efectos negativos sobre la respuesta inmune del intestino en pacientes con intestino corto. La obesidad es el principal desorden nutricional con efectos en el sistema inmune. La composición de los ácidos grasos tiene un efecto regulador en las células inmunes. Adolescentes con aumento de índice de masa corporal (IMC) tienen aumento de la producción de TNF- $\alpha$  y alteración linfocitaria. La alteración en la sensibilidad a la leptina y su señalización están implicadas en desordenes dietéticos. La desnutrición secundaria puede llevar a continuar la inmunodeficiencia pero a diferencia de la desnutrición calórico proteica no sólo puede tratarse con soporte nutricional.

### **1.10.3 Infección crónica: HIV**

La desnutrición es un problema significativo en niños infectados, Los estudios observan que la disminución de micronutrientes se relaciona con el curso de la infección por VIH y la respuesta inmune. Las intervenciones nutricionales restauran la absorción intestinal y aumentan los CD4. La deficiencia de selenio aumenta la virulencia del HIV y modifica la progresión de la enfermedad, la suplementación de selenio reduce los altos niveles de IL-8 y TNF- $\alpha$  asociado con el daño neurológico.

### **1.11 Inmunocompetencia en la DCP**

La relación entre el estado nutricional y el sistema inmune ha cobrado una importancia relevante en los últimos años, teniendo en cuenta que una amplia variedad de nutrientes esenciales para garantizar una adecuada salud, tienen un impacto sobre la inmunocompetencia del huésped (38).

Cualquier análisis de los efectos de las deficiencias nutricionales sobre la respuesta inmune tiene que ser entendida en el marco de dos aspectos fundamentales: en primer lugar, debe tenerse en cuenta la heterogeneidad y complejidad de las células inmunocompetentes, sus subpoblaciones, sus activadores como las citocinas e interferones, sus sistemas inductores-reguladores como el complemento y la necesaria interacción entre todos sus componentes, para que esa respuesta inmune sea fisiológicamente normal. Es necesario considerar además que la desnutrición es un síndrome complejo donde pueden coexistir deficiencias de diferente naturaleza simultáneamente. Por lo tanto, la afectación de diversos componentes del sistema inmune puede ser el resultado de una o más deficiencias nutricionales del individuo.

La disfunción inmunológica asociada con malnutrición ha sido denominada como síndrome de deficiencia inmune adquirida nutricionalmente (SDIAN). Este síndrome es visto frecuentemente en niños y ancianos y puede ser el punto de partida de enfermedades crónicas transmisibles y no transmisibles (39). Los niños tienen un riesgo elevado para desarrollar este síndrome. Los recién nacidos tienen un sistema inmune inmaduro y pocas proteínas de reserva. Es por ello que son altamente susceptibles a infecciones con un elevado costo nutricional, mediante la pérdida de nutrientes vitales. La combinación del SDIAN con infecciones, es la principal causa de muerte en el mundo (aproximadamente 10 millones de niños por año) (40).

La desnutrición calórico proteica por defecto es la causa más frecuente de la afectación del sistema inmune. Los resultados obtenidos hasta nuestros días en pacientes con malnutrición generalizada con diagnóstico de kwashiorkor, marasmo o como consecuencia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida provocada por el VIH, entre otras requieren de la valoración del estado funcional del sistema inmune (39-41). Los factores nutricionales inciden en el mantenimiento y desarrollo de la inmunocompetencia mediante múltiples vías y mecanismos.

### 1.11.1 DCP y tejidos linfoides

La desnutrición calórico proteica causa una atrofia generalizada desnutrición calórico proteica de los tejidos linfoides, fundamentalmente en niños. El timo, el bazo, las amígdalas, las placas de Peyer y los nódulos linfáticos se ven seriamente afectados con evidencias histológicas de atrofia significativa en las áreas de linfocitos T de estos tejidos. Por estas razones, es obvio que la inmunidad celular se encuentra seriamente comprometida (42).

La asociación entre desnutrición infantil y la atrofia tímica ha sido descritas desde hace aproximadamente 150 años (43), incluso antecede al descubrimiento de la función del timo en la respuesta inmune. Con el reconocimiento de la función de los linfocitos como células protagonistas en la inmunidad celular, se comenzó a considerar la malnutrición como enfermedad inmunosupresora con afectaciones tímicas, con consecuencias funcionales similares a los efectos de la timectomía neonatal. Este concepto fue tomado en cuenta por Smythe (44), quien lo denominó timectomía nutricional.

Ha sido descrita atrofia tímica significativa en niños desnutridos, siendo más significativa en pacientes con kwashiorkor que en pacientes con marasmo. Esta atrofia provoca una inmunidad celular deficiente, la cual es capaz de explicar el patrón de infecciones que se presenta en estos niños, con una tendencia a septicemias por patógenos gramnegativos, infecciones con herpes diseminado y una respuesta afebril a las infecciones, entre otras afectaciones (41,45).

Los cambios histológicos asociados más frecuentes son la disminución de linfocitos corticales, una pérdida de la diferenciación córtico-medular, infiltración de fibroblastos; en pacientes con kwashiorkor, los corpúsculos de Hassall's se reducen en número y aparecen con deformaciones y en ocasiones calcificaciones (42,46). La afectación de las células epiteliales del timo provoca una disminución en la síntesis de hormonas tímicas que inciden de forma negativa en la diferenciación y maduración de los linfocitos. Es de destacar que existen aspectos similares entre las afectaciones tímicas provocadas por la malnutrición y los cambios que ocurren asociados con la edad, con la consiguiente alteración de la función inmunológica (47).

Existen estudios en la literatura que han descrito una asociación directa entre la atrofia tímica y la deficiencia de zinc, teniendo en cuenta la función de este micronutriente en la síntesis de ácido nucleico y con ello en la proliferación celular (48). Recientemente se ha planteado que el zinc es el componente requerido para la activación de las hormonas tímicas, y para la activación de los linfocitos T en el organismo (49).

Se han descrito signos de atrofia en otros tejidos linfoides primarios y periféricos, entre los cuales se incluyen el bazo, los nódulos linfáticos, las amígdalas y las placas de Peyer. En algunos casos se ha observado una disminución significativa del peso del bazo relacionada con una disminución del área de tejido linfoide en amígdalas, apéndice y placas de Peyer, tanto en pacientes con kwashiorkor



como en marasmo (42). Beisel (39) describe que la forma más fácil y menos costosas de detectar la presencia clínica de amplias afectaciones del sistema inmune en niños desnutridos es la observación de las amígdalas. Estos órganos linfoides son de gran tamaño en estados adecuados de nutrición, pero no son detectables en niños con desnutrición calórico proteica severa. Es por ello que la presencia de atrofia de las amígdalas puede considerarse como un indicador de atrofia en otros tejidos linfoides como el timo, el bazo y los nódulos linfáticos.

La depleción del tejido linfoide se ha enmarcado fundamentalmente en las regiones T de estos tejidos, incluyendo linfocitos paracorticales y áreas periarteriolas, fundamentalmente en caso de kwashiorkor. Las regiones B muestran menos afectación en los tejidos evaluados, aunque conservan centros germinales ricos en linfocitos B, de manera general (42).

### **1.11.2 Respuesta inmune celular**

Se ha reconocido históricamente que la respuesta inmune mediada por células y la función de linfocitos T en procesos de desnutrición y en particular en procesos de desnutrición calórico proteica son las más afectadas (39, 41, 50).

La cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T usando anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de diferenciación CD3, CD4 y CD8, han mostrado una disminución o inversión de la proporción de linfocitos T auxiliares/supresores-citotóxicos, comparable con estados de inmunodeficiencia (42), aunque los resultados de los biomodelos recientes han planteado que la relación CD4/CD8 no refleja la atrofia de los órganos linfoides en condiciones de desnutrición calórico proteica severa (51).

La inmunidad celular se ha estudiado en estado de desnutrición calórico proteica mediante pruebas *in vivo* como la hipersensibilidad retardada cutánea. En niños desnutridos se ha mostrado una energía dérmica con pérdida de la hipersensibilidad retardada cutánea, que se ha asociado directamente con bajos niveles de proteínas totales séricas (39, 52).

Estudios *in vitro* han mostrado que la proliferación celular y la síntesis de ADN es reducida en la desnutrición calórico proteica. Esta ha sido considerada como la deficiencia más notable de la inmunidad celular en pacientes con desnutrición calórico proteica y se ha justificado con la presencia de factores inhibitorios en el suero de estos pacientes, así como con deficiencias de otros nutrientes como el zinc y el hierro, y de metabolitos como la transferrina, involucrados directamente con los procesos de proliferación celular (53).

La desnutrición calórico proteica provoca cambios morfológicos evidentes a nivel de tejidos en órganos linfoides primarios como el timo con afectaciones en la síntesis de hormonas, que muestran una atrofia significativa y con ello, afecciones en las regiones T de otros órganos linfoides periféricos.

Estas modificaciones morfológicas inciden en el proceso de maduración de linfocitos T maduros, aspecto que se ha asociado además con altos niveles de la enzima desoxinucleotidiltransferasa, considerada como un indicador del estado de maduración de las células T y con ello a un estado de inmunocompetencia deficiente (41, 54).

### **1.11.3 Respuesta inmune humoral**

Un análisis de la literatura publicada sugiere que la inmunidad humoral no parece afectarse en la desnutrición calórico proteica, en lo fundamental ante la presencia de antígenos timoindependientes. Esto puede relacionarse con el hecho de que los estudios morfológicos de tejidos linfoides periféricos de pacientes desnutridos, si bien han mostrado afectaciones severas relacionadas con la ontogenia de los linfocitos T, las regiones B han sido menos afectadas y aunque han mostrado disminuciones de tamaño, mantienen conservados los centros germinales ricos en linfocitos B (42).

Chandra y col. encontraron una disminución en la afinidad de anticuerpos en pacientes desnutridos, aspecto que pudiera explicar la presencia en ellos de inmunocomplejos circulantes (55). La IgA, disminuye generalmente después de la inmunización con vacunas virales, aspecto que repercute en el incremento de la frecuencia de septicemias observadas en niños desnutridos. La disminución de IgA, se ha asociado con un incremento del acoplamiento bacteriano a células epiteliales. Ambos aspectos sugieren afectaciones en la inmunidad de mucosas, lo que contribuye a la disminución de la función inmune y al incremento de la severidad de las infecciones (42, 56).

No obstante, si bien es cierto que la inmunidad humoral no es seriamente afectada en la desnutrición calórico proteica, basándose fundamentalmente en el mantenimiento de reservorios de células progenitoras de linfocitos B en tejidos relacionados, es importante tener en cuenta además que la deficiencia proteica y de aminoácidos esenciales pueden incidir negativamente en la síntesis de proteínas, incluyendo las vinculadas con los mecanismos inespecíficos y específicos de defensa del huésped (57, 58).

### **1.11.4 DCP y respuesta inespecífica**

Los mecanismos inespecíficos de protección del huésped incluyen la piel, las membranas mucosas, el interferón, la lisosima, el sistema del complemento y la fagocitosis. Los componentes del complemento y las células fagocíticas actúan conjuntamente con los mecanismos específicos inmunes y funcionan mediante la llamada inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral.

La desnutrición calórico proteica se ha asociado con una deficiente actividad del complemento hemolítico total y con reducidas concentraciones de los componentes C3, C5, factor B y la actividad hemolítica total, teniendo en cuenta que muchos de los se producen en el hígado, órgano seriamente

afectado en la deficiencia de proteínas, aspecto que pudiera asociarse con la detección de inmunocomplejos circulantes en estos pacientes.

El proceso de fagocitosis se ve desfavorecido en la desnutrición calórico proteica. La función del complemento como opsonina esencial, sufre afectaciones al disminuir algunos de sus componentes y el complemento hemolítico total en pacientes desnutridos. Aunque la ingestión de partículas por los fagocitos e muestra intacta de forma general, la destrucción de éstas no es eficiente debido a una actividad metabólica reducida de las vías intracelulares involucradas en el proceso de fagocitosis, por parte fundamental de los leucitos polimorfos nucleares. Por tanto, las afectaciones que muestra el proceso fagocítico en la desnutrición calórico proteica se relacionan con la quimiotaxis, el reconocimiento opsónico y una capacidad bactericida deficiente de las células fagocíticas, aspectos que aparecen descritos en la literatura (41, 52).

Dentro de los fagocitos mononucleares, las células de Kupffer, como población mayoritaria del hígado, actúan como un filtro y están involucrados en los mecanismos de defensa contra microorganismos invasivos y sustancias tóxicas que llegan a través de la circulación. Estudios recientes han encontrado una disfunción de la célula de Kupffer en ratones con DCP, aunque no se concluyeron aspectos relacionados con su capacidad proliferativa (59). Investigaciones posteriores mostraron una síntesis disminuida del factor estimulante de colonias que provoca una reducción significativa del número de células de Kupffer en ratones con desnutrición proteica, así como afectaciones en su proliferación, diferenciación y maduración. Se plantea una relación directa entre estos cambios que se producen en las células hepáticas y una compensación mediante el incremento de monocitos en el hígado, procedentes de sangre periférica, unido a un proceso acelerado de diferenciación en macrófagos, en condiciones de DCP (60).

Aunque existe poca información acerca de los mecanismos que constituyen las primeras líneas de defensa del organismo, se han detectado niveles disminuidos de lisosima en el plasma, saliva, lágrimas y otras secreciones, como consecuencia de su síntesis reducida y por su elevada excreción en la orina (41).

La deficiencia de cualquiera de los mecanismos de protección del organismo incide negativamente en primer lugar en la respuesta inflamatoria, lo que conlleva a un incremento o en la frecuencia de infecciones con bacterias, hongos, virus y parásitos.

#### **1.11.5 Inflamación en DCP**

El sistema inmune, la desnutrición y las enfermedades infecciosas forman parte de un “círculo vicioso” que puede conllevar a elevados índices de morbilidad y mortalidad en el mundo actual; el estado nutricional de un individuo no sólo tiene efectos apreciables sobre la inflamación y la respuesta

a enfermedades infecciosas, sino que tiene una función crucial sobre los mecanismos de homeostasis controlados por el sistema inmune. La activación de este sistema comprende la liberación de una variedad compleja de mediadores solubles celulares, entre los cuales se incluyen las inmunoglobulinas, el complemento, proteínas de fase aguda, entre otras, y las citocinas (61).

Es por ello que la respuesta inflamatoria conlleva un gasto metabólico que puede traducirse de manera general en la oxidación de grasas y carbohidratos, una movilización de aminoácidos del músculo esquelético al hígado para la síntesis de proteínas de fase aguda y alteraciones en el metabolismo de los micronutrientes. Estos cambios provocan la activación de las vías neuroendocrinas y de las citocinas (62, 63)

La citocinas proinflamatorias dentro de las cuales se encuentran la IL-1, IL-6 y el TNF median y modulan la activación del sistema inmune y dirigen los cambios metabólicos que se producen como consecuencia de la inflamación. El estímulo inflamatorio inicial induce la formación de una cascada de citocinas proinflamatorias y de otras citocinas. Como consecuencia de esta activación se produce la liberación de sustancias oxidantes como el óxido nítrico, el peróxido de hidrógeno y los radicales superóxidos, que a su vez incrementan la producción de citocinas (64).

Aunque todo este proceso forma parte de la respuesta fisiológica aguda, su extensión provocará una reducción de la función progresiva del sistema inmune, que sólo puede ser compensada mediante una óptima y balanceada nutrición. Es por ello que en casos de desnutrición no existe una respuesta inflamatoria adecuada y ella puede convertirse en un desgaste metabólico severo, con consecuencias graves para el organismo (65).

En relación con la IL-1 se ha planteado la incapacidad para sintetizarla en adultos y en biomodelos con DCP, así como en pacientes enfermos en estado crítico y con malnutrición crónica, de manera que se ha observado un incremento de la mortalidad (66).

Los monocitos de niños desnutridos severos no producen IL-1 *in vitro*, aspecto responsable de la inmunodeficiencia característica en estos niños, y la respuesta de leucocitos polimorfonucleares a esta citocina, se encuentra afectada o deficiente (67).

Bhaskaram y col. reportan niveles intracelulares y extracelulares de IL-1 sintetizadas por células mononucleares sanguíneas en niños con kwashiorkor y marasmo, y se ha detectado una afectación más significativa en los pacientes con kwashiorkor (68). Estas afectaciones de la IL-1 se han relacionado con la incapacidad de niños desnutridos para activar su reacción febril frente a agentes infecciosos, aspecto que incide en el diagnóstico de procesos sépticos en estos pacientes (69).

Muñoz y col. describieron una disminución de la producción de TNF- $\alpha$  en niños marásmicos. Existen trabajos anteriores que reportan una disminución de la síntesis de TNF- $\alpha$  en jóvenes con anorexia nerviosa (70).

La liberación y respuesta deficiente de IL-1 y TNF- $\alpha$  se considera uno de los mecanismos por los cuales la desnutrición favorece la afectación de la inmunocompetencia y por tanto, el incremento de la susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

#### **1.11.6 Inmunidad de mucosas en la DCP**

Recientemente se han incrementado los estudios que permiten comprobar la relevancia de la inmunidad de mucosas como un aspecto dentro de los mecanismos de defensa del huésped que a su vez se interrelaciona estrechamente con la susceptibilidad a determinados procesos infecciosos.

Las mucosas por medio de su composición y su estructura, le proporcionan a las células epiteliales la viscosidad y elasticidad necesarias para impedir el establecimiento de microorganismos patógenos y para favorecer los sitios de unión con la IgA, inmunoglobulina responsable de la inmunidad local. Sin embargo, estudios recientes describen el proceso de translocación bacteriana, que tiene como punto de partida, la mucosa intestinal, que bajo ciertas condiciones permite la adherencia de microorganismos invasivos que pueden ocasionar infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos (71). Estudios experimentales han planteado que no existe asociación directa entre la translocación bacteriana y la DCP (72), aunque en la actualidad se realizan investigaciones que relacionan la manipulación de elementos de la dieta con los niveles de IgA, con el objetivo de lograr una inmunidad de mucosas superior, no sólo en el tracto gastrointestinal, sino en el tracto respiratorio superior (73-76).

El estudio de las afectaciones de la DCP sobre la respuesta inmune permite lograr manipulación nutricional y puede ser un mecanismo para disminuir la susceptibilidad a las infecciones en ancianos, niños con bajo peso al nacer, en enfermedades crónicas y síndromes de mala absorción, entre otros.

#### **1.12 Citocinas y DCP en el niño**

La fase efectora de la inmunidad innata y específica o adquirida es mediada en gran parte por proteínas-hormonas llamadas citocinas. En la inmunidad innata las citocinas efectoras son producidas principalmente por fagocitos mononucleares mientras que la mayoría de las citocinas de inmunidad específica son producidas por los linfocitos T. Las células T producen algunas citocinas que sirven primariamente para regular el crecimiento y diferenciación de varias poblaciones de linfocitos y de este modo juegan un papel importante en la fase de activación de la respuesta inmune dependiente de células T.

Otras citocinas derivadas de las células T funcionan principalmente para activar y regular las células inflamatorias tales como fagocitos mononucleares, neutrófilos y eosinófilos. Estas citocinas

derivadas de las células T son las moléculas efectoras de la inmunidad mediada por células y también son responsables de la comunicación entre las células de los sistemas inmune e inflamatorio (77).

Esta información, que se remonta en sus primeros estudios hasta la década de los años cincuenta, ha tenido un avance espectacular desde la década de los años ochenta y noventa. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha han sido *in vitro* y por lo tanto aún se conoce con poca precisión cuál de las acciones biológicas de las citocinas es importante *in vivo* y cuáles efectos son necesarios para que ocurra una respuesta biológica en particular.

Experimentos diseñados para contestar tales preguntas están en proceso, utilizando moléculas de citocinas recombinantes, antagonistas específicos a citocinas, expresión de genes de citocinas en animales transgénicos y animales con ausencia de citocinas específicas a través de tecnología de manipulación genética. En segundo lugar, la disponibilidad de citocinas recombinantes y antagonistas específicos han abierto la posibilidad para los clínicos de modificar la respuesta inmune e inflamatoria de un modo predecible para influir en el curso de una enfermedad.

Por otra parte, existen resultados de algunos estudios relevantes sobre estas moléculas interesantes denominadas citocinas, su participación en la respuesta inmune e inflamatoria y la influencia recíproca que tiene la nutrición y la respuesta inmune, con especial énfasis en la DCP en el niño (78).

Desde la década de los años setenta se publicaron reportes sobre la producción de interferón en leucocitos cultivados en niños gravemente desnutridos y bien nutridos. Un reporte de Schlesinger y col. (79) mostró que los lactantes con marasmo producían una cantidad significativamente menor de interferón y sospecharon que este fenómeno podría influir en la frecuencia y gravedad de las infecciones virales en niños.

Años más tarde, Heresi y col. (80). Investigaron el factor de inhibición de la migración de leucocitos en lactantes con marasmo comparados con niños bien nutridos, sin encontrar diferencias entre ambos grupos. Salimanu y col. (81) midieron la actividad natural de las células asesinas y su respuesta al interferón en leucocitos de sangre periférica en niños con kwashiorkor, marasmo y recuperados de la desnutrición, observando depresión de la actividad natural de las células asesinas en niños desnutridos y niveles anormales de actividad en niños recuperados. La adición de interferón exógeno *in vitro* potenció la actividad natural de las células asesinas en niños bien nutridos y recuperados pero no tuvo impacto significativo en lactantes con marasmo, o incluso tuvo un efecto supresor en niños con kwashiorkor. El éxito del interferón exógeno en potenciar la actividad natural de las células asesinas sugirió que la recuperación nutricia corregía la respuesta celular dañada de niños desnutridos.

Posteriormente, Doherty y col. (82) evaluaron la producción de citocinas *in vitro* en 16 niños desnutridos antes y después del proceso de recuperación nutricia. Midieron los niveles del TNF $\alpha$  y la

IL-6 después de la estimulación con lipopolisacárido. La cantidad total de ambas citocinas fue significativamente menor después de 24 horas de incubación entre los niños desnutridos comparados con ellos mismos después de la recuperación nutricia. Concluyeron que la producción de citocinas *in vitro* se encontraba lesionada en niños con DCP.

En otro estudio publicado por Aslan y col. (83), se investigó la respuesta de IL-1 en suero y el factor estimulador de colonias de granulocitos-macófagos (GM-CSF) a la infección en niños desnutridos. Incluyeron 13 con kwashiorkor, 15 con marasmo y 12 controles. Encontraron que la fiebre, el porcentaje de neutrófilos y los niveles séricos de IL-1 y GM-CSF eran significativamente menores en niños con kwashiorkor que en los grupos con marasmo y eunutridos. Durante la infección aguda estos parámetros de inflamación estuvieron más elevados en niños con marasmo y eunutridos que en niños con kwashiorkor. En los niños con kwashiorkor se encontró correlación significativa entre los niveles séricos de albúmina e IL-1 ( $r$  0.992,  $P < 0.001$ ) y con GM-CSF ( $r$  0.730,  $P = 0.005$ ), hallazgo no observado en los otros dos grupos. Concluyeron que la respuesta sérica de IL-1 y GM-CSF durante la infección aguda se encontraba afectada en niños con kwashiorkor y que la terapia de recuperación nutricia restauraba la producción de estas citocinas.

Por su parte, en un estudio interesante, Sauerwein y col. (84) señalaron que aunque el edema era un signo típico del kwashiorkor, la fisiopatología del edema no había sido bien establecida. Consideraron que una de las anomalías encontradas en kwashiorkor era una concentración reducida en los niveles de antioxidantes y sugirieron que existía en estos pacientes una capacidad limitada para neutralizar los radicales libres que, como era ya sabido, producían daño tisular. También estudiaron las concentraciones plasmáticas de algunos mediadores de la cascada inflamatoria. Las concentraciones de IL-6, proteína C reactiva y los receptores solubles del TNF $\alpha$  (sTNFR-P55 y sTNFR-p75) eran mayores en niños con DCP, particularmente en aquellos con kwashiorkor, mientras que las concentraciones de los receptores solubles de IL-6 (sIL6R-gp80) y el receptor antagonista de IL-1 no eran significativamente diferentes de las encontradas en niños eunutridos. La concentración de IL-6, sTNFR-p55 y sTNFR-p75 fue mayor en pacientes con kwashiorkor, sin relación con la presencia de infección. El estado antioxidante determinado por las concentraciones plasmáticas de vitamina E y glutatión se encontraba significativamente reducido en pacientes con kwashiorkor. Concluyeron que sus datos sostenían la hipótesis de que los niños con desnutrición húmeda (edema) mostraban reactividad inflamatoria aumentada que podría contribuir a la formación del edema.

Lofty y col. (85) llevaron a cabo otro estudio para identificar la función de los monocitos y linfocitos y su importancia en la inmunocompetencia alterada de la DCP. Incluyeron 40 pacientes con DCP en edades de 5 a 20 meses y 20 sujetos normales de la misma edad y sexo. Determinaron biometría hemática completa, proteínas totales, C3, C4, función de monocitos fagocíticos y la producción *in vitro* de ambas IL-1 e IL-2 de células mononucleares cultivadas. La DCP se dividió en marasmo, marasmo-kwashiorkor y kwashiorkor. La fagocitosis de los monocitos, los componentes del

complemento y la producción *in vitro* de IL-1 e IL-2 se encontraron significativamente disminuidas en los tres grupos en comparación con los controles. Esta diferencia fue más obvia en los niños de kwashiorkor y marasmo-kwashiorkor. Además, las células mononucleares de pacientes infectados produjeron menos IL-1 e IL-2 aunque la cuenta leucocitaria total estuvo significativamente más aumentada que en pacientes no infectados, indicando una lesión celular más funcional que numérica. Concluyeron que ambas, la función monocítica y linfocítica, estaban dañadas en niños con DCP grave y que este daño funcional podría estar involucrado en la falla en la respuesta inmune específica y en mayor susceptibilidad a las infecciones.

Otro estudio realizado por Malave y col. (86) en Venezuela mostró que la PCR e IL-6 tuvieron incrementos similares en niños desnutridos y controles durante el proceso infeccioso. Además, observaron correlación positiva entre PCR e IL-6 en niños con infección clínica. Concluyeron que la capacidad para incrementar la producción de PCR e IL-6 durante la infección estaba preservada en ECP.

Recientemente, Giovambattista y col. (87) encontraron que la concentración sérica de TNF fue significativamente mayor en niños desnutridos que en controles, mientras que los niveles de cortisol y corticotropina no difirieron. Conversamente, la producción del TNF inducida por mitógenos en los leucitos en sangre periférica *in vitro* mostró una respuesta significativamente disminuida en niños desnutridos comparados con el grupo control. Además, observaron anormalidades con el TNF circulante e inducido por mitógenos en niños desnutridos aún en ausencia de concentraciones elevadas de cortisol sérico. Estas anormalidades podrían modificar potencialmente la respuesta inflamatoria inmune al estímulo de la infección en niños con DCP.

En un estudio más, realizado por Palacio y col. (88) en Chile, se midieron los niveles circulante de leptina, células no pro inflamatorias y células T ayudadoras tipo 1 (Th1), producción de citocinas en Th2 y la respuesta linfoproliferativa en 15 niños con desnutrición primaria y moderada, antes y después de una recuperación de 10% del peso; 16 niños sanos fueron controles. Observaron un déficit significativo en puntuación Z de los indicadores peso/edad, peso/talla, índice de masa corporal (IMC) y leptina circulante y factores de crecimiento en niños desnutridos ( $P < 0.05$ ). Este déficit se asoció con una supresión significativa de la respuesta linfoproliferativa Th1 y la producción de citocinas pro inflamatorias. Después de la ganancia de 10% de peso se observó un incremento significativo en el nivel de leptinas séricas junto con incremento en la actividad de Th1 revelado por un incremento en la producción de interferón gama y una supresión de la producción de IL-4. De manera concomitante, la respuesta linfoproliferativa se normalizó a los niveles del grupo control. Además, hubo un incremento significativo en la producción de IL-1 y TNF- $\alpha$  comparado con la producción observada al ingreso al estudio en el grupo desnutrido. Estos hallazgos sugirieron una asociación entre el incremento de leptinas y la recuperación inmunológica observada durante el proceso de recuperación nutricia en niños con desnutrición primaria moderada.



El estudio publicado por Amesty de Valbuena y col. (89), tuvo como propósito cuantificar las concentraciones séricas de IL-1<sup>a</sup>, IL-6 y TNF $\alpha$  en niños con diferentes grados desnutridos y en un grupo de niños eunutridos. Mostró que el grado de afección de estado nutricional en el niño influye sobre la respuesta de citocinas pro inflamatorias, ya que sólo el grupo de niños desnutridos graves (marasmo) mostró elevación significativa en los niveles de IL-1 e IL-6 en comparación con el resto de los grupos, mientras que el TNF $\alpha$  fue sólo significativamente mayor que el grupo control. Los resultados encontrados por estos autores evidencian la complejidad de la interacción entre los diferentes factores que actúan intrínsecamente en el niño con DCP grave.

Estos factores incluyen desde la acción deletérea de los radicales libres, al parecer relacionada con una disminución significativa en la concentración de antioxidantes a una respuesta ineficiente e inadecuada en la actividad linfoproliferativa estimulada por mitógenos durante la DCP grave, hasta una deficiencia de nutrientes específicos con influencia sobre la respuesta inmune que caracterizan a este síndrome pluricausal entre otros. Otros factores que hacen más complejo el problema de la respuesta inflamatoria e inmune en niños con DCP grave se relaciona con mecanismos biológicos de interacción entre la respuesta inmune, la infección, el estrés oxidativo y la acción de hormonas como son los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1), la insulina y la leptina, especialmente alterados en los tipos graves de DCP como el kwashiorkor y el marasmo-kwashiorkor y que mejoran significativamente, igual que la respuesta inmune, durante la recuperación nutricional.

Es evidente que esta área de investigaciones fascinante requerirá de herramientas y modelos de investigación que integren simultáneamente a la inmunología, endocrinología, biología molecular, genética, epidemiología y nutriología para responder adecuadamente las nuevas preguntas de investigación que plantea la interacción entre citocinas, nutrientes, hormonas, antígenos y los sistemas inmune e inflamatorio.

### **1.13 La desnutrición infantil como un problema de salud**

Aunque una mala nutrición produce estragos entre la población en general, sus efectos resultan más nocivos cuando se padece en los primeros años de vida. Los niños en edades tempranas se encuentran en una etapa crítica de crecimiento y maduración que se puede ver gravemente alterada por el déficit nutricional. Una infancia desnutrida resulta más adelante en la vida en múltiples desventajas tanto físicas como cognitivas (90) y aumenta la propensión a enfermedades crónicas e incapacidades (91). Así, el desarrollo de las capacidades de las personas requiere de una condición nutricional adecuada desde la infancia temprana.

A pesar de los grandes avances que se han logrado en la prevención y tratamiento de la desnutrición calórico proteica, ésta sigue constituyendo un problema de salud en el mundo y en

particular en América. La Organización Panamericana de la Salud estima que entre el 10 y el 20% de los niños la padecen de manera moderada o severa, según el peso para la edad (92).

### **1.13.1 La desnutrición en el mundo**

Aproximadamente 39% de los niños preescolares del planeta sufren algún grado de desnutrición (93) y esta patología representa la principal causa de muerte en menores de 5 años (94); asimismo se estima que 150 millones de niños presentan déficit de peso y 20 millones de ellos sufren desnutrición grave (95). Durante las últimas décadas en los países desarrollados se han experimentado avances considerables en la prevención de la desnutrición, lo cual se refleja en un descenso de las tasas de mortalidad en lactantes y preescolares. Esta disminución de niños desnutridos es el resultado de la aplicación de programas de educación, salud e intervenciones nutricionales cuya cobertura incluye a los segmentos de la población que se encuentran en mayor riesgo de padecer esta entidad (lactantes, mujeres embarazadas y lactando) (96-98), estos programas también se han implementado en los países en vías de desarrollo y han logrado disminuir la incidencia de desnutrición en niños de 1 a 4 años, pero a medida que las condiciones de vida del país mejoran, se observa un desplazamiento de la desnutrición hacia edades más tempranas, lo cual se demuestra al observar que de los 21 millones de niños que nacen anualmente con bajo peso en los países en vías de desarrollo, 16 millones son pequeños para la edad gestacional lo que indican insuficiencia en el crecimiento fetal (99).

### **1.13.2 La desnutrición en México**

México es un país considerado como de ingreso medio, con transición epidemiológica de tipo dilatado donde coexisten enfermedades propias del subdesarrollo con aquellas que son características de los países desarrollados (100, 101). En nuestro país las deficiencias nutricias ocupan el quinto lugar como causa de muerte en la población infantil (102), sin embargo estas cifras deben de ser consideradas con reserva debido al subregistro existente (103), por lo que el Banco Mundial de Desarrollo y la UNICEF calculan, en forma conservadora, que la mortalidad secundaria a desnutrición puede ser de casi el doble de lo que se reporta (104).

La incidencia de la desnutrición en México cedió terreno en los últimos años del siglo XX. Entre 1988 y 1999, la proporción de niños desnutridos disminuyó en una quinta parte. Sin embargo, esta reducción es menos notable cuando se compara con la situación registrada en otras regiones: Sudamérica, en su conjunto, mostró durante el mismo periodo una disminución de más de 45% en la prevalencia de desmedro. Esta diferencia es aún más significativa cuando se considera que los cambios en la desnutrición en Sudamérica ocurren a partir de niveles sustancialmente inferiores a los que presentaba México a principios de la década de 1990 (105).

	1990	2000	Variación (%)
México	22.8	17.8	21.9
Sudamérica	17.2	9.3	45.9
Países en desarrollo	39.8	32.5	18.3

Tabla 6. Tendencias internacionales en la prevalencia de desmedro (baja talla para su edad) en menores de 5 años (porcentajes) (106).

De acuerdo a estudios realizados por Frenk (citado por Cravioto y col.) (107) se estima que sólo el 22% de los niños que viven en áreas rurales y el 40% de los que habitan en áreas urbanas cursan con un peso normal para su edad.

La desnutrición aguda tiene mayor prevalencia en las Zonas del Golfo, del Pacífico Sur y del Sureste en donde entre los habitantes de menos de 5 años alcanza tasas que varían de 15.9 a 17.9 x 100,000 en comunidades rurales con menos de 5,000 habitantes (108, 109), además, en estas poblaciones, los índices de mortalidad en menores de un año son de 5 a 15 veces más altos y 10 a 30 veces más elevados en el grupo de edad de uno a cuatro años cuando se comparan con poblaciones en donde la desnutrición es menos frecuente (107). A pesar de los esfuerzos gubernamentales las tasas de mortalidad infantil por desnutrición se incrementaron de 40 a 118 por 100,000 habitantes y de 3.5 a 16.4 por 100,000 habitantes en el grupo de preescolares (109). Los problemas nutricios, como puede verse, se han acentuado debido principalmente a la crisis económica y se ha perpetuado por diversas razones entre las que destacan:

1. La accesibilidad a la atención a la salud
2. El financiamiento
3. La calidad de la atención en salud.

### **1.13.3 Accesibilidad a la atención a la salud**

En el territorio nacional la distribución poblacional es muy irregular ya que existen 155 mil pequeñas localidades con menos de 5000 habitantes, en donde viven aproximadamente 28 millones de individuos; otros 24 millones habitan en las cuatro principales áreas metropolitanas (Monterrey, México, Guadalajara y Puebla) y el resto se encuentran dispersos en todo el país, lo que hace difícil o casi imposible, sobre todo para los que habitan en las comunidades pequeñas, el acceso a los servicios de salud. Cabe mencionar que existen varios programas gubernamentales con los cuales se ha tratado de llevar atención oportuna a los sitios más desprotegidos de nuestra población, pero aún falta bastante camino por recorrer. Por otro lado la fragmentación de la estructura agraria ocasionó que de 1970 a 1990 casi se duplicara el número de ejidatarios, lo que provoca que las unidades de producción sólo en

raras ocasiones logren un ingreso suficiente para el sustento familiar (110); se ha demostrado que el 84% de los campesinos mexicanos tienen ingresos anuales de menos de 400 dólares y 10 millones de ellos subsisten con menos de 100 dólares anuales lo que provoca una fuerte presión social para que el individuo abandone en forma temprana la escuela para ocuparse en un trabajo mal remunerado, hecho que a su vez provoca que un gran número de individuos con edad no óptima para ello funcionen como adultos no sólo en el ámbito laboral sino que además se incrementa la posibilidad de matrimonios con compañeros de igual o menor edad y educación formal, multiplicándose de esta manera el riesgo de tener descendientes con pocas oportunidades de cuidado y nutrición adecuados (107). Por otro lado el pensamiento tradicional mágico religioso que prevalece en estas comunidades origina que la ingestión de alimentos, por la mujer embarazada, se vea afectado por costumbres profundamente arraigadas que lesionan aún más el ya precario estado nutricional de estas mujeres y más grave aún es que como casi todas tienen el mismo problema, éste no sea detectado como anormal por la comunidad lo que evita que busquen atención médica oportuna. Un hecho semejante ocurre durante la lactancia, período durante el cual tampoco mejoran su dieta ni disminuyen su actividad diaria, lo que condiciona en la mayoría de los casos un crecimiento insuficiente del producto debido entre otras cosas a que la producción láctea de estas señoras permite un adecuado aporte nutricional cuando mucho hasta los tres meses de edad (99-104, 108-122).

Por último la migración masiva de la población rural hacia las ciudades ha originado la formación de cinturones de pobreza alrededor de las grandes urbes; en donde existe un inadecuado suministro de agua potable y una deficiente eliminación de excretas por lo que viven en condiciones de sanidad poco satisfactorias (96) con lo que se perpetúan las enfermedades propias de la pobreza, entre las que destacan las infecciones y la desnutrición.

#### **1.13.4 El financiamiento**

La crisis ha obligado al Gobierno a tratar de hacer más cosas con menos recursos, por lo que existe una disminución considerable del porcentaje del producto interno bruto (PIB) que se emplea para la atención de la salud; esto a su vez se refleja en mayor desempleo o subempleo de los médicos y del personal de salud del país lo que puede causar mayores desigualdades sociales en vez de corregirlas (123).

También existe inequidad en cuanto a que existen dos tipos de intervención gubernamental en cuestiones de salud, la asistencia pública para los campesinos y los pobres del sector urbano y el seguro social para los trabajadores asalariados (111), lo que crea una diferencia marcada en el tipo y oportunidad de atención al dividir a la población en dos grupos de acuerdo a la derechohabencia. Por último se estimula poco la participación del sector privado en los servicios médicos no sustantivos, lo que impide que se empleen mayores recursos al mejoramiento de la cantidad y calidad de los servicios

sustantivos en las instituciones públicas de salud (112). Asimismo los apoyos alimenticios para los grupos en riesgo de padecer desnutrición, como desayunos escolares, en ocasiones dejen parte de su ración sin consumir por lo que el costo beneficio de estas acciones no es el óptimo (113).

#### **1.13.5 Calidad de la atención en salud**

Los programas de actividades específicas de nutrición se concentran en la estrategia de la atención primaria y poco sobre la participación activa de la comunidad (114, 115) por lo que se perpetúa el problema de la desnutrición en la población. Asimismo existe poco conocimiento entre los planificadores en salud sobre nutrición; de los nutricionistas sobre planeación; de ambos grupos sobre aspectos de sociología, economía y ciencias políticas debido a lo cual las acciones se realizan en forma dispersa en vez de conjunta (116) condenando a que tengan un efecto apenas perceptible a muchos de los programas que en otras circunstancias podrían tener un impacto importante sobre el problema. Por otro lado se da mayor énfasis a las acciones para mejorar la supervivencia de los niños menores de un año, con lo que se disminuye la atención de los preescolares (117), en quienes existe suficiente evidencia para sustentar que los incrementos de la mortalidad son una respuesta a las limitaciones dietéticas forzadas por la crisis (118).

De igual manera la calidad de la atención se ve afectada por los problemas económicos que padecen los prestadores de servicios de salud, ya que el médico, por ejemplo, tiene que trabajar en más de un lugar y con exceso de trabajo originado por los recortes presupuestales, lo que se traduce en una atención de calidad inferior a la que se pretende otorgar ya que una persona no rinde lo mismo si trabaja una, que dos jornadas.

Por otro lado cuando un niño ingresa al hospital con desnutrición no grave, ésta es atendida en forma inadecuada, debido probablemente a que se considera una situación de orden secundario y se le da mayor importancia a los padecimientos que ponen en peligro su vida en forma inmediata (119), y si a esto se agrega que permanecen por tiempo prolongado en ayuno (120), se provoca que el 73% de niños que egresan del hospital tengan un peso inferior al que tenían en el momento de su ingreso (121).

Cabe mencionar que en muchos lugares tampoco se utilizan todos los recursos al alcance de los prestadores de salud para diagnosticar la desnutrición en forma temprana; un ejemplo de ello es la Cartilla Nacional de Vacunación que en la parte posterior cuenta con cuatro columnas (fecha, edad, peso y estatura) además de una tabla de valores mínimos y máximos normales de acuerdo a la edad y sexo además de una leyenda en donde se invita a la población a que en caso de que su hijo(a) se encuentre fuera de estos valores acuda de inmediato al médico. Desafortunadamente muy pocos padres y prestadores de servicios de salud utilizan este valioso instrumento dado que no es obligatorio su llenado y presentación, como lo es llevar todos los sellos del esquema de vacunación, en la parte frontal de la cartilla, para ingresar a la escuela.

Otra deficiencia importante es que no se estudia a los hermanos(as) del paciente desnutrido a pesar de que tienen un riesgo muy alto de presentar también desnutrición (114), con lo que se pierde la oportunidad de llevar una evaluación dinámica y completa del estado de nutrición de estos niños durante la etapa en que tiene mayor riesgo de padecer el problema.

Por último existe una capacidad limitada en los prestadores de servicios para derivar al paciente con desnutrición al nivel en donde se le solucione su problema, así como un inadecuado sistema de contrarreferencia principalmente en lugares con poca población, recursos de salud, saneamiento y comunicación (114), con lo que se perpetúa el ciclo y los niños sólo tienen dos caminos o mueren o se convierte en enanos nutricionales.

En conclusión, todo lo anteriormente expuesto origina inequidad, falta de accesibilidad, financiamiento inadecuado para la salud, atención poco oportuna y mala calidad de atención para la población, detección poco oportuna e ineficientes mecanismos de referencia y contrarreferencia de pacientes que hacen que se perpetúe la desnutrición. Es necesario fomentar la investigación tanto en nutrición, como en sistemas de salud para poder resolver en conjunto con las personas que toman las decisiones las mejores estrategia para atacar en forma frontal y organizada este problema que tantas muertes y secuelas produce.

#### **1.14 Desnutrición infantil y pobreza en México**

En un trabajo publicado en el año 2003 en la nueva serie de Cuadernos de Desarrollo Humano de la Secretaría de Desarrollo Social de los Estados Unidos Mexicanos (105) a partir de la Encuesta Nacional de nutrición de 1999 se aportan los datos más recientes disponibles sobre nutrición en el país. Estos datos indican la situación existente al final de la década pasada y permiten estudiar la vinculación de diversos factores con la desnutrición en años recientes. Los autores eligieron utilizar como medida de la condición nutricional de los niños la razón de talla para la edad porque refleja la condición nutricional a lo largo de la vida del niño y revela la presencia de desnutrición que responde a deficiencias alimentarias persistentes y/o vulnerabilidad a enfermedades: la baja talla para la edad (desmedro) pone de manifiesto una condición de desnutrición prolongada (124).

En dicho trabajo se estudió el problema de la desnutrición infantil en México y su relación con la condición de pobreza de los hogares. El análisis se centra en tres ámbitos:

- a. La falta de recursos económicos suficientes para contar con los alimentos necesarios para cubrir una dieta adecuada;
- b. La falta de acceso a productos alimentarios (abasto), que tiene que ver con dificultades de disponibilidad en determinados ámbitos geográficos por aislamiento y dispersión de comunidades (lejanía a centros de distribución), y

- c. La falta de información sobre nutrición, salud e higiene. La presencia de desnutrición se relaciona con la ingesta inadecuada de nutrientes, su absorción deficiente, o su pérdida sistemática anormal como consecuencia de episodios de enfermedad (como diarreas o infecciones respiratorias).

Los resultados obtenidos concluyen que:

1. La desnutrición infantil se concentra principalmente en los hogares más pobres.
2. La incidencia de enfermedades diarreicas y respiratorias es más pronunciada en los hogares en condición de pobreza, pero las diferencias son menos marcadas que en la presencia de desnutrición.
3. La desnutrición infantil se presenta con mayor intensidad en los hogares que residen en localidades rurales.
4. La desnutrición infantil es mayor cuando falta información en los hogares.

#### **1.14.1 Factores que inciden en la desnutrición**

- 1) Los niños que viven en hogares en situación de pobreza alimentaria tienen un muy significativo incremento en el riesgo de estar desnutridos en comparación con los niños en hogares no pobres. El riesgo disminuye, pero sigue siendo importante, entre los hogares en situación de pobreza de capacidades. Los niños de hogares en pobreza de patrimonio no tienen un riesgo incrementado de desmedro con respecto a los hogares no pobres.
- 2) Los niños que residen en las localidades rurales más pequeñas (menores de 1,500 habitantes) tienen una mayor probabilidad de experimentar desnutrición que los niños de localidades urbanas.
- 3) La condición de hablante de lengua indígena de la madre incrementa la probabilidad de desnutrición de los menores de manera importante.
- 4) Los hijos de madres sin escolaridad formal o que no terminaron la primaria tienen un mayor riesgo de estar desnutridos en comparación con los hijos de madres que cursaron más allá de la secundaria.
- 5) A mayor número de niños en el hogar (menores de cinco años o entre cinco y once años) se incrementa el riesgo de estar desnutrido.
- 6) No se observaron diferencias en el riesgo de presentar desmedro entre niñas y niños.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existe una relación estrecha entre el estado nutricional, el funcionamiento inmunitario y la susceptibilidad a las infecciones. La desnutrición es la causa más frecuente de inmunodeficiencia infantil en el mundo. La evaluación del estado inmunitario incluye la medición de citocinas. En el laboratorio de biología celular y citometría de flujo de la UAM-I se estudia la evaluación de daño al DNA y su relación con la respuesta inmune en organismos infectados y desnutridos, cuando se intentó algunas veces llevar a cabo la detección intracelular de citocinas no se tuvo éxito. A partir de la situación anterior surgió la necesidad de diseñar un procedimiento específico para el laboratorio que diera respuesta a las siguientes interrogantes: ¿Qué cantidad de sangre total debía utilizarse en cada prueba?, ¿sería necesario diluir la sangre y de ser así en qué proporción?, ¿cuánto tiempo debía incubarse la muestra con un mitógeno para lograr el 90% de activación celular?, ¿qué volumen de anticuerpo debía agregarse? ¿cómo debían manejarse los controles de activación y de permeabilización?. Se visualizó entonces que serían necesarios varios ensayos y que para la estandarización sería mejor trabajar con muestras de sangre de personas no enfermas.



### 3. OBJETIVOS

- 1) Estandarizar un método para detección intracelular de citocinas por citometría de flujo con el estuche de reactivos BDIS FASTIMMUNE™ Cytokine System y el citómetro de flujo FACScan de Becton Dickinson en el Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa .
- 2) Determinar los valores de la respuesta específica *in vitro* de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  en jóvenes mexicanos no enfermos.
- 3) Capacitación personal en la tecnología de la citometría de flujo.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si se logra establecer un método estandarizado para la detección intracelular de citocinas entonces podrá ser utilizado para diversas líneas de investigación en el laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo del área de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la División CBS de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa.

## **5. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Hombres y mujeres no enfermos cuya edad se encuentre en el intervalo de 20 a 40 años.

## **6. CRITERIOS DE SELECCIÓN**

### **6.1 Criterios de inclusión**

- a) Sexo indistinto.
- b) Edad comprendida entre los 20 y 40 años.
- c) Peso normal, de acuerdo a su índice de masa corporal (IMC), ver tabla 9.
- d) No fumador.
- e) No alcohólico.
- f) No estar en tratamiento médico.
- g) No haber padecido enfermedad infecciosa, al menos 3 meses antes.
- h) No haber recibido transfusión sanguínea durante los 3 meses previos a la donación de la muestra.

#### **6.1.1 Índice de masa corporal (IMC)**

El sobrepeso se define como un aumento mayor de lo normal del peso corporal en relación con la estatura. Se suele medir con el índice de Quételet o Índice de Masa Corporal (IMC), que es el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la estatura en metros ( $IMC = \text{peso}/\text{estatura}^2$ ). La obesidad se define como un porcentaje anormalmente elevado de grasa corporal. En los varones, la grasa corporal normal representa el 12-20 por ciento del peso corporal. En las mujeres normales, representa el 20-30 por ciento del peso corporal (125).

$$IMC = \frac{PC}{Est^2}$$

#000000

IMC = Índice de Masa Corporal (kg/m<sup>2</sup>)

PC = Peso Corporal (kg)

Est = Estatura (metros)

CLASIFICACIÓN DE SOBREPESO Y OBESIDAD POR IMC		
	Obesidad Clase	IMC (kg/m <sup>2</sup> )
Bajo Peso		<18.5
Normal		18.5 – 24.9
Sobrepeso		25.0 – 29.9
Obesidad	I	30.0 – 34.9
	II	35.0 – 39.9
Obesidad Extrema	III	≥40

Tabla 7. Guía clínica para la identificación, evaluación y tratamiento de sobrepeso y obesidad en adultos (127).

## 6.2 Criterios de exclusión

- a) Ayuno menor a 8 horas.

## 6.3 Criterios de eliminación

- a) Muestra lipémica.
- b) Muestra hemolisada

## 7. MATERIAL Y MÉTODO

A continuación se presentan las recomendaciones y el diagrama de flujo generalizados de las etapas del procedimiento para llevar a cabo la detección intracelular de citocinas por citometría de flujo proporcionados por la compañía proveedora del citómetro de flujo y sus insumos.

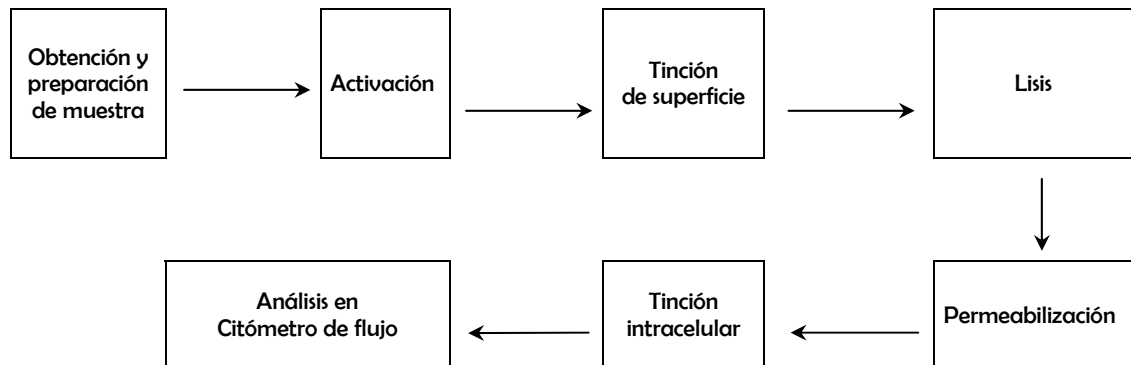


Figura 4. Diagrama de flujo del procedimiento general para la detección intracelular de citocinas.

Becton Dickinson (5) expone que este procedimiento está diseñado para diversas aplicaciones y con algunas consideraciones especiales para minimizar posibles problemas. Aunque está diseñado para un ensayo rápido requieren de particular atención el paso de la activación y los reactivos, los cuales deben ser preparados, almacenados y usados cuidadosamente.

Asimismo indica que la activación exitosa es esencial para lograr un resultado significativo. Por lo tanto es importante coleccionar y preparar las células para activación sin introducir agentes que interfieran con el proceso natural de activación. Hay que evitar los anticoagulantes quelantes de calcio, tales como ACD y EDTA, ya que restringen la respuesta de activación dependiente de calcio. Por otro lado, los lipopolisacáridos, un contaminante común de reactivos biológicos, es un potente activador celular y puede conducir a resultados confusos.

Después de ensayar varias veces el método y analizar los resultados obtenidos en las gráficas de puntos se hicieron modificaciones de volumen de muestra, dilución y tiempo de incubación hasta obtener resultados satisfactorios de los controles de activación y permeabilización, cumpliendo así el objetivo de estandarizar el procedimiento a detalle y en forma específica para la detección intracelular de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  por citometría de flujo, partiendo de la metodología general proporcionada por Becton Dickinson.

El material y equipo necesarios para este procedimiento se enlistan a continuación.

- 1) Estuche de reactivos (kit) *BDIS FASTIMMUNE™ Cytokine System*, (figura 5).
- 2) Citómetro de flujo FACScan® de Becton Dickinson (figura 6).
- 3) Sangre venosa heparinizada (1000 µL).
- 4) Tubos de ensayo desechables de poliestireno Falcon de 12 x 75 mm con tapa (Becton Dickinson Labware Catalog No. 2058), o equivalente.
- 5) Incubadora a 37° C con 7% de CO<sub>2</sub>, marca Lab-Line Instruments, modelo Imperial II CO<sub>2</sub>.
- 6) Agitador vortex.
- 7) Centrífuga refrigerada marca Beckman, modelo GS-15R, con velocidad máxima de 4,800 rpm.
- 8) Micropipetas automáticas.
- 9) Reactivos, ver tabla 8.

Nombre	Abreviatura	Distribuidor	# de catálogo
Phorbol 12-miristato 13 acetato	PMA	Sigma	P-8139
Ionicina		Sigma	I-0634
Dimetil sulfóxido	DMSO		
Brefeldina A	BFA	Sigma	B-7651
Etanol	Et-OH		
Solución buffer de fosfatos	PBS		
Paraformaldehído	PFA		
Medio de cultivo RPMI-1640 sin L-glutamina	RPMI-1640	BioWhittaker	12-167F
Azida de sodio	NaN <sub>3</sub>		
Solución de lisis FACS 10X		BDIS	349202
Solución permeabilizante FACS 10X			

Tabla 8. Reactivos utilizados para la detección intracelular de citocinas por CMF.

- 10) Anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos para tinción inmunofenotípica, ver tabla 9.

Anticuerpos monoclonales conjugados	# de catálogo BDIS
CD3-PerCP	347344
$\gamma_{2a}$ -FITC/ $\gamma_1$ -PE/CD3-PerCP	340458
CD69-PE/CD3-PerCP	347344
IL-2-FITC/CD69-PE	340448
IFN $\gamma$ -FITC/IL4-PE	340456

Tabla 9. Anticuerpos para la detección intracelular de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$ .



Figura 5. Estuche de reactivos (kit) *BDIS FASTIMMUNE™ Cytokine System*.



Figura 6. Citómetro de flujo FACScan® de Becton Dickinson.



## **7.1 Preparación de la muestra**

- 1) Colectar aproximadamente 1.5 mL de sangre venosa en una jeringa estéril con aguja previamente heparinizada.
- 2) Depositarlos lentamente y por las paredes en un tubo de poliestireno.
- 3) Medir con pipeta automática 1000  $\mu$ L y pasarlos a otro tubo de poliestireno.
- 4) Agregar 2000  $\mu$ L de RPMI sin L-glutamina (dilución 1:2).
- 5) Agitar en un vórtex suavemente.

## **7.2 Preparación de los reactivos**

### **7.2.1 Solución buffer de lavado de PBS con BSA 0.5% y $\text{NaN}_3$ 0.1% a 4° C**

- 1) Pesar 0.1 g de azida de sodio
- 2) Pesar 0.5 g de BSA
- 3) Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con solución de PBS.
- 4) Almacenar la solución a 4° C.

### **7.2.2 Solución fijadora de paraformaldehído al 1% (PFA) en PBS**

- 1) Pesar 0.1 g de azida de sodio.
- 2) Pesar 1.0 g de paraformaldehído.
- 3) Transferirlos a un matraz Erlenmeyer de 125 mL y agregar aproximadamente 80 mL de PBS.
- 4) Calentar bajo campana a 70°C hasta que se disuelva por completo (aproximadamente 30 minutos).
- 5) Enfriar la solución a temperatura ambiente y completar aforo en un matraz volumétrico de 100 mililitros.
- 6) Ajustar pH a 7.4 utilizando NaOH 0.1 M o HCl 0.1 M como sea necesario.
- 7) Almacenar a 4° C.

### **7.2.3 Solución de lisis FACS 10X**

- 1) Diluir 1:10 en agua desionizada.

### **7.2.4 Solución de permeabilización FACS 10X**

- 1) Diluir 1:10 en agua desionizada.

### 7.2.5 PMA (phorbol 12-myristate 13 acetato)

- 1) Reconstituir en DMSO a 0.1 mg/mL.
- 2) Almacenar alícuotas de 100  $\mu$ L a  $-20^{\circ}$  C, no recongelarlas después de que se hayan utilizado a temperatura ambiente.
- 3) Diluir 1:100, 10  $\mu$ L de stock con 990  $\mu$ L de PBS estéril sin azida de sodio para cada experimento.

### 7.2.6 Ionomicina

- 1) Reconstituir en etanol a 0.5 mg/mL
- 2) Almacenar a  $-20^{\circ}$  C
- 3) Diluir 1:10, 10  $\mu$ L de stock con 90  $\mu$ L de PBS estéril sin azida de sodio para cada experimento.

### 7.2.7 Brefeldina A

- 1) Reconstituir en DMSO a 5 mg/mL.
- 2) Almacenar alícuotas de 10  $\mu$ L a  $-20^{\circ}$  C, no recongelarlas después de utilizarlas a temperatura ambiente.
- 3) Diluir 10  $\mu$ L de stock con 90  $\mu$ L de PBS estéril sin azida de sodio para cada experimento (dilución 1:10).

## 7.3 Muestra activada y controles

Es muy recomendable utilizar sangre normal. Cuando se tenga plena confianza en la metodología se pueden eliminar los controles de activación y de tinción intracelular. Sin embargo, siempre se deben correr controles de isotipo para cada muestra en el ensayo, ver en figura 7 y tabla 10 la preparación específica de cada uno

### 7.3.1 Control no estimulado

Es utilizado para ensayar el nivel de síntesis de citocina residual de la activación *in vivo*. Este control se debe correr para todas las muestra. Como el nombre implica, el control es preparado por incubación de la sangre durante el paso de la activación con 10  $\mu$ g/mL de BFA, pero sin un estímulo.

### **7.3.2 Control isotipo**

Los anticuerpos control conjugados con fluorocromos se utilizan para detectar enlaces no específicos a células debidas a las clases de anticuerpos monoclonales de ratones.

### **7.3.3 Control de activación**

Para evaluar si la activación ha sido realizada se debe utilizar expresión de superficie CD69. Si el nivel de CD69 no es el esperado indicará que hay problema con el paso de la activación. Específicamente uno de los reactivos puede estar inactivo, caducado o mal preparado; o un solvente puede estar contaminado.

- 1) Activar una alícuota de sangre con PMA, no agregar la BFA.

NOTA: Los agentes anti-secretorios como BFA evitan la expresión de superficie de CD69 y deben eliminarse para permitir la expresión de superficie y la detección.

- 2) Teñir la superficie sólo con CD69-PE/CD3-PerCP. Omitir el paso de la permeabilización y la tinción intracelular del procedimiento.
- 3) La tinción de superficie por CD69 debe ser mayor del 90% positivo.

### **7.3.4 Control de tinción intracelular**

- 1) Activar una alícuota de sangre con PMA e ionomicina en presencia de BFA.
- 2) Omitir el paso de tinción de superficie. Teñir sólo con CD69-PE/CD3-PerCP.

La tinción intracelular de CD69 debe ser mayor del 90% positivo.

Los resultados de este control en conjunción con los resultados del control de activación detectan con precisión si la permeabilización y tinción intracelular han sido bien realizadas. Si el control de activación es mayor del 90% positivo pero un nivel comparable de CD69 no es detectado por tinción intracelular, indicará que hay un problema con la permeabilización o con el paso de tinción intracelular de cada ensayo.

## **7.4 Tinción**

Los anticuerpos anticitocinas pueden usarse en conjunción con anticuerpos contra antígenos de superficie celular con la finalidad de estudiar poblaciones de linfocitos específicas. CD3-PerCP, CD4-

FITC y CD8-FITC son comúnmente usados por los laboratorios de investigación de BDIS para la tinción de linfocitos T.

Para estimular todos los epitopos después de la permeabilización, adicionar todos los anticuerpos conjugados al mismo tiempo.

#### **7.4.1 Tinción de superficie**

- 1) Agregar 20  $\mu$ L de reactivo para tinción de superficie a los tubos.
- 2) Agregar 100  $\mu$ L de PMA diluido + 100  $\mu$ L de sangre diluida.
- 3) Mezclar bien e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

#### **7.5 Permeabilización y tinción intracelular**

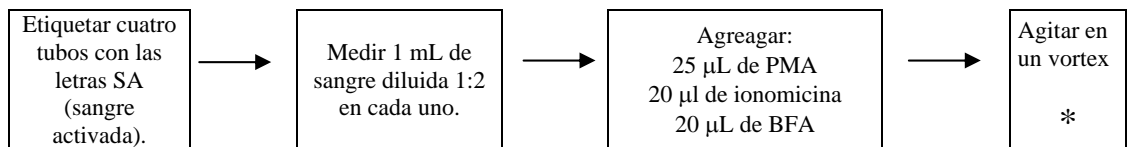
- 1) Agregar 2 mL de solución FACS 1X, incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente añadir solución de lisis FACS 1X para fijar la superficie de los epitopos y optimizar el proceso de permeabilización.
- 2) Centrifugar por 5 minutos a 500 s g y eliminar el sobrenadante evitando destruir la perla formada en el fondo. Agregar 500  $\mu$ L de solución FACS 1X, mezclar bien e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
- 3) Agregar 2 a 3 mL de buffer de lavado, centrifugar por 5 minutos a 500 x g y eliminar el sobrenadante.
- 4) Agregar los anticuerpos monoclonales anticitocina, mezclar bien e incubar por 3 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
- 5) Agregar 2 o 3 mL de buffer de lavado, centrifugar por 5 minutos a 500 x g, eliminar el sobrenadante y agregar 500  $\mu$ L de PFA 1%.
- 6) Las muestras pueden almacenarse dentro de las 24 horas previas a la adquisición a 4° C en la oscuridad.

#### **7.6 Análisis de muestras**

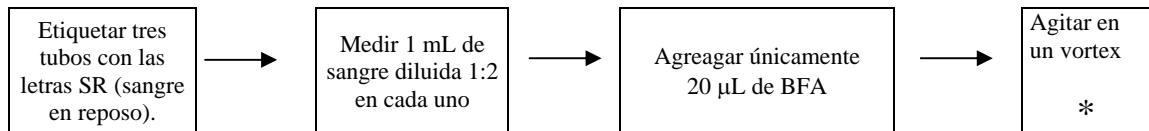
- 1) Adquirir las muestras en el citómetro de flujo FACS.

- 2) Utilizar microesferas de calibración y *software* AutoCOMP para la compensación de voltaje y fluorescencia de los tubos fotomultiplicadores (PMT) y para comprobar la sensibilidad del instrumento antes de su uso. Ver punto 6.2.5 acerca del control de calidad del instrumento.
- 3) Analizar las muestras con el citómetro de flujo FACS. Adquirir los datos con el *software* LYSYS II. Generalmente la adquisición de 10,000 eventos es suficiente.
- 4) Imprimir el análisis realizado.

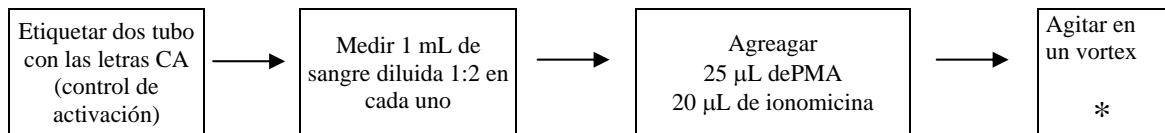
#### Preparación de muestra activada



#### Preparación de muestra en reposo (sin activar)



#### Preparación de control de activación



↓ \*

Incubar todos los tubos durante **6 horas** a 37° C ligeramente destapados para permitir la entrada de CO<sub>2</sub>.

↓

Después continuar el tratamiento de cada tubo de acuerdo a la tabla 10.

Figura 7. Diagrama de flujo de preparación de muestra activada, muestra en reposo y control de activación.

TUBO	MUESTRA	TINCIÓN DE SUPERFICIE		L	P	TINCIÓN INTRACELULAR
A	CONTROL (CTRL) DE ACTIVACIÓN 100 µL de CA	20 µL CD69-PE/CD3-PerCP	Mezclar bien e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad	SI	SÓLO PASOS 1,5 Y 6	
B	CTRL. ISOTIPO DE ACTIVACIÓN 100 µL de CA	20 µL $\gamma_{2a}$ -FITC/ $\gamma_1$ -PE/CD3-PerCP		SI		
C	CTRL. DE TINCIÓN INTRACELULAR 100 µL de SA	20 µL CD3-PerCP		SI	SI	20 µL $\gamma_{2a}$ -FITC/ $\gamma_1$ -PE
D	CTRL. ISOTIPO DE TINCIÓN INTRACELULAR 100 µL de SA	20 µL CD3-PerCP		SI	SI	20 µL IL2-FITC/CD69-PE
E	DETECCIÓN DE IL-4 E INF- $\gamma$ 100 µL de SA	20 µL CD3-PerCP		SI	SI	20 µL IFN $\gamma$ -FITC/IL4-PE
F	DETECCIÓN DE IL-2 100 µL de SA	-		SI	SI	20 µL CD69-PE/CD3-PerCP
G	CONTROL ISOTIPO NEGATIVO 100 µL de SR	20 µL CD3-PerCP		SI	SI	20 µL $\gamma_{2a}$ -FITC/ $\gamma_1$ -PE
H	CTRL. NEGATIVO PARA DETECCIÓN DE IL-4 E INF- $\gamma$ 100 µL de SR	20 µL CD3-PerCP		SI	SI	20 µL IL2-FITC/CD69-PE
I	CTRL. NEGATIVO PARA DETECCIÓN DE IL-2 100 µL de SR	20 µL CD3-PerCP		SI	SI	20 µL IFN $\gamma$ -FITC/IL4-PE

SA = Sangre activada  
SR = Sangre en reposo  
CA = Control de activación  
L = Lisis  
P = Permeabilización

Tabla 10. Preparación de tubos para la detección intracelular de IL-2, IL-4 E INF- $\gamma$

## 9. RESULTADOS

### 9.1 De la estandarización de la metodología

Después de traducir manuales e instructivos del inglés al español se llevaron a cabo varios experimentos durante 5 meses. En cada uno de los experimentos de ensayo y error se analizaron detenidamente las gráficas de puntos de los controles, se variaron tiempos de incubación para la activación por mitógeno, la cantidad de sangre total, su dilución, tiempo de incubación y el ajuste de los fotomultiplicadores hasta observar los resultados esperados, esto es una activación de por lo menos el 90%, un ruido de fondo muy bajo y una zona definida de eventos a seleccionar para ser analizados en el citómetro de flujo. Con esto se logró elaborar y estandarizar un procedimiento para la detección intracelular de interleucina 2, interleucina 4 e interferón gamma por citometría de flujo en jóvenes mexicanos sanos. El procedimiento es mostrado a continuación en la figura número 8.

### 9.2 De la detección intracelular de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$

Ya estandarizada la metodología se procedió a hacer el análisis de las gráficas obtenidas para la detección intracelular de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  de 16 muestras así procesadas, ver tabla 11, no fue posible hacerlo en más porque ya se había agotado el presupuesto destinado para este proyecto.

#### 9.2.1 Cálculo de la respuesta específica

Para el cálculo del porcentaje de la respuesta específica de las células se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Respuesta específica} = [(AS-AIC) - (US-UIC)]$$

Donde:

- AS = Muestra activada
- AIC = Control isotipo activado
- US = Muestra no estimulada
- UIC = Control de isotipo no estimulado.

Una vez analizadas las gráficas de cada una de las 16 muestras, ver figura 9, con el *software* del citómetro de flujo se determinó el porcentaje de los eventos positivos para IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  tanto de las muestras activadas como de las muestras en reposo para calcular el porcentaje de respuesta específica, los resultados obtenidos son mostrados en la tabla 11.




### OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA



Obtener sangre con jeringa heparinizada.  
Diluir 1:2 con RPMI sin L-glutamina.  
Agitar suavemente en un vórtex



### ACTIVACIÓN

Tubo control de activación (CA)	Tubo de muestra activada (SA)	Tubo de control no estimulado (SR)
 1 mL de sangre diluida + 25 $\mu$ L de PMA + 20 $\mu$ L de ionomicina	 1 mL de sangre diluida + 25 $\mu$ L de PMA + 20 $\mu$ L de ionomicina + 20 $\mu$ L de BFA	 1 mL de sangre diluida + 20 $\mu$ L de BFA












Agitar suavemente cada tubo en un vórtex



Incubar a 37° C durante 6 horas los tubos ligeramente destapados para permitir la entrada de CO<sub>2</sub>



### TINCIÓN DE SUPERFICIE

 <b>Tubo A. Control de activación</b> 100 $\mu$ L de CA + 20 $\mu$ L de CD69-PE/CD3-PerCP	 <b>Tubo C. Control de tinción intracelular.</b> 100 $\mu$ L de SA + 20 $\mu$ L de CD3-PerCP	 <b>Tubo G. Control isotipo negativo.</b> 100 $\mu$ L de SR + 20 $\mu$ L de CD3-PerCP
 <b>Tubo B. Control isotipo de activación</b> 100 $\mu$ L de CA + 20 $\mu$ L $\gamma_{2a}$ -FITC/ $\gamma_1$ -PE/CD3-PerCP	 <b>Tubo D. Control isotipo de tinción intracelular.</b> 100 $\mu$ L de SA + 20 $\mu$ L de CD3-PerCP	 <b>Tubo H. Control negativo para IL-4 e INF-<math>\gamma</math>.</b> 100 $\mu$ L de SR + 20 $\mu$ L de CD3-PerCP
	 <b>Tubo E. Para detección de IL-4 e INF-<math>\gamma</math>.</b> 100 $\mu$ L de SA + 20 $\mu$ L de CD3-PerCP	 <b>Tubo I. Control negativo para IL-2.</b> 100 $\mu$ L de SR + 20 $\mu$ L de CD3-PerCP
	 <b>Tubo F. Para detección de IL-2.</b> 100 $\mu$ L de SA + 20 $\mu$ L de CD3-PerCP	



Mezclar bien cada tubo en un vórtex





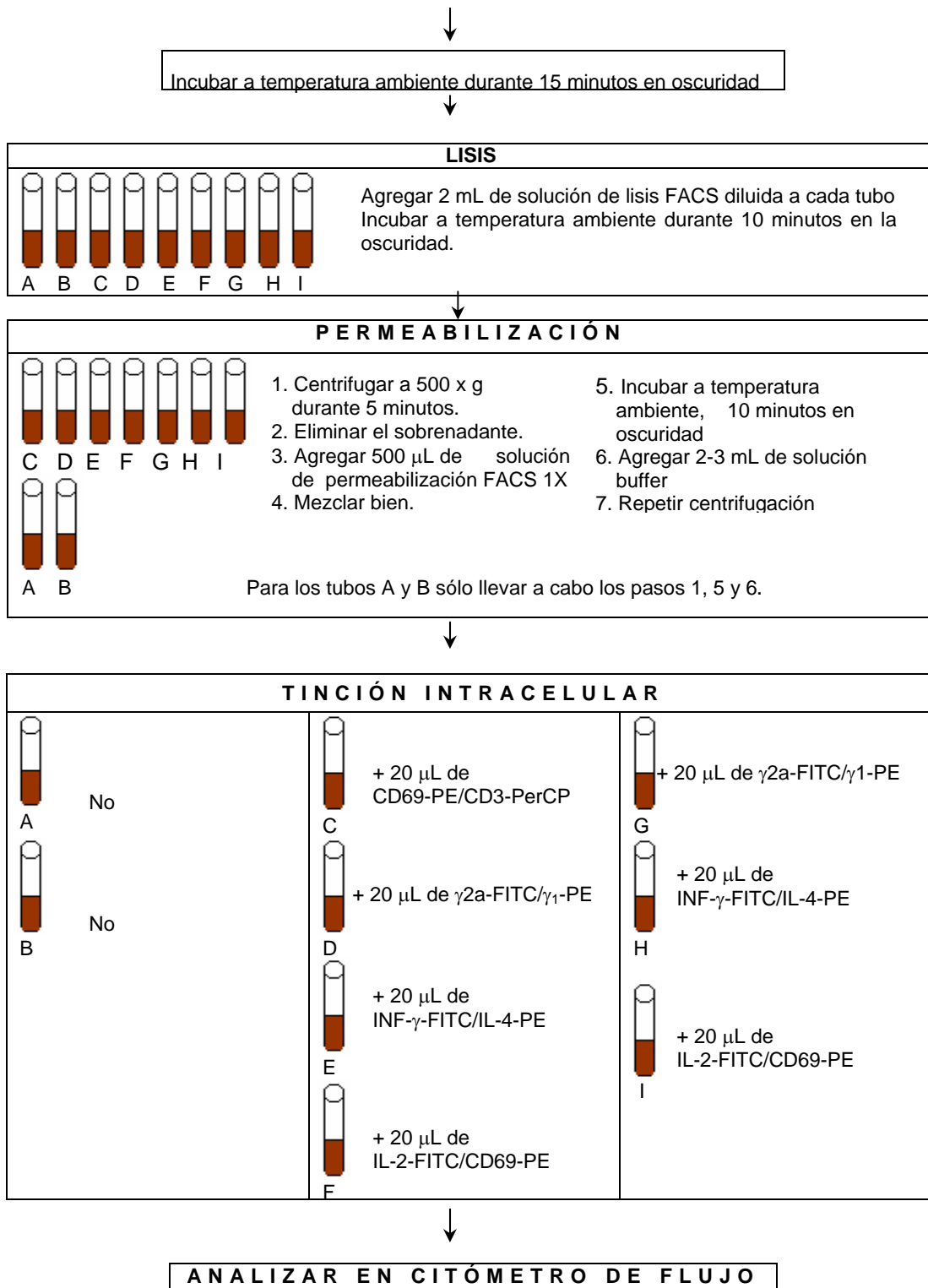
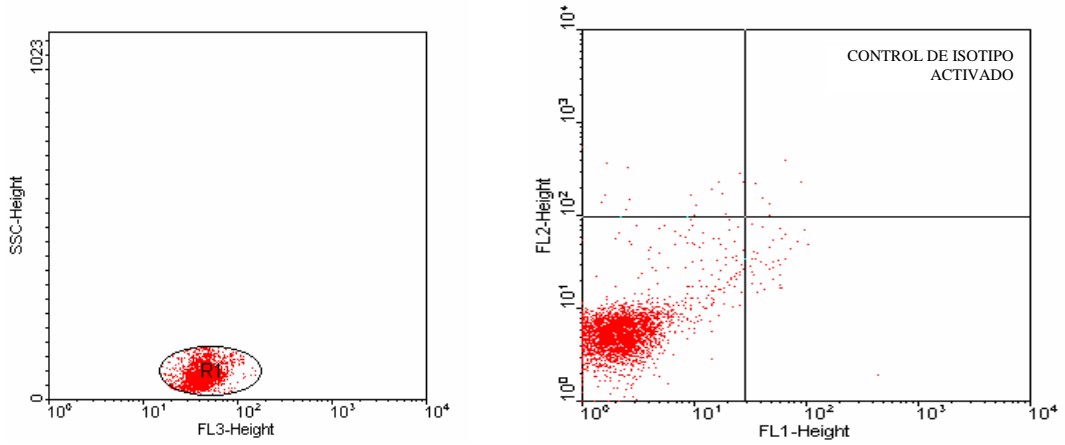


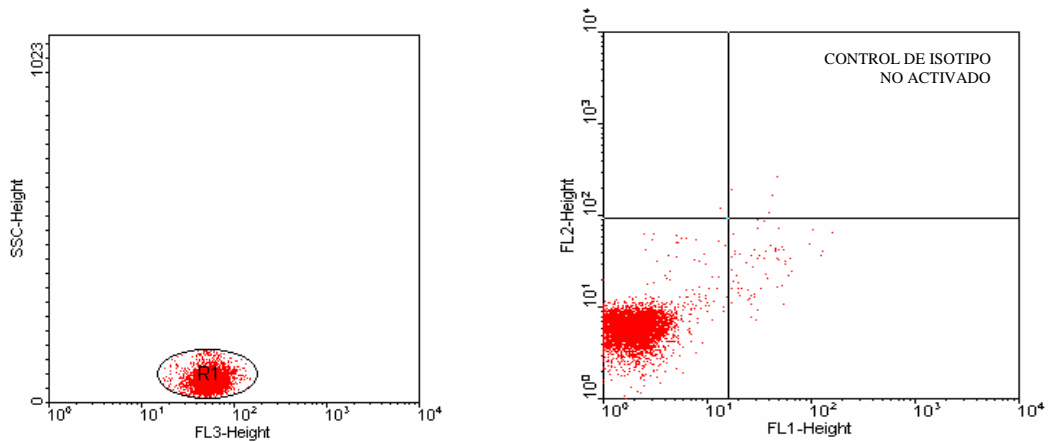
Figura 8. Método estandarizado para la detección intracelular de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  por citometría de flujo

Figura 9. Ejemplo de todas las gráficas obtenidas por muestra analizada para la detección intracelular de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  por citometría de flujo en jóvenes mexicanos sanos.



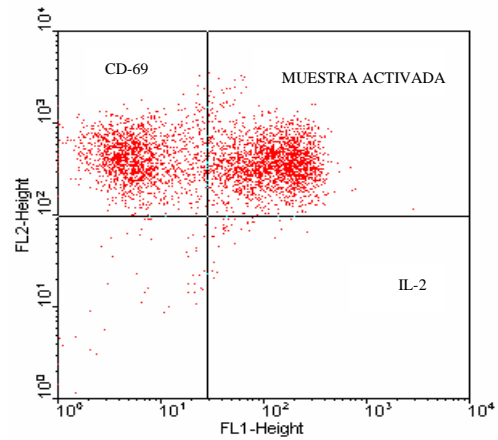
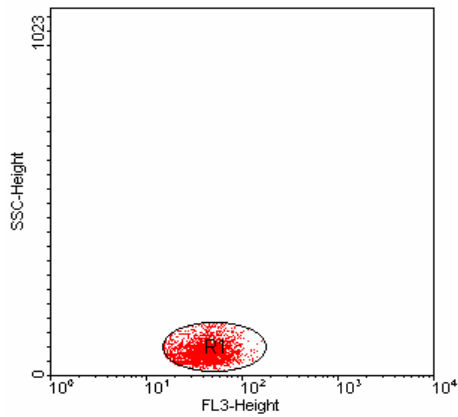
Selected Preference: Geometric/Channel  
 Parameters: FL1-H(LOG), FL2-H(LOG) Quad Location: 276, 516  
 Total = 6028 Gated = 2771

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Ymean
1 UL	2	0.07	0.03	52.00	672.00
2 UR	4	0.14	0.07	451.00	593.00
3 LL	2694	97.22	44.69	84.69	187.41
4 LR	71	2.56	1.18	372.28	354.87



Selected Preference: Geometric/Channel  
 Parameters: FL1-H(LOG), FL2-H(LOG) Quad Location: 276, 516  
 Total = 10000 Gated = 6340

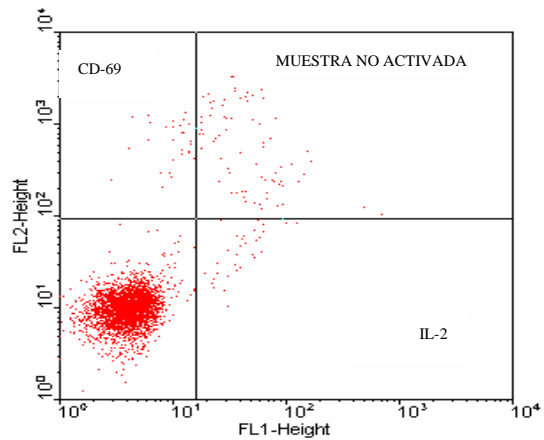
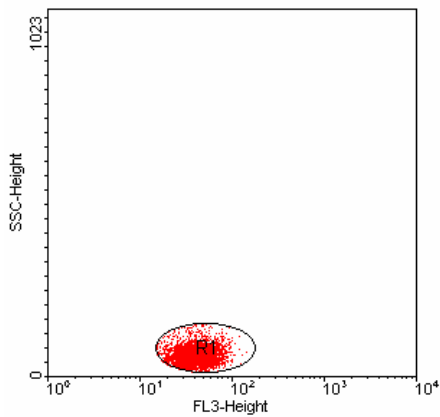
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Ymean
1 UL	0	0.00	0.00	--	--
2 UR	4	0.06	0.04	385.00	560.00
3 LL	6268	98.86	62.68	70.96	194.54
4 LR	68	1.07	0.68	384.65	364.41



Selected Preference: Geometric/Channel  
 Parameters: FL1-H(LOG), FL2-H(LOG) Quad Location: 276, 516

Total = 10000 Gated = 4265

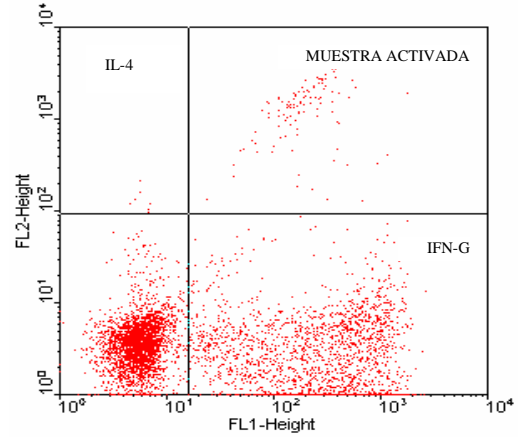
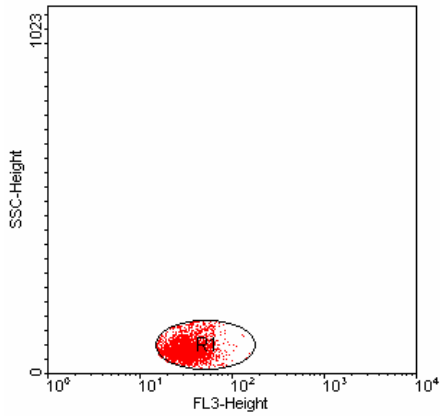
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Ymean
1 UL	1302	30.53	13.02	178.21	670.84
2 UR	2889	67.74	28.89	513.06	656.83
3 LL	24	0.56	0.24	156.33	383.33
4 LR	50	1.17	0.50	450.00	453.04



Selected Preference: Geometric/Channel  
 Parameters: FL1-H(LOG), FL2-H(LOG) Quad Location: 276, 516

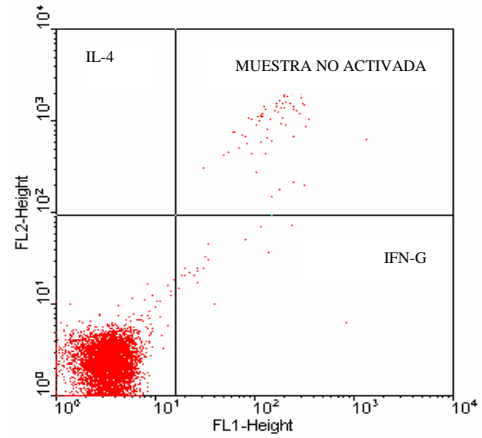
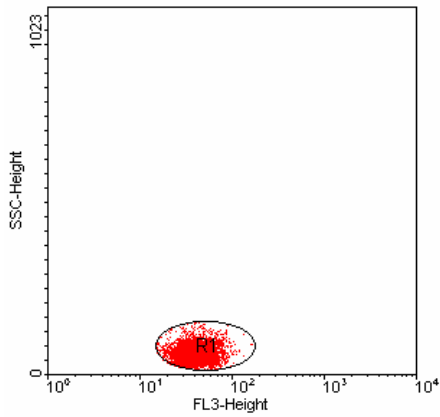
Total = 10000 Gated = 6225

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Ymean
1 UL	40	0.64	0.40	223.10	713.80
2 UR	164	2.63	1.64	396.00	684.15
3 LL	5969	95.89	59.69	153.87	250.10
4 LR	52	0.84	0.52	401.92	412.62



Selected Preference: Geometric/Channel  
 Parameters: FL1-H(LOG), FL2-H(LOG) Quad Location: 276, 516  
 Total = 10000 Gated = 4410

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Ymean
1 UL	4	0.09	0.04	192.00	556.00
2 UR	66	1.50	0.66	581.09	774.00
3 LL	2208	50.07	22.08	185.70	139.91
4 LR	2132	48.34	21.32	638.41	86.67



Selected Preference: Geometric/Channel  
 Parameters: FL1-H(LOG), FL2-H(LOG) Quad Location: 276, 516  
 Total = 10000 Gated = 6605

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Ymean
1 UL	0	0.00	0.00	--	--
2 UR	49	0.74	0.49	544.65	752.82
3 LL	6530	98.86	65.30	133.80	85.11
4 LR	26	0.39	0.26	382.31	352.00

Muestra	Sexo	Edad	Citocina	% Eventos positivos		%Respuesta específica
				Activación	Reposo	
1	M	31	IL-2	42.09	1.59	40.50
			IL-4	0.95	0.46	0.49
			IFN- $\gamma$	43.81	2.26	41.55
2	F	28	IL-2	49.17	4.33	44.84
			IL-4	1.11	-0.82	1.93
			IFN- $\gamma$	48.75	2.25	46.50
3	F	33	IL-2	45.49	3.3	42.19
			IL-4	2.33	2.35	-0.02
			IFN- $\gamma$	36.84	4.32	32.52
4	F	27	IL-2	38.85	1.27	37.58
			IL-4	-2.46	-1.7	-0.76
			IFN- $\gamma$	35.17	0.98	34.19
5	M	24	IL-2	53.87	1.51	52.36
			IL-4	-3.26	-3.68	0.42
			IFN- $\gamma$	31.72	-0.67	32.39
6	F	19	IL-2	44.61	0.46	44.15
			IL-4	-2.47	-2.19	-0.28
			IFN- $\gamma$	36.00	0.81	35.19
7	M	21	IL-2	49.52	-6.61	56.13
			IL-4	-4.00	-8.63	4.63
			IFN- $\gamma$	31.76	-8.23	39.99
8	F	20	IL-2	47.93	1.06	46.87
			IL-4	1.97	0.47	1.50
			IFN- $\gamma$	45.70	1.96	43.74
9	M	20	IL-2	50.37	3.26	47.11
			IL-4	2.69	1.88	0.81
			IFN- $\gamma$	52.97	3.61	49.36
10	F	25	IL-2	67.60	2.57	65.03
			IL-4	1.38	0.68	0.70
			IFN- $\gamma$	49.63	1.07	48.56
11	M	34	IL-2	43.65	1.00	42.65
			IL-4	0.99	0.28	0.71
			IFN- $\gamma$	50.24	0.36	49.88
12	M	35	IL-2	59.03	1.17	57.86
			IL-4	1.14	0.45	0.69
			IFN- $\gamma$	37.05	0.81	36.24
13	F	40	IL-2	63.22	1.49	61.73
			IL-4	2.38	0.40	1.98
			IFN- $\gamma$	41.21	0.80	40.41
14	M	32	IL-2	65.48	0.55	64.93
			IL-4	0.43	0.11	0.32
			IFN- $\gamma$	33.40	0.47	32.93
15	F	38	IL-2	61.39	1.45	59.94
			IL-4	1.36	0.38	0.98
			IFN- $\gamma$	54.79	1.33	53.46
16	F	22	IL-2	52.93	1.71	51.22
			IL-4	2.80	0.80	2.00
			IFN- $\gamma$	53.68	1.09	52.59

Tabla 11. Cálculo de la respuesta específica de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  de acuerdo al porcentaje de eventos positivos

## 10. DISCUSIÓN

El método de detección intracelular de citocinas con el estuche de reactivos FASTIMMUNE Cytokine System de Becton Dickinson es un método muy laborioso, requiere la preparación de varios reactivos y el procesamiento de las muestras se lleva a cabo en, aproximadamente, trece horas de trabajo en el laboratorio antes de poderlas adquirir (analizar) en el citómetro de flujo. En el trabajo experimental esto se hizo de las 8:00 a 21:00 horas para al día siguiente adquirirlas en el citómetro de flujo para analizarlas las gráficas de puntos durante varias horas hasta obtener gráficas óptimas que permitieran su análisis. No obstante lo anterior, un aspecto importante y que representa una ventaja fundamental de la citometría de flujo, es la posibilidad de medir tantos parámetros como anticuerpos se dispongan para ello, marcados con diferentes fluorocromos. De esta forma, es posible caracterizar una célula por su fenotipo de superficie y, al mismo tiempo, conocer el estado intracelular que guarda la célula como su patrón de secreción de citocinas.

La estandarización de la metodología requirió una sólida capacitación inicial en la tecnología de la citometría de flujo, una observación minuciosa y analítica de los resultados obtenidos de cada uno de los ensayos para identificar qué variable y de qué forma afectaba los resultados para modificarla hasta conseguir la activación y la permeabilización para la tinción intracelular, también llevó su tiempo la traducción de todos los instructivos para preparación de reactivos, del manual del citómetro de flujo etc., ya que la metodología, cuando se llevó a cabo la parte experimental de esta tesis, era relativamente nueva y había muy poca información en español.

Para lograr estandarizar la detección intracelular de citocinas por citometría de flujo fueron necesarias 13 pruebas antes de poder obtener resultados confiables como los obtenidos en las últimas 16 que fueron analizadas, es decir en este proyecto se analizaron un total de 29 muestras.

En los resultados obtenidos de la detección intracelular de citocinas en jóvenes mexicanos sanos se puede observar claramente que los valores para la respuesta específica para IL-2 varían del 38-65%, para el INF- $\gamma$  entre 32-54% mientras que para la IL-4 no sobrepasa del 5%.

Se investigó si hay alguna correlación entre la IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  o bien entre alguna de éstas con la edad y el sexo de los donadores por medio de un análisis estadístico con el programa SPSS pero no se encontró alguna.

Una aplicación clínica importante de esta tesis podría haber sido determinar valores de referencia de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  para la población mexicana comprendida entre los 20-40 años pero no se pudieron determinar ya que se requieren por lo menos 20 muestras para que la inferencia estadística sea válida y sólo se obtuvieron resultados confiables de 16 muestras. El análisis estadístico descriptivo de los resultados de la muestra poblacional se muestra en la tabla número 12.

Muestra	Sexo	Edad	% Respuesta específica		
			IL-2	IL-4	INF- $\gamma$
1	M	31	40.50	0.49	41.55
2	F	28	44.84	1.93	46.50
3	F	33	42.19	-0.02	32.52
4	F	27	37.58	-0.76	34.19
5	M	24	52.36	0.42	32.39
6	F	19	44.15	-0.28	35.19
7	M	21	56.13	4.63	39.99
8	F	20	46.87	1.50	43.74
9	M	20	47.11	0.81	49.36
10	F	25	65.03	0.70	48.56
11	M	34	42.65	0.71	49.88
12	M	35	57.86	0.69	36.24
13	F	40	61.73	1.98	40.41
14	M	32	64.93	0.32	32.93
15	F	38	59.94	0.98	53.46
16	F	22	51.22	2.00	52.59

<b>Estadística descriptiva</b>	<b>IL-2</b>	<b>IL-4</b>	<b>INF-<math>\gamma</math></b>
Media	50.94	1.01	41.84
Error típico	2.25	0.31	1.87
Mediana	49.17	0.71	40.98
Moda	NA	NA	NA
Desviación estándar	9.00	1.25	7.47
Varianza de la muestra	81.06	1.56	55.83
Curtosis	-1.30	4.04	-1.48
Coficiente de asimetría	0.27	1.60	0.16
Rango	27.45	5.39	21.07
Mínimo	37.58	-0.76	32.39
Máximo	65.03	4.63	53.46
Suma	815.09	16.10	669.50
Cuenta	16.00	16.00	16.00
Nivel de confianza(95.0%)	4.80	0.67	3.98

Tabla 12. Análisis estadístico descriptivo de la detección intracelular de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  por citometría de flujo en jóvenes mexicanos sanos.

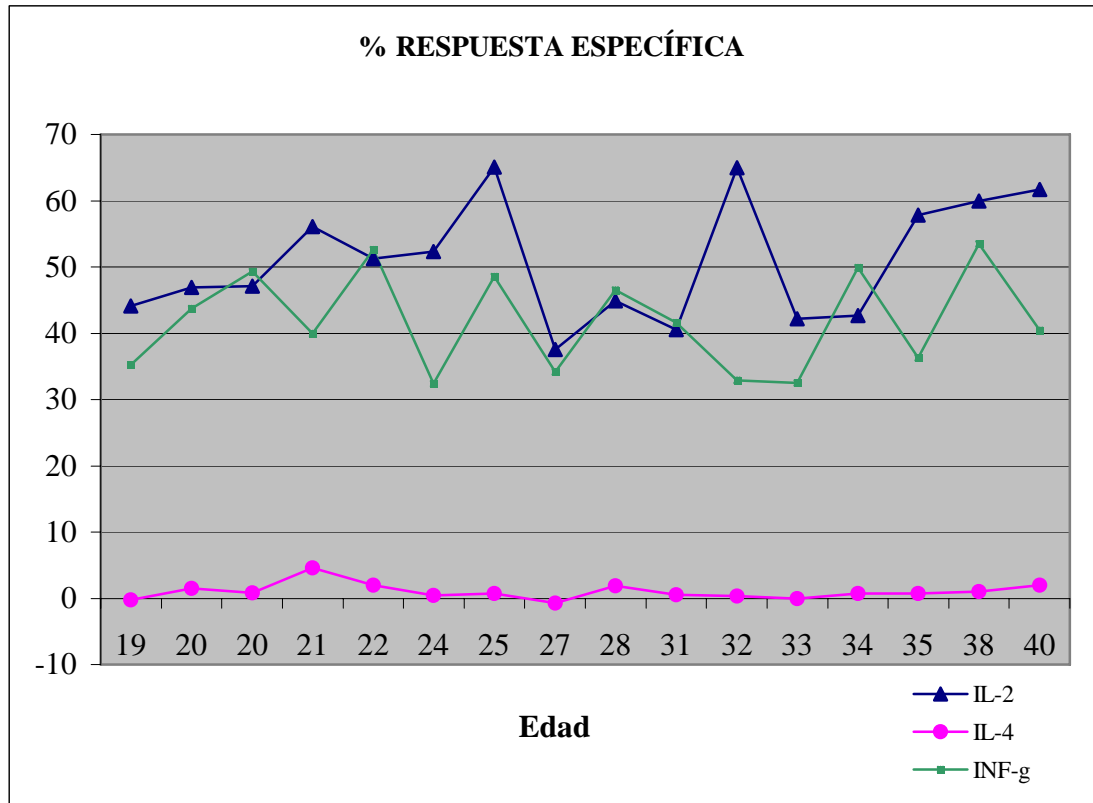


Figura 10. Gráfica de la respuesta específica de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  relacionada con la edad de los donadores de las muestras analizadas.



## 11. CONCLUSIONES

Se logró estandarizar el método para detección intracelular de citocinas por citometría de flujo con el estuche de reactivos BDIS FASTIMMUNE™ Cytokine System y el citómetro de flujo FACScan de Becton Dickinson en el Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa. Se identificó y se definió que para lograr la activación celular y la permeabilización para la tinción intracelular las variables críticas son: el volumen de muestra, 1000  $\mu$ L de sangre diluida 1:2 con RPMI sin L-glutamina y el tiempo de incubación para activación y permeabilización, de 6 horas.

Se determinaron los valores de la respuesta específica *in vitro* de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  en muestras de 16 jóvenes mexicanos no enfermos, para IL-2 la respuesta varió de 38-65%, para INF- $\gamma$  fue de 32-54% y para IL-4 fue menor al 5%.

Lo anterior fue posible gracias a la capacitación en citometría de flujo recibida del personal de laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la UAM-Iztapalapa.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barrera RLM, Drago SME, Zamora AC, Gómez AF, Del Rosarios SET, Mendoza PF. Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2004 Mar 1;17(1):42-55.
2. Orfao A, Ciudad J, López A, López-Berges MC, Vidriales B, Macedo A, et al. La citometría de flujo en el diagnóstico clínico. Servicio General de Citometría Universidad de Salamanca, 1993.
3. Orfao A, González M, Ciudad J, López-Berges MC, López A, San Miguel JF, et al. Aplicaciones de la citometría de flujo en el diagnóstico hematológico. *Biol Clin Hematol* 1992;13:456-523.
4. Goding JS. Conjugation of antinodies with fluorochromes modifications to the standard Methods . *J Immunol Meths* 1976;13:215-23.
5. Becton Dickinson. Immunocytometry Systems. FACScan™ training manual. San José, CA: The Company; 1993. p. 1-1, 1-14.
6. Shapiro HM. Practical flow cytometry . 4 ed. New Jersey: Wiley-Liss, Hoboken; 2003.
7. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group . *Proc Soc Exptl Biol Med* 1941;47:200-4.
8. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;356:495.
9. Longobardi GA. Flow cytometry. First Principles. New York: Willey-Liss; 1992.
10. Barry SM, Anossy G. Optimal gating strategies for determining bronchoalveolar lavage cd4/cd8 lymphocyte ratios by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2004;285:15-23.
11. Asbury CL, Esposito R, Farmer C, van den Engh G. Fluorescent spectra of DNA dyes measured in a flow cytometry . *Cytometry* 1996;24:234-42.
12. Krishan A. Rapad flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by ropidium iodide staining. *J Cell Biol* 1975;66:188-94.
13. McCloskey TW, Oyaizu N, Coronesi M, Pahwa S. Use of a flow cytometric assay to quantitate apoptosis in human lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;71:14-8.
14. Matsui M, Araya SI, Wang HY, Matsushima K, Saida T. Immunomonitoring measures in relapsing-remitting multiple sclerosis . *J Neuroimmunol* 2004;148:192-199.

15. Dai SM, Matsuno H, Nakamura H, Nishioka K, Yudoh K. Interleukin-18 enhances monocyte tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta production induced by direct contact with T lymphocytes: implications in rheumatoid arthritis . *Arthritis Rheum* 2004;50:432-443.
16. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR. Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2004;59:198-202.
17. Kalwak K, Turkiewicz D, Ussowicz M, Gorczynska E, Toporski J, Ryczan R, et al. Clinical value of the flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation: Spontaneous activation of T-cell subpopulations is associated with acute GvHD. *Transplant Proc* 2003;35:1559-1562.
18. Cotteret S, Belloc F, Boiron JM, Bilhou-Nabera C, Dumain P, Boyer C, et al. Fluorescent *in situ* hybridization on flow-sorted cells as a tool for evaluating minimal residual disease or chimerism after allogenic bone marrow transplantation . *Cytometry* 1998;34:216-222.
19. Ruiz-Arguelles GJ, Ramirez Cisneros FJ, Ruiz-Arguelles A, Perez-Romano B, Morales-Aceves R. Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell surface protein deficiency in mexican mestizo patients with aplastic anemia . *Rev Invest Clin* 1999;51:5-9.
20. Regueiro JR, Larrea LC. *Inmunología: Biología y patología del sistema inmune*. Madrid: Ed. Médica Panamericana; 1996. p. 1-3.
21. Regueiro JR, Larrea LC. *Inmunología: Biología y patología del sistema inmune*. Madrid: Ed. Médica panamericana; 1996. p. 97-99.
22. Stites DP, ETR AI. Citocinas. En: *Inmunología básica y clínica*. 7 ed. México: Manual moderno;1991. p. 85-108.
23. Filella X, Molina R, Ballesta AM. III Curso sobre citocinas: Del laboratorio a la clínica, libro de ponencias. Facultad de medicina. Universitat de Barcelona; 2002.
24. Blair S, Carmona J, Correa A. Malaria en niños: Relaciones entre nutrición e inmunidad. *Rev Panam Salud Pública*; 2002 Jan 1; 11(1):30-45.
25. Beck MA. Selenium and host defense towards viruses. *Proc Nutr Soc* 1999;58(3):707-11.
26. Kurpad AV, Jahoor F, Borgonha S, Poulo S, Rekha S, Fjeld CR, et al. A minimally invasive tracer protocol is effective for assessing the response of leucine kinetics and oxidation to vaccination in chronically energy-deficient adult males and children. *J Nutr* 1999;129(8): 1537-44.
27. Goodman KJ, Correa P, Tengana Aux HJ, DeLany JP, Collazaos T. Nutritional factors and *Helicobacter pylori* infection in colombian children. *U Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 25(5):507-15.

28. Marcos A. The immune system in eating disorders: an overview. *Nutrition* 1997;13(10): 853–62.
29. Chandra RK. Nutrition and the immune system. *Proc Nutr Soc* 1993; 52(1):77–84.
30. Chandra RK. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune response to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; 93(25):14304–7.
31. Mc Gregor IA. Malaria: nutritional implications. *Rev Infect Dis* 1982;4:798–805.
32. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunidad frente a los microorganismos. En: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular*. Madrid: Interamericana -Mc Graw Hill; 1995. p. 369–74.
33. Alonso F, Velazco A, Prieto G. Nutrición e inmunidad. *Pediatrica* 1994; 14(10):428–40.
34. Waterlow J. *Malnutrición proteicoenergética*. Washington D.C.: OPS;1996. (Publicación Científica 555).
35. Hall JC. Use of internal validity in the construct of an index of under nutrition. *J Parenter Enteral Nutr* 1990;14(6):582–7.
36. Toure M, Sall NG, Gauthier F, Weill J, Mouray H, Sall M. Apolipoprotein A1 as an early index of protein-energy malnutrition. *Eur J Clin Nutr* 1991;45(10):511–4.
37. Cunningham-Rundless S, McNeeley DF, Moon A. Mecanismos de modulación de la respuesta inmune por los nutrientes. *J allergy Clin Immunol* 2005;115: (6):1119-28
38. Gershwin ME, Beach RS, Hurley LS. Nutritional factors and immunological response. En: *Nutrition and immunity*. London:Academic; 1985:1-6.
39. Beisel WR. Nutrition and immune function: overview. *J Nutr* 1996;126:2611-15.
40. Beisel WR. Herman award lecture, 1995: Infection-induced malnutrition-from cholera to cytokines. *Am J Clin Nutr* 1995;62:813-9
41. Chandra RK. 1990 Mc Collum award lectures. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr* 1991;53:1087-101.
42. Keusch GT. Malnutrition and the thymus gland. En: Cunningham-Rundless S. *Nutrient modulation of the immune response*. New York: Marcel Dekker;1993:283-99.
43. Simon J: *Physiological assay on the thymus gland*. London:Renshaw;1845.

44. Smythe PM, Schonland M, Brereton-Stites GG, Coovadia HM, Gracew HJ, Loening WEK, et al. Thymolymphatic deficiency and depression of cell-mediated immunity in protein-caloric malnutrition. *Lancet* 1971;2:934-43.
45. Chandra RK. Nutrition and immunoregulation. Significance for host resistance to tumors and infectious diseases in humans and rodents. *J Nutr* 1992;122:754-7.
46. Haynes BF, Denning SM, Le PT, Singer KH. Human intrathymic T cell differentiation. *Semin Immunol* 1990;2:67-72.
47. Hagedorn JW. Thymic endocrinology. *Ann NY Acad Sci* 1998;840:352-8.
48. Golden MN, Jackson AA, Golden BE. Effect of zinc on thymus of recently malnourished children. *Lancet* 1977;2:1057-9.
49. Mocchegiani E, Corradi A, Santarelli L, Tibaldi A, De Angelis E, Borghetti P, et al. Zinc, thymic endocrine activity and mitogen responsiveness in piglets exposed to maternal aflatoxicosis B1 and G1. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;62(3):245-60.
50. Lesourd BM. Nutrition and immunity in the elderly: modification of immune responses with nutritional treatment. *Am J Clin Nutr* 1997;66(2):4788-4848.
51. Lee WH, Woodward BD. The CD4/CD8 ratio in the blood does not reflect the response of this index in secondary lymphoid organs of weanling mice in model of protein-energy malnutrition known to depress thymus-dependent immunity. *J Nutr* 1996;126(4):849-59.
52. Chandra RK. Protein-energy malnutrition and immunological responses. *J Nutr* 1992;122:597-600.
53. Sherman AR. Zinc, copper and iron nutrition and immunity. *J Nutr* 1992;122:604-9.
54. Lofty OA, Salch WA, Barbari M. A study of some changes of cell-mediated immunity in protein energy malnutrition. *J Egypt Soc Parasitol* 1998;29(2):413-28.
55. Chandra RK. Nutrition and the immune system: An introduction. *Am J Clin Nutr* 1997;66(2):4608-38.
56. Ha CL, Woodward B. Reduction in the quantity of the polymeric immunoglobulin receptor is sufficient of account for the low concentration of intestinal secretory immunoglobulin A in a weanling mouse model of wasting protein-energy malnutrition. *J Nutr* 1997;127(3):427-35.
57. Beisel WR. Nutrition and infection. In: Linder MC. *Nutritional biochemistry and metabolism*. Appleton and Lange, 1991;507-42.
58. Beisel WR. Single nutrients and immunity. *Am J Clin Nutr* 1982;35(Suppl):417-68.

59. Redmon HP, Leon P, Lieberman MD, Hofmann K, Shou J, Reynolds JV, et al. Impaired macrophage function in severe protein-energy malnutrition. *Arch Surg* 1991;126:192-6.
60. Honda Y, Takahashi K, Naito M, Fujiyama S. The role of macrophage colony-stimulating factor in the differentiation and proliferation of Kupffer cells in the liver of protein-deprived mice. *Lab Invest* 1995;72(6):696-706.
61. Grimble RF. Interaction between nutrients, pro-inflammatory cytokines and inflammation. *Clin Sci* 1996;91:121-30.
62. Shenkin A. Trace elements and inflammatory response: implications for nutritional support. *Nutrition* 1995;11:100-5.
63. Santos JL. Nutrition, infection and immunocompetence. *Infect Dis Clin North Am* 1994;8(1):243-67.
64. Keuter M, Dharmana E, Gasem MH. Patterns of proinflammatory cytokines and inhibitors during typhoid fever. *J Infect Dis* 1994;169:13006-11.
65. Lyoumi S, Tamion F, Petit J, Dechelotte P, D'auguet C, Scotte M, et al. Induction and modulation of acute-phase response by protein malnutrition in rats: comparative effect of systemic and localized inflammation on interleukin-6 and acute-phase protein synthesis. *J Nutr* 1998;128(2):166-74.
66. Dinarello CA, Wolf SM. The role of interleukin 1 in disease. *N Engl J Med* 1993;328:106-15.
67. Sullivan JS, Kilpatrick L, Costarino AT. Correlation of plasma cytokine elevations with mortality rate in children with sepsis. *J Pediatr* 1992;120:510-5.
68. Bhaskaram P, Swakumar B. Interleukin 1 in malnutrition. *Arch Dis Child* 1986;61:182-5.
69. Muñoz C, Arévalo M, López M, Schlesinger L. Impaired interleukin 1 and tumor necrosis factor production in protein-caloric malnutrition. *Nutr Res* 1994;14:347-52.
70. Schattner A, Steinbock M, Tepper R, Schonfeld A, Vaisman N, Hahn T. Tumor necrosis factor production and cell-mediated immunity in anorexia nervosa. *Clin Exp Immunol* 1990;79:62-6.
71. Deitch EA. Bacterial translocation of gut flora: proceeding of NIH conference on Advances in Understanding Trauma and Burn Injury. *J Trauma* 1990;30:5184-8.
72. Katayama M, Dazhong X, Specian RD, Deitch EA. Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation. Effects of protein malnutrition and endotoxin in rats. *Ann Surg* 1997;225(3):317-26.

73. Spath G, Herner A. Microbial translocation and impairment of mucosal immunity induced by an elemental diet in rats is prevented by selective decontamination of the digestive tract. *Eur J Surg* 1998;164(3):223-8.
74. Brandtzaeg P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr Rev* 1998;56(5):5-18.
75. Cunningham-Rundless S. Analytical methods for evaluation of immune response on nutrient intervention. *Nutr Rev* 1998;56(8):27-37.
76. Li J, King BK, Jann PG, Renegar KB, Kudsk DA. Glycyl L-glutamine enriched total parenteral nutrition maintains small intestine gut-associated lymphoid tissue and upper respiratory tract immunity. *J Parenter Ent Nutr* 1998;22(1):31-6.
77. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cytokines. En: *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1994. p.40-60.
78. Vázquez-Garibay EM. Citocinas y desnutrición proteico energética en el niño. *Biol Med Hosp. Infant Mex* 2003;60(1):5-8.
79. Schlesinger L, Ohlbaum A, Grez L, Stekel A. Decreased interferon production by leucocytes in marasmus. *Am J Clin Nutr* 1976;29:758-61.
80. Heresi GP, Saitua MT, Schlesinger L. Leucocyte migration inhibition factor production in marasmic infants. *Am J Clin Nutr* 1981;34:909-13.
81. Salimanu LS, Ojo-Amaize E, Jonson AO, Laditan AA, Akinwolere OA, Wigsell H. Depressed natural killer cell activity in children with protein calorie malnutrition. II. Correction of the impaired activity after nutritional recovery. *Cell Immunol* 1983;82:210-5.
82. Doherty JF, Golden MH, Remick DG, Griffin GE. Production of interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha *in vitro* is reduced in whole blood of severely malnourished children. *Clin Sci* 1994;83:347-51.
83. Aslan Y, Erduran E, Gedik Y, Mocan H, Oktern A, Orem A. Serum interleukin-1 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor levels in protein malnourished patients during acute infection. *Cent Afr J Med* 1996;42:179-84.
84. Sauerwein RW, Mulder JA, Mulder L, Lowe B, Peshu N, Demacker PN, et al. Inflammatory mediators in children with protein-energy malnutrition. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1534-9.
85. Lofty OA, Saleh WA, el Barbari MA. A study of some changes of cell-mediated immunity in protein energy malnutrition. *J Egypt Soc Parasitol* 1998;28:413-28.

86. Malave I, Vethencourt MA, Pirela M, Cordero R. Serum levels of thyroxine-binding pre-albumin, C-reactive protein and interleukin-6 in protein energy undesnourished children and normal controls without or with associated clinical infections. *J Trop Pediatr* 1998;44:256-62.
87. Giovambattista A, Spinedi E, Sanjurjo A, Chisari A, Rodrigo M, Perez M. Circulating and mitogen-induced tumor necrosis factor (TNF) in malnourished childre. *Medicine* 2000;60:339-42.
88. Palacio A, Lopez M, Perez-Bravo F, Monkeberg F, Schlesinger L. Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3040-6.
89. Amesty-de Valbuena A, Pereira N, García Desnutrición calórico proteica, Vicente-de-Villarroel M, Núñez-González J. Cayama N, et al. Niveles séricos de citocinas pro inflamatorias en niños con diferentes grados de desnutrición. *Bol Med Hosp. Infant Mex* 2003;60:14-21.
90. Barlett. *Cities for children*. UNICEF. Londres;1999.
91. Smith L, Haddad L. *Explaining Child Malnutrition in Developing Countries: A Cross-Country Analysis*. FCND discussion papel no.60, IFPRI, Washington DC;1999.
92. Waterlow JC. *Malnutrición proteico-energética*. Washington D.C.; 1996. p.1-10.
93. Suskind D, Mudhy KK, Suskind RM. The malnourished child: An overview. En: Suskind RM, Suskind LL: *The malnourished child*. New York: Raven Press; 1990:1-22.
94. Keits DG. Desnutrición proteico calórica severa. En: Keits DG, Jones EG. *Manual de nutriciónpediátrica*. Barcelona: Doyma SA; 1987. p. 212-5.
95. Flores-Huerta S. Desnutrición energético proteica. En: Casanueva E, Kaufer HM, Pérez LA, Arroyo P. *Nutriología médica*. México. Panamericana; 1995. p.152-67.
96. Monckeberg F. Desnutrición proteico-energética. En: Brunsel O, Carrazza F, Gracey M, Nichols B, Senterre J. *Nutrición clínica enla infancia*. New York: Raven Press; 1985. 121-32.
97. UNIDEF-CEPAL. *Indicadores sobre la situación de la infancia en América Latina y el Caribe*. Santiago de Chile; 1979. p. 27.
98. Monckeberg F. The possibilities of nutrition intervention in Latin America. *Food Technol* 1981;121:115-22.
99. Shah KP. *Nutrición de la madre en vecindarios pobres*. En: Mnuual de lactancia materna. UNICEF. México: Pax-México; 1983. p.31-66.
100. Frenk J, Bobadilla JL, Sepúlveda J, López CM. Health transition in middle-income countries: new challenges for health care. *Health policy and planning* 1989;4:29-39.



101. Salud y desarrollo. Investigación en salud. Informe de la Comisión de Investigación en salud para el desarrollo. El Colegio Nacional; 1992. p. 21-50.
102. Estadísticas de mortalidad 1989 a 1994. Secretaría de coordinación y desarrollo. Dirección general de estadística e informática.
103. Langer A, Bobadilla JL, Schiafer PL. Limitaciones de la mortalidad infantil como indicador de salud. *Salud Pública México* 1990;32:467-73.
104. Margen S, Melnick V, Neuhauser L, Ríos E. Infant feeding in Mexico. Washington. Nestle Infant Formula. Audit Commission; 1994. p. 1-12.
105. Hernández FD, Barberena RC, Camacho PJA, Vera LIH. Desnutrición infantil y pobreza en México. Cuadernos de desarrollo humano. Sria. de Desarrollo Social.; 2003.
106. ACC/SCN-IFPRI, 2000 e INSP.
107. Cravioto J, Arrieta R, Ortega R. Desnutrición en la infancia (primera parte). *Rev Mex Pediat* 1988;55:245-59.
108. Sepúlveda AJ, Lezana MA, Tapia CR, Valdespino JL, Madrigal H, Kumate J. Estado nutricional de preescolares y mujeres en México Resultados de una encuesta probabilística nacional. *Gac Med Mex* 1990;126:207-25.
109. Chávez A, De Chávez MM, Roldán JA, Berinejo S, Avila . La nutrición en México y la transición epidemiológica. México: Foro Nacional de Alimentación y Nutrición. Instituto Nacional de Nutrición; 1993. p. 39-45.
110. Plan Nacional de Desarrollo 1995-2000. Poder Ejecutivo Federal. Secretaría de Hacienda y Crédito Público; 1995.
111. Frenk J, Donabedian A. Intervención del estado en la atención médica: Tipos, tendencias y variables. En White K, Frenk J, Ordofiez C, Paganini JM, Starfield B. Investigación sobre servicios de salud. Una antología. Washington; 1992. p. 1082-97.
112. Cruz-Rivero C, Valdés-Olmedo C. Diversidad financiera para la prestación de servicios de salud. *Salud Pública Mex* 1992;34(supl):105-16.
113. Karyadi. Desnutrición calórico proteica, Mahumud MK, Hermana. Locally made rehabilitation foods. En Suskind RM, Suskind LL. *The malnourished child*. New York: Raven Press; 1990. p. 377-81.
114. Amigo H, Beghin I, Sáenz L, Arnda-Pastor J. Programas para la extensión de cobertura en los servicios de salud: actividades de nutrición. *Bol Of Sanit Panam* 1980;89:480-7.

115. Sockirnan. Prevention of protein energy malnutrition through socioeconomic development and community participation. En Suskind RM, Suskind LL. The malnourished chil. New York: Raven Press; 1990. p. 359-70.
116. Behin Y, Del Canto J, Teller CH. Desnutrición, desarrollo nacional y planificación. Bol Of Saint Panam 1980;89:505-15.
117. Frenk J, Infante CC, Lozano R. Equidad y salud en México. En: Bejar R, Hernández H (COORD.): Población y desigualdad social en México. Cuernavaca Mor. CRIMIUNAM; 1993. p. 271-9.
118. Langer A, Lozano R, Bobadilla JL. Effects of Mexico's economic crisis on the health of women an children. En: González de la Rocha M, Escobar A. Social responsos to Mexico's economic crisi of the 1980's. US-México Contemporary perspectives Series Num 1. University of California. p. 195-219.
119. Luengas BJ, Flores HS, Esquivel HS. Sala de rehabilitaión nutricional. Recuperación integral del niño desnutrido. Cuadernos de nutrición 1980;5:349-63.
120. Cravioto J, Arrieta R, Ortega R. Desnutrición en la infancia. Rev Mex Pediat 1988;55:293-305.
121. Thompson-Chagoyán OC, López ARM, OrtegaGS, Escobedo E, Villagómez SE. Bases para la creación de unservicio de apoyo nutricio para niños. Rev Mex Pediat 1993;60:120-4.
122. Soysa PE. Las ventajas de la alimentación al pecho Punto de vista de un país en desarrollo. En: Manual de lactancia materna. UNICEF. México: Pax-México; 1983. p. 11-30.
123. Frenk J, A larcón J, Nigenda G, Muñoz DRA, Robledo C, Vázquez JL, Ramírez CC: Patrones de empleo de los médicos: Encuesta de los desequilibrios existentes en las zonas urbanas de México. En: White K, Frenk J, Ordóñez C. Paganini JM, Starfield: Investigaciones sobre sericios de salud. Una antología. Washington; 1992. p. 1171-85.
124. Schultz P. Wage gains associated with height as a form of health human capital. Economic Growth Centre. Yale University, USA; 2002.