

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE INTERLEUCINA 2,
INTERLEUCINA 4 E INTERLEUCINA 6, EN LINFOCITOS DE NIÑOS CON
DESNUTRICIÓN CALÓRICO PROTEICA SEVERA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOL. EXP.

P R E S E N T A

Biol. Exp. Haydeé González Martínez

DIRECTORA:

Dra. María Cristina González Torres.

ASESORES:

Dra. Oralia Nájera Medina.

Dra. Leonor Rodríguez Cruz.

Dr. David Cruz Robles.

Dr. Ángel Miliar García.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. María Cristina González Torres
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa
mcgt@xanum.uam.mx

ASESORES

Dra. Oralia Nájera Medina
Departamento Atención a la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco
onajera@correo.xoc.uam.mx

Dra. Leonor Rodríguez Cruz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
leor@xanum.uam.mx

Dr. David Cruz Robles
Departamento de Patología
Instituto Nacional de Cardiología
"Ignacio Chávez"
crumis@hotmail.com

Dr. Angel Miliar García.
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación
Escuela Superior de Medicina
Instituto Politécnico Nacional
miga67@prodigy.net.mx

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Superior de Medicina en el Instituto Politécnico Nacional.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, con número de registro: 309-1.

Pertenece al Posgrado de PIFOP-CONACYT- SEP, clave C/PFPN-2002-35-32.

Para la realización de la Maestría en Biología Experimental se contó con el apoyo de CONACYT mediante la beca con número de registro 176371.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, aprobaron la tesis titulada:

Evaluación de la expresión de los genes de Interleucina 2, Interleucina 4 e Interleucina 6, en linfocitos de niños con desnutrición calórico proteica severa que presentó:

Haydeé González Martínez

El día 11 de Septiembre del 2007

Jurado de Exámen:

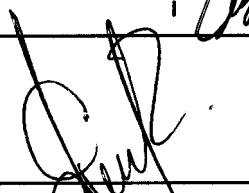
Dra. Oralia Nájera Medina
P R E S I D E N T A



Dra. Leonor Rodríguez Cruz
S E C R E T A R I A



Dr. David Cruz Robles
V O C A L



Dr. Angel Miliar García
V O C A L



AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Cristina González** por dejarme ser parte de este proyecto, por su paciencia, apoyo y confianza, que me jaló las orejas cuando fué necesario, por no rendirse y hacerme entender que nada es imposible y así ayudarme a sacar adelante este trabajo, pero sobre todo por ser una amiga que estuvo en los momentos alegres y tristes de mi vida. Mil gracias.

A la **Dra. Oralia Nájera** por los consejos y las clases que me impartió muchas veces y que me ayudaron para mejorar este trabajo.

Gracias a la **Dra. Leonor Rodríguez** por sus recomendaciones para sacar adelante este trabajo y por alentarme a no darme por vencida.

Al **Dr. David Cruz** por la revisión de esta tesis y por aceptar ser miembro de mi comité.

Al **Dr. Ángel Miliar** por recibirme con los brazos abiertos en su laboratorio y por que con su experiencia fue posible obtener los resultados necesarios para esta investigación.

Al **Dr. Aarón Domínguez** y al **Mtro. Fausto Sánchez** por que siempre que tuve una duda estuvieron en ese momento para responderla.

Al **Dr. Jaime Graniel** y a sus secretarias para obtener el material biológico necesario para concluir este trabajo.

Al **Dr. Miguel Betancourt** por sus oportunos comentarios y permitirme ser parte de su laboratorio.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mi **Mamita Mari** y a mi **Papito José Luís** por que **Dios** siendo tan grande me dio la oportunidad de ser parte de su familia y por que gracias a sus consejos cada día me convierto en un mejor ser humano con la capacidad para entender lo maravillosa que es la vida. ¡Los amo!

A mi hermano Alejandro por que perdí mucho tiempo sin su compañía, pero ahora valoro lo importante que es para mí. ¡Te quiero hermanito!

A esas personitas que hoy forman parte de mi vida que por suerte son muchas, pues claro esos son mis **Amigos** que me escucharon cuando lo necesité y que siempre estuvieron alentándome a salir adelante (ustedes saben quienes son) gracias por el apoyo incondicional.

A todos mis profesores y compañeros de laboratorio en la UAM-IZT ya que me permitieron aprender de cada uno de ustedes (**S-248, S-252 y S-255**) y que con sus sonrisas hicieron más fácil la conclusión de este trabajo.

A los compañeros del **Lab de biología molecular** de la Escuela Superior de Medicina en el IPN, que desde el primer día me hicieron sentir como si estuviera en casa.

A mis **Profesores** y a la **Universidad** por los consejos, enseñanzas y la formación académica.

Por último pero no por eso menos importante a **TODOS** los niños Mexicanos.

Y lo más importante fué que ratifique aquello que siempre repito: **NUNCA DIGAS NUNCA.**

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	i
Índice de cuadros	ii
Resumen	1
1 INTRODUCCION	3
1.1 Aspectos de la desnutrición	5
1.2 Aspectos generales del sistema inmunológico	12
1.3 Inmunológica y desnutrición	15
1.3.1 Inmunidad natural y desnutrición	16
1.3.2 Inmunidad adquirida y desnutrición	17
1.4 Citocinas	20
1.4.1 Interleucina-2	22
1.4.2 Interleucina-4	28
1.4.3 Interleucina-6	32
2 JUSTIFICACION	37
3 OBJETIVO GENERAL	38
3.1 Objetivos particulares	38
4 HIPÓTESIS	38
5 MATERIAL Y MÉTODOS	39
5.1 Características de la población de estudio	39
5.1.1 Criterios de inclusión	40
5.1.2 Criterios de exclusión	41
5.2 Aislamiento de células mononucleares	42
5.3 Obtención de RNA	42
5.4 Retrotranscripción (RT)	43

5.5 Cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real	43
5.6 Análisis estadístico	46
6 RESULTADOS	47
6.1 Características clínicas de la población estudiada	47
6.2 Amplificación para determinar la eficiencia y la sensibilidad del método de PCR en tiempo real	51
6.2.1 Curvas de rango dinámico	51
6.3 Expresión relativa de los RNAm de las interleucinas 2,4 y 6	54
7 DISCUSIÓN	61
8 CONCLUSIÓN	69
9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características físicas de la desnutrición	10
Figura 2. Subpoblaciones de linfocitos Th	15
Figura 3. Familia de receptores tipo I	21
Figura 4. Acciones biológicas de IL-2	26
Figura 5. Acciones biológicas de IL-4	31
Figura 6. Eficiencia y sensibilidad de PCR en tiempo real	52
Figura 7. Eficiencia y sensibilidad de PCR en tiempo real	53
Figura 8. Niveles de expresión relativa del gen de IL-2 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), de segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3)	56
Figura 9. Niveles de expresión relativa del gen de IL-4 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3)	58
Figura 10. Niveles de expresión relativa del gen de IL-6 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3)	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características de las dos formas de desnutrición severa ..	9
Cuadro 2. Ingestión alimentaria inadecuada / ciclo de la enfermedad .	11
Cuadro 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de cada una de las citocinas y el gen constitutivo	44
Cuadro 4. Características clínicas de los niños bien nutridos infectados	48
Cuadro 5. Características clínicas de los niños desnutridos de primer grado	48
Cuadro 6. Características clínicas de los niños desnutridos de segundo grado	49
Cuadro 7. Características de los niños desnutridos de tercer grado ..	50

RESUMEN

Se ha demostrado que el niño desnutrido es más susceptible a las infecciones, estas constituyen un factor que contribuye a incrementar la morbilidad y mortalidad cuando se asocia a la desnutrición calórico proteica (DCP). A la desnutrición se le relaciona con alteraciones en diferentes mecanismos de defensa inmunológica. Las citocinas juegan un papel central en el sistema inmunológico ya que algunas son requeridas para iniciar y amplificar la respuesta ante un agente infeccioso.

Se requieren estudios para lograr el mejor conocimiento de los cambios inmunológicos asociados con la desnutrición. El objetivo del presente trabajo fue determinar los posibles cambios en la expresión de algunos genes relacionados con la respuesta inmunológica en los niños con DCP. Utilizando la técnica de PCR en tiempo real se determinaron los cambios de expresión relativa de IL-2, IL-4 e IL-6 en un grupo de niños bien nutridos con infección y en niños desnutridos de primero, segundo y tercer grado, también se compararon las diferencias de expresión relativa entre los grados de desnutrición así como en el tipo de infección entre los pacientes

Los resultados mostraron que para los niños con desnutrición existe una disminución significativa en los niveles de expresión relativa del gen de IL-2 con respecto a los bien nutridos con infección. En cuanto al grado de desnutrición no hay diferencias significativas, lo mismo sucede con el tipo de infección entre los pacientes desnutridos y bien nutridos infectados para IL-2 con infección de tipo respiratoria y con infección de tipo gastrointestinal.

Los niveles de expresión relativa de IL-4, mostraron que los niños desnutridos presentan un aumento significativo con respecto a los niños bien nutridos con infección. Al comparar las diferencias de expresión relativa entre los grados de

desnutrición se encontró que no hay diferencias significativas para la IL-4. Algo similar sucede en las comparaciones entre los pacientes desnutridos y bien nutridos para IL-4 con infección de tipo respiratoria y con infección de tipo gastrointestinal.

Para la IL-6 se observó en los tres grupos de niños desnutridos disminución significativa de la expresión relativa con respecto a los bien nutridos infectados. Al comparar las diferencias de expresión relativa entre los grados de desnutrición no hay diferencias significativas para la IL-6. De igual forma sucede en las comparaciones que se realizaron de acuerdo al tipo de infección entre los pacientes.

Es importante señalar que los datos obtenidos en el presente trabajo coinciden con los resultados obtenidos por diferentes autores que muestran diferencias en la producción de citocinas en niños desnutridos al compararlos con niños bien nutridos infectados.

La IL-2 es requerida para iniciar y amplificar la respuesta inmunológica, por lo que la disminución en la expresión de esta citocina nos estaría hablando del deterioro en la respuesta inmune celular en niños desnutridos. Un dato interesante muestra que IL-4 inhibe la expresión de CD25 (cadena α del receptor para IL-2) con lo cual afecta la respuesta de los linfocitos a IL-2, ya que se ha observado que las células CD4⁺ y CD8⁺ que expresan CD25 en respuesta a IL-2 disminuyen en presencia de IL-4, lo cual podría explicar la disminución de la producción de IL-2. Lo que respecta a IL-6 es importante señalar que la diferencia entre los resultados reportados por los distintos investigadores para producción de IL-6 podría estar condicionada por el tipo de desnutridos estudiado, aunque algunos estudios señalan que la inactivación del gen IL-6 en ratones, no provoca ninguna anomalía grave.

Protein-calorie malnutrition (PCM) represents a significant worldwide health problem. PCM is associated with an increased risk for infections, has been shown to have broad effects on host defenses. Defects in humoral immunity, mucosal immunity, and phagocytic cell function have been identified, but the weight of evidence suggests that cell-mediated immunity is most profoundly impaired by PCM. Studies indicate that malnutrition decreases T-cell function, alters T cell number and, proportion of T cells subsets, NK cell activity, cytokine production and the ability of lymphocytes to respond appropriately to cytokine.

The purpose of this study was to assess by real time PCR the expression levels of interleukin-2 (IL-2), IL-4 and IL-6 genes. The amplification and analysis were achieved using a LightCycler (Roche Applied Science). We evaluated the expression levels of cytokine genes in peripheral blood mononuclear cells obtained from children between six months to five years old. Children were included in one of the next groups: Well-Nourished-Infected children (WNI) or Malnourished infected children with first degree malnutrition (MN1), second degree malnutrition (MN2) or third (MN3) degree malnutrition.

The data obtained in the present study showed that the expression levels of IL-2 and IL-6 were significantly diminished in malnourished children (MN1, MN2 and MN3) as compared to WNI children, in contrast, the expression level of IL-4 was significantly higher in the MN1, MN2 and MN3 groups compared with WNI. The comparison of gene expression levels between different malnutrition degrees showed no significant differences, something similar happened when we compared MN and WNI children with gastrointestinal and respiratory type infection.

It is important to indicate that the data collected in the present work agree with the results obtained by different authors, who showed differences in the production of cytokines in MN and WNI children.

In conclusion, MN children showed a lower relative expression of the IL-2 gene than WNI children, this may be related with the altered immunological status observed in these children, because IL-2 is required to initiate and to amplify the immunological response. On the other hand, the significantly higher expression of IL-4 gene could be related to the diminished capacity of proliferation observed in cells from MN children. IL-6 is related with proliferation of B cells, the lower expression level observed may be related with the altered proportion of B cells reported in malnourished children, also it is important to indicate that previous studies showed that inactivation of this gene in mice was not related with any abnormality. The altered interleukin gene expression pattern observed in malnourished children may be involved in the predisposition to infection in these children.

1. INTRODUCCIÓN

La infancia es considerada como una etapa trascendental en el proceso evolutivo del hombre, caracterizada por dos fenómenos: crecimiento y desarrollo, para lo cual es fundamental una adecuada nutrición. La buena alimentación contribuye a que el individuo crezca, se desarrolle normalmente, goce de salud, tenga buenas defensas contra las infecciones y, cuando se enferme, se recupere con facilidad.

En todos los seres vivos, el alimento representa el único vehículo natural de sustancias nutritivas necesarias para vivir y, por lo tanto, la calidad de su salud dependerá, en gran parte, de la alimentación que reciba (Puntis J. 2001).

Para la formación y mantenimiento de los tejidos, para el buen funcionamiento de todos los órganos internos y para obtener la energía necesaria para la vida y para todas las actividades, nuestro organismo requiere ingerir una gran variedad de productos químicos que se conocen con el nombre de sustancias nutritivas (De Onis M. 2000).

La nutrición a su vez está sometida a factores condicionantes: algunos fijos, como el potencial genético del individuo y otros dinámicos, como los factores sociales, económicos y culturales, que pueden actuar en forma favorable o desfavorable. Cuando se modifica el equilibrio de estos factores y se ve alterada la nutrición, se interrumpe el crecimiento y desarrollo del niño, dando lugar a la desnutrición infantil. Si la alimentación esta mal balanceada o es deficiente, el organismo sufre alteraciones bioquímicas y fisiológicas en el periodo inicial, a las que se agregan cambios patológicos, con o sin manifestaciones clínicas, en estados mas avanzados (Resano-Pérez et al., 2002).

La importancia de las condiciones nutricionales de los niños radica principalmente en las graves repercusiones sobre el desarrollo de la persona en su edad temprana, si es que ésta no es adecuada. Los posibles daños ocasionados por una mala nutrición durante los primeros años de vida, pueden ser irreversibles. Los primeros años de vida resultan de vital importancia en lo que al estado nutricional se refiere (Ulíbarri et al., 2002).

La desnutrición calórico proteica (DCP) constituye un serio problema de salud pública en nuestro país. Se debe a una dieta baja en proteínas pero con diferentes grados de ingestión de carbohidratos, lo cual conduce finalmente a que las células del organismo no cuenten con la cantidad de nutrientes esenciales para realizar sus funciones metabólicas normales (Singh, 2004).

Se ha demostrado que el niño desnutrido es más susceptible a las infecciones, las cuales constituyen uno de los factores que más contribuyen a incrementar la morbilidad y mortalidad cuando se asocia a la DCP. Tal es el caso de la diarrea, el sarampión y las enfermedades respiratorias. Por otro lado, la presencia de las infecciones promueve el desarrollo de la desnutrición, lo que implica que por lo general ésta y las infecciones aparezcan juntas y se retroalimenten entre sí. A la desnutrición se le relaciona con alteraciones en diferentes mecanismos de defensa inmunológica (Chandra, 1999)

El papel del sistema inmunológico es reconocer a los agentes invasores y luego repelerlos o destruirlos. Si bien hay muchas células especializadas que componen el sistema inmunológico, dichos componentes funcionales pueden encontrarse prácticamente por todas partes del cuerpo (Karulin et al., 2000).

Algunas moléculas importantes del sistema inmunológico son las citocinas, las cuales juegan un papel central en éste, debido a que algunas de ellas son requeridas para iniciar y amplificar la respuesta ante un agente infeccioso, por lo que la disminución o aumento en su producción pueden ser uno de los factores que podría ayudar a explicar el deterioro de la respuesta inmunológica celular observada en los niños desnutridos.

1.1 ASPECTOS DE LA DESNUTRICIÓN

La DCP es un estado patológico, inespecífico, sistémico y potencialmente reversible; es un síndrome conocido desde hace muchos años que proviene de un desequilibrio en el aporte de nutrientes a los tejidos, ya sea por una dieta inapropiada o por una utilización defectuosa de los nutrientes por parte del organismo (Nieto, 2007).

Por lo general, cuando se habla de la magnitud de la desnutrición en el país, en realidad se alude a la prevalencia de la desnutrición en la infancia, en especial entre los niños menores de cinco años, que es el grupo más vulnerable. La desnutrición infantil constituye desde hace muchos años un problema de salud pública en nuestro país. A la fecha se han hecho numerosos intentos por cuantificarla, sin embargo, la tarea no ha sido fácil. A través de los censos de población no es posible determinar su magnitud, ya que estos no incluyen indicadores para evaluarla. Por otra parte, las encuestas que se han realizado desde la década de los cincuenta, en un principio por el Hospital de Enfermedades de la Nutrición y posteriormente por otras instituciones, dan información muy diversa. La desnutrición no tiene una distribución homogénea a lo largo del territorio nacional, entre las zonas rurales y las urbanas, ni aún entre las distintas zonas rurales, donde su prevalencia es mayor, lo que se ha establecido es que la DCP es más frecuente en las zonas rurales indígenas y urbanas marginales (Sepúlveda-Amor et al., 1985).

La Encuesta Nacional de Alimentación y Nutrición (ENNA) del 2006 muestra que 472,890 niños menores de cinco años presentaron bajo peso (5%), 1,194,805 talla baja (12.7%) y alrededor de 153 mil niños con adelgazamiento por causas patológicas o emaciados, en todo el país. En el ámbito nacional, la desnutrición en niños menores de cinco años disminuyó de acuerdo a las encuestas de 1998, 1999 y 2006 (Fernández et al., 2006). Las reducciones más pronunciadas de la desnutrición infantil se concentraron en las áreas rurales y en el sur del país. Actualmente, 12.7% de los niños menores de 5 años tiene una talla baja para su edad cronológica o desmedro. En 1999 la población infantil con desmedro, era del 17.8% (Zurita y Hernández, 2006).

A nivel mundial la DCP es un problema de grandes dimensiones, se concentra de manera principal en los países en vías de desarrollo, en donde provoca cada año la muerte de más de la mitad de los casi 12 millones de niños menores de cinco años que la padecen. Los cálculos, sobre prevalencia de peso inferior al normal se basan en los datos más recientes que dispone el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) realizada en 110 países en el período de 1996 a 2005, lo que abarca el 98% de la población menor de cinco años. En ésta encuesta se observa que uno de cada cuatro niños y niñas menores de cinco años (27%) pesa menos de lo normal, es decir, aproximadamente 146 millones de niños y niñas, de los países en vías de desarrollo. Casi tres cuartas partes de esos niños y niñas viven en 10 diferentes países (UNICEF, 2006).

La DCP se produce cuando la dieta que consumen los niños está constituida por una mayor cantidad de carbohidratos que de proteínas, lo cual conduce finalmente a que las células del organismo no cuenten con la cantidad de nutrientes esenciales (proteínas, vitaminas y micronutrientes) para realizar sus funciones metabólicas normales (Singh, 2004).

Las causas de la desnutrición pueden ser divididas en dos categorías llamadas primarias y secundarias. La desnutrición primaria se atribuye a una dieta inadecuada en calidad, cantidad o en ambas. Ésta afecta a lactantes y a niños de estratos sociales con graves carencias socio-económicas y culturales. La desnutrición secundaria se debe al aprovechamiento inadecuado de alimentos recibidos en cantidad y calidad adecuada, en este caso la pérdida de peso es transitoria y sintomática de una enfermedad que altera el apetito e incrementa los requerimientos calóricos y proteicos (enfermedades infecciosas agudas o crónicas, neoplasia, etc.), modificando la absorción de los alimentos o su metabolismo (Singh, 2004).

La desnutrición primaria se manifiesta en sus primeras etapas por pérdida o falta de peso, observándose peso inferior a lo normal y finalmente un consumo de las propias reservas de grasas y proteínas. La desnutrición afecta principalmente a infantes que se encuentran en pleno crecimiento, ya que tienen requerimientos nutricionales que son más elevados, específicos y difíciles de satisfacer (Nájera et al., 2006).

En estudios nutricionales realizados en México, se han establecido tres grados de desnutrición primaria basados en la relación peso corporal-edad cronológica (Gómez et al., 1956):

a) Desnutrición leve o de primer grado:

Este tipo de desnutrición ha afectado al organismo por poco tiempo y el individuo presenta una falta de peso corporal del 10% al 24% del correspondiente a su edad cronológica.

b) Desnutrición moderada o de segundo grado:

Es mucho más marcada que la anterior con una disminución de peso del 25% al 39% correspondiente a la edad cronológica del paciente. Por lo general requiere hospitalización.

c) Desnutrición severa o de tercer grado:

Las reservas nutricionales del organismo están prácticamente agotadas con un déficit de peso de más del 40% del promedio correspondiente para la edad.

El papel que juegan las infecciones en el desarrollo de los casos de desnutrición severa es importante, ya que la infección por sí misma tiende a agotar la energía metabólica del organismo y de esta forma individuos con desnutrición moderada, pueden pasar rápidamente al grado severo (Pelletier et al., 1996).

Dentro de la desnutrición severa se conocen dos tipos: Marasmo y Kwashiorkor, que se manifiestan mediante cuadros clínicos muy característicos:

1. Marasmo

Se ha considerado que este tipo de desnutrición se debe a una dieta baja tanto en contenidos proteicos como en calorías. Se puede observar comúnmente en el primer año de vida, cuando existe rechazo de la lactancia materna y en los casos de sustitución de la lactancia materna con suplementos alimenticios que también pueden ser rechazados por el neonato. Sin embargo puede ocurrir a cualquier edad, incluso en la adulta a causa del hambre (Nájera et al., 2006). Fenotípicamente el marasmo se caracteriza por la falta extrema de crecimiento, atrofia de los músculos, cara delgada, marchita, apariencia de “ancianito”, diarrea y signos de deshidratación (Figura 1).

2. Kwashiorkor

Término que significa “enfermedad que aparece cuando se reemplaza a un niño por otro en el pecho materno”. Se le ha relacionado con una dieta baja en proteínas pero que contiene calorías en forma de carbohidratos (no es inanición), puede ocurrir en diferentes edades desde la infancia hasta la madurez, pero es más común durante el periodo de crecimiento de 1 a 3 años, donde el niño tiene una necesidad alta de

proteínas para el crecimiento y está recibiendo con frecuencia una dieta de difícil digestión, voluminosa y principalmente rica en carbohidratos (Nájera et al., 2006) (Figura 1).

Algunas de las características presentes en los niños con kwashiorkor son:

Edema, anemia, falta de crecimiento, cambios psicológicos, músculos débiles o atrofiados, cambios en la textura y coloración del pelo y de la piel e hígado graso. En el Cuadro 1 se presenta una comparación de las características más importantes de ambas formas de desnutrición severa.

Cuadro 1. Características de las dos formas de desnutrición severa. (Tomado de: Flores-Huerta, 1995).

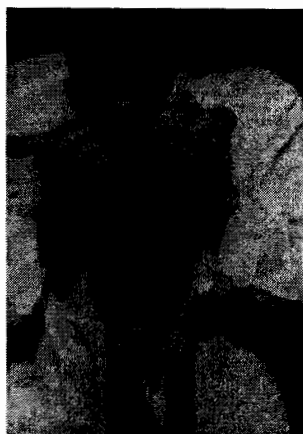
	MARASMO	KWASHIORKOR
Inicio	Primer año de vida	Segundo año de vida
Se asocia	Destete temprano	Destete tardío
Evolución	Crónica	Aguda
Enfermedades	Frecuentes respiratorias y gastrointestinales	Menos frecuentes respiratorias y gastrointestinales
Apariencia	Emaciado	Edematoso
Conducta	Irritable, llora mucho	Apático, triste, irritable
Tejido muscular	Muy disminuido	Muy disminuido
Tejido adiposo	Muy disminuido	Presente pero escaso
Piel	Seca, plegadiza, sin dermatosis	Húmeda, con dermatosis
Cabello	Normal	Alteraciones frecuentes
Recuperación	Prolongada	Breve

Desnutrición mixta (Kwashiorkor marasmáticos):

Esta forma edematosa de DCP combina características clínicas del marasmo y del kwashiorkor. La característica clínica generalizada en estos niños es el edema como en el kwashiorkor, con o sin lesiones de la piel, desgaste del músculo y disminución de la grasa subcutánea como en el marasmo. Cuando el edema desaparece durante el tratamiento temprano, los pacientes adquieren las peculiaridades del marasmo. Las alteraciones bioquímicas son las mismas que se encuentran en el marasmo y kwashiorkor, pero las alteraciones de la deficiencia proteínica severa es la que usualmente predomina (Mora, 1999).

La desnutrición no es un fenómeno de todo o nada comprende, como se puede intuir, un amplio margen que van desde deficiencias subclínicas de elementos alimentarios determinados, hasta las situaciones extremas que son marasmo y kwashiorkor, que amenazan la vida. Además, la desnutrición comprende un complejo de deficiencias calóricas y de numerosos nutrientes específicos que incluyen proteínas, minerales y vitaminas (Chandra, 1999).

Figura 1. Características físicas de la desnutrición. (Tomado de: Colección FAO 2002).



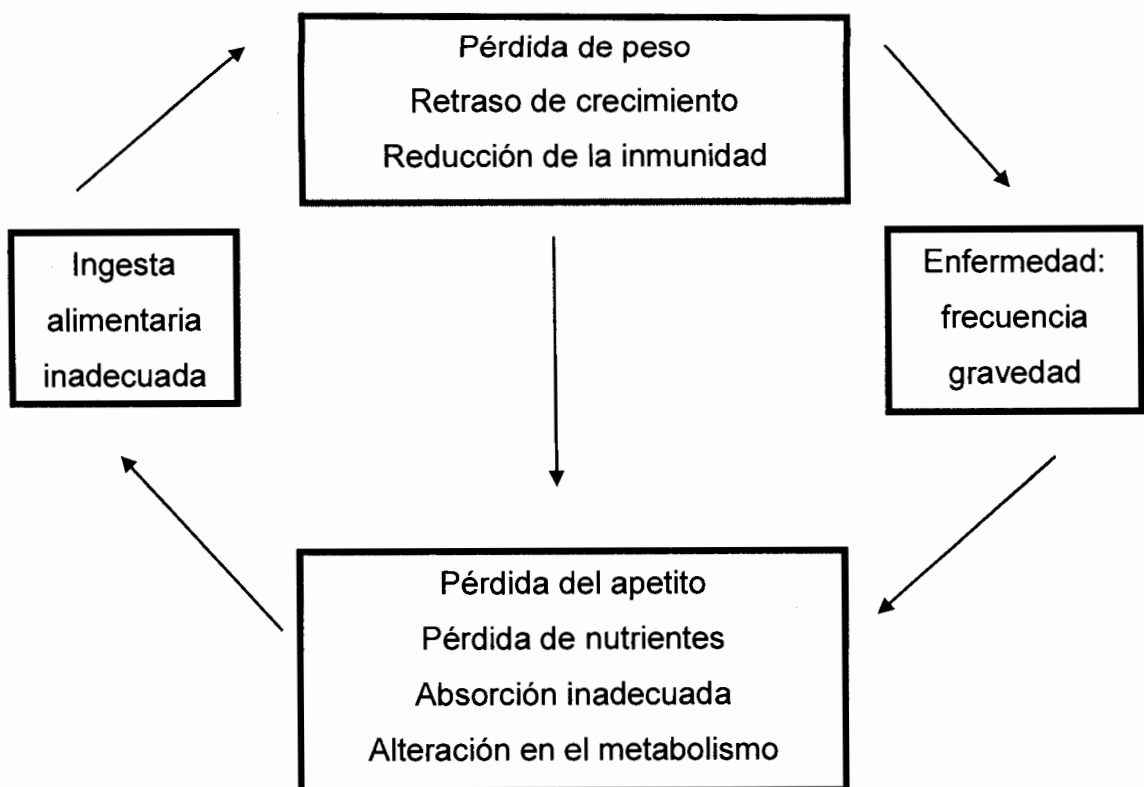
Marasmo



Kwashiorkor

El estado nutricional-metabólico puede tener una influencia notable sobre la evolución de las enfermedades por agentes biológicos. La desnutrición proteico-calórica frecuentemente se asocia con infecciones gastrointestinales y respiratorias agudas y contribuye a la morbilidad y mortalidad en los dos primeros años de vida, lo cual es una característica epidemiológica de los países en desarrollo. La persistencia del círculo vicioso desnutrición-infección-desnutrición, ocasiona retardo en el crecimiento físico del niño y a menudo se acompaña de déficit en su desarrollo mental y función cognoscitiva (Cuadro 2) (Hernán, 2001; Barreto et al., 2000).

Cuadro 2. Ingestión alimentaria inadecuada / ciclo de la enfermedad. (Tomado de: Bellamy, 1998).



Por sí mismas, las infecciones desencadenan disminución de la absorción de nutrientes como en el caso de la diarrea o las parasitosis, incremento de las pérdidas urinarias de nitrógeno y electrolitos, así como un aumento del gasto energético basal (Cunningham-Rundles et al., 2005) . Si durante el episodio de infección no se aportan los nutrimentos necesarios para crecer y compensar el gasto por la enfermedad, el niño utilizará sus propias reservas y dejará de crecer, sus mecanismos inmunitarios se verán comprometidos y se repetirán nuevamente las infecciones, lo que conducirá a las formas graves de la DCP (Hughes y Kelly, 2006).

1.2 ASPECTOS GENERALES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO

El sistema inmunológico es importantísimo y constituye un elemento central para todos los sistemas de protección. El sistema inmunológico comprende una compleja red celular y molecular diseñada para brindarle al organismo protección contra invasores extraños que puedan provocar enfermedades o afectar su homeostasis.

Es el papel del sistema inmunológico reconocer a los agentes invasores y luego repelerlos o destruirlos. Si bien hay muchas células especializadas que componen el sistema inmunológico, dichos componentes funcionales pueden encontrarse prácticamente por todas partes del cuerpo.

Existen dos mecanismos inmunológicos para defender al organismo del ataque de bacterias, virus y otros agentes extraños; el primero es conocido como inmunidad natural o innata y el otro como inmunidad adquirida o específica. Juntos, estos dos componentes, brindan un sistema de protección notablemente efectivo.

El sistema inmunológico innato maneja exitosamente muchas infecciones, sin causar ninguna enfermedad o problema de salud. Las infecciones que no se pueden

manejar efectivamente por el sistema innato accionan el sistema inmunológico adaptativo, y juntos trabajan para eliminar al organismo invasor (Vásquez-Garibay, 2003).

La inmunidad natural constituye la primera línea de defensa del organismo y en ella participan las barreras físicas, las cuales actúan sistemáticamente a escala global dentro del cuerpo, pero también funcionan más localmente, como puede ser, la piel, el epitelio y los tejidos mucosos; sustancias secretadas tales como el ácido gástrico, el moco y las lisozimas, para brindar protección a sitios específicos del cuerpo. Dentro de esta inmunidad innata, también encontramos a las células fagocitarias como macrófagos, monocitos y neutrófilos, además de las células asesinas naturales (NK) (Mac Donald y Nabholz, 1986).

Por otra parte, la inmunidad adquirida puede ser de dos tipos: inmunidad celular e inmunidad humoral. La inmunidad humoral es mediada por linfocitos B, los cuales son los responsables de reconocer al antígeno específico y de eliminarlo. En la inmunidad celular o inmunidad mediada por células, los linfocitos T son los encargados del control y de la alta especificidad de este sistema (Kägi et al., 1994).

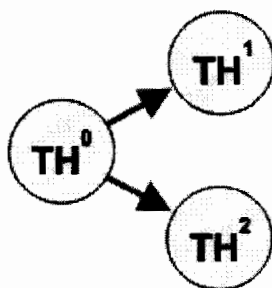
Existen dos clases principales de linfocitos: los linfocitos B, los cuales se transforman en células plasmáticas y son los encargados de producir y secretar anticuerpos, y los linfocitos T dentro de los cuales existen dos subclases principales: los llamados T cooperadores ($CD4^+$) y los citotóxicos ($CD8^+$). La clasificación de las subpoblaciones de linfocitos B generalmente se realiza tomando en cuenta la clase de inmunoglobulina que sintetizan (McGuirk y Mills, 2002).

Las subpoblaciones de los linfocitos T pueden ser identificadas de acuerdo a sus funciones a través de sus marcadores de membrana. La clasificación de los linfocitos T se basa en el conjunto de antígenos CD ("cluster of differentiation", por sus siglas

en inglés) que expresan en la superficie de la membrana. Sin embargo, conviene tener presente que no siempre ha sido posible encontrar marcadores de membrana de los linfocitos T asociados exclusivamente a una de sus funciones. Los linfocitos T cooperadores o colaboradores se caracterizan porque presentan sobre su membrana el antígeno CD4⁺, de estos se han identificado dos subpoblaciones, las cuales han sido denominadas Th1 y Th2 (Rojas-Espinosa, 1996).

Las dos subpoblaciones de linfocitos Th expresan el mismo marcador de membrana CD4, pero se pueden diferenciar entre sí porque las citocinas que producen están dirigidas a colaborar con la respuesta de distintas células. Los linfocitos Th1 intervienen en la respuesta inicial del sistema inmunológico para la defensa contra los microorganismos. Por otra parte, los linfocitos Th2 están relacionados principalmente con la producción de anticuerpos contra antígenos solubles. Las dos subpoblaciones proceden de células que expresan un fenotipo en común, Th0, capaz de sintetizar todas las diferentes citocinas que posteriormente serán producidas solamente por uno u otro tipo de células colaboradoras (McGuirk y Mills, 2002). Aunque ambas subpoblaciones de linfocitos T producen varias citocinas en común por ejemplo: Interleucina 3 (IL-3), factor estimulante de la formación de colonias de los granulocitos y monocitos (GM-CSF) y otras; los linfocitos Th1 producen IL-2, interferón gama (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), mientras que la producción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, es exclusiva de los linfocitos Th2. Estas citocinas son moléculas mediadoras a través de las cuales los linfocitos T controlan y coordinan la participación de otras células en la respuesta inmunológica (Romagnani et al., 2000).

Figura 2. Subpoblaciones de linfocitos Th



La otra subclase de linfocitos T, son los linfocitos T CD8+, los que al ser activados adquieren la capacidad de lisar células blanco que presentan un determinante antigénico reconocido por los linfocitos T citotóxicos (CTL), también son clasificados en Th1 y Th2 de acuerdo al patrón de citocinas que produzcan (Romagnani et al., 2000).

1.3 INMUNOLOGIA Y DESNUTRICIÓN

La inmunocompetencia constituye un barómetro sensible y funcional de la nutrición y por ello se relaciona estrechamente con la DCP. Se debe considerar a los desnutridos como pacientes inmunodeficientes. La desnutrición conlleva alteraciones del sistema inmunológico, que afectan tanto a los mecanismos inespecíficos como los de defensa específica, en especial a la inmunidad celular, lo que favorece que las infecciones sean mas frecuentes, prolongadas y graves (Chandra, 1999; Nájera et al., 2006).

Estudios epidemiológicos y clínicos han señalado que las deficiencias nutricionales conducen a un aumento significativo de la susceptibilidad a la infección, situación que es especialmente común en los países en desarrollo y en áreas marginales de

países desarrollados donde la desnutrición y la infección frecuentemente coexisten (Vásquez-Garibay, 2003).

1.3.1 INMUNIDAD NATURAL Y DESNUTRICION

La primera barrera de defensa de un individuo contra un microorganismo es la integridad física de la piel y las mucosas; las deficiencias nutricionales producen alteraciones funcionales y estructurales en los epitelios de la piel y del recubrimiento respiratorio y gastrointestinal, lo que disminuye la resistencia a infecciones (Hoffman-Goetz, 1986).

Los primeros órganos y tejidos afectados clínicamente por las deficiencias nutricionales son el pelo en el que se puede observar el efecto de la deficiencia de proteínas. Pierde su brillo, se decolora, se torna seco y fino y se desprende fácilmente sin producirse dolor al arrancar un mechón (Scherbaum y Fürst, 2000)..

En los ojos se puede observar el efecto de la deficiencia de varios nutrimentos, especialmente algunas vitaminas. La deficiencia de vitamina A produce sequedad de la conjuntiva, manifestada por la pérdida de brillo característico de la cornea (Scherbaum y Fürst, 2000).

En la piel, se pueden observar una serie de lesiones debidas a la deficiencia de algunas vitaminas. La deficiencia de vitamina A produce hiperqueratosis folicular, que se caracteriza por piel seca y resquebrajada. La deficiencia de niacina produce cambios muy característicos en la piel de las partes expuestas, como manos, brazos, cara y cuello; también en codos, rodillas y axilas. La piel toma un color amarillento-café, se vuelve escamosa y muy susceptible a infecciones secundarias. La deficiencia inmensa de ácido ascórbico (escorbuto), produce pequeñas hemorragias.

La deficiencia de riboflavina produce lesiones seborreicas en la piel alrededor de nariz y de orejas, que tiene aspecto húmedo y enrojecido (Reyes, 2002).

En cuanto los órganos linfoides primarios, los primeros estudios realizados en organismos desnutridos mostraron una marcada disminución en el tamaño del timo. Este fenómeno fue observado desde 1845 por Simon, quien llamó al timo “el barómetro de la desnutrición”, debido a la sensibilidad de esta glándula al estado nutricional de los individuos (Mugerwa, 1971).

En general, tanto en el hombre como en animales de laboratorio, la DCP se manifiesta en la disminución del tamaño y peso del timo. El grado de atrofia observado dependerá de la edad en la que se presente la desnutrición. En el timo, una concentración de proteína baja en la dieta produce reducción en la actividad fisiológica, con disminución concomitante de su peso. En forma similar, diversos estudios en niños desnutridos han demostrado alteraciones no sólo en el tamaño y peso del timo, sino también modificaciones a nivel estructural y celular. A nivel histológico, en este mismo órgano, se ha observado pérdida en la diferenciación de las regiones cortical y medular, mostrando pocos linfocitos y cuerpos de Hassal alargados, degenerados y ocasionalmente calcificados. Aún cuando los efectos de la DCP sobre el timo son graves, no parecen ser permanentes ya que en pacientes con DCP que fueron sometidos a tratamientos nutricionales se obtuvo recuperación del tamaño y del peso del timo, hasta alcanzar los niveles normales (Hoffman-Goetz, 1986).

1.3.2 INMUNIDAD ADQUIRIDA Y DESNUTRICION

Se ha observado que la respuesta mediada por células en los organismos con DCP se halla considerablemente dañada, lo que se manifiesta por la disminución en la reacción de hipersensibilidad retardada y en la baja respuesta *in vitro* de sus

linfocitos a mitógenos. Estas alteraciones suelen ser mucho más graves en los pacientes con kwashiorkor que las que se han observado en los niños con marasmo (Chandra, 1991a).

En los tejidos linfoides secundarios o periféricos se inicia la respuesta inmunológica adaptativa, donde se ha determinado que la DCP provoca daños en todo el tejido linfoide. En el bazo se presenta disminución de las células linfoides alrededor de los capilares, en los ganglios linfáticos las áreas paracorticales dependientes del timo muestran un bajo número de linfocitos (Chandra, 1999).

En relación con las subpoblaciones de linfocitos circulantes en niños desnutridos se observó una disminución significativa en el número de linfocitos T CD4+ cooperadores/activadores, T CD8+ supresores y T totales, pero la subpoblación más fuertemente alterada fue la primera, lo que posiblemente se debió a una diferenciación incompleta de los precursores de los linfocitos T (Chandra, 1991a). Se ha determinado que estas anomalías fueron rápidamente revertidas cuando se sometió a los pacientes a terapias de nutrición adecuada.

También se ha reportado una disminución en células T CD4+ y CD8+ activadas (CD69) con fitohemaglutinina (PHA) en niños desnutridos comparados con bien nutridos, lo cual se observó que es un evento directamente relacionado con la inmunodeficiencia en DN (Nájera et al., 2001a). Otro reporte señala que no hay diferencias significativas en las subpoblaciones de linfocitos T de niños desnutridos comparándolos con niños bien nutridos infectados, pero que estos últimos presentan un aumento en la proporción de linfocitos B, esta tendencia puede estar asociada con la inmunodeficiencia observada en niños desnutridos (Nájera et al., 2004). Con relación a las células de memoria CD45RO (células que han entrado en contacto con un antígeno), se ha encontrado disminución de células CD4+CD45RO+ en sangre periférica, tanto en niños con desnutrición moderada o severa. Este tipo de

alteraciones se relaciona con la capacidad de diferenciación de los linfocitos, dado que los niños desnutridos padecen de diferentes infecciones, por lo que se sabe que

han entrado en contacto con una gran variedad de antígenos y la respuesta esperada sería un mayor porcentaje de células CD4+ de memoria como se observó en niños bien nutridos infectados (Nájera et al., 2001b).

Adicionalmente en niños desnutridos se han realizado estudios para valorar los mecanismos de la respuesta humoral, ya que se ha cuantificado el porcentaje de células B circulantes y los niveles de inmunoglobulinas. Sin embargo los resultados han sido muy variados y lo más aceptado es la disminución de la IgA (inmunoglobulina A) (De Abreu et al., 2002).

Cualquier análisis de los efectos de las deficiencias nutricionales sobre la respuesta inmunológica tiene que ser entendida en el marco de dos aspectos fundamentales:

1. 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 inmunológica sea fisiológicamente normal.

2. Es necesario considerar además, que la desnutrición es un síndrome complejo donde pueden coexistir alteraciones de diferente naturaleza simultáneamente.

Por lo tanto, la afectación de diversos componentes del sistema inmunológico puede ser el resultado de una o más deficiencias nutricionales del individuo (Chandra, 1991b).

1.4 CITOCINAS

Las citocinas comprenden un amplio grupo de glicoproteínas de bajo peso molecular, (por lo general menos de 30 kDa) que poseen la capacidad de modular la actividad funcional de células individuales y de tejidos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Estas moléculas se producen en respuesta a microorganismos y otros antígenos, median y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias. La producción de las citocinas suele ser breve (transitoria), limitada al lapso que dura el estímulo (es decir, el agente extraño). En muchos casos, ello se debe a que los correspondientes ARNm tienen una vida media corta (Chtanova y Mackay 2001).

Considerando a las diversas citocinas, éstas pueden exhibir una o varias de las siguientes propiedades (Karulin et al., 2000):

Pleiotropía: Múltiples efectos al actuar sobre diferentes células.

Redundancia: Varias citocinas pueden ejercer el mismo efecto.

Sinergismo: Dos o más citocinas producen un efecto que se potencia mutuamente.

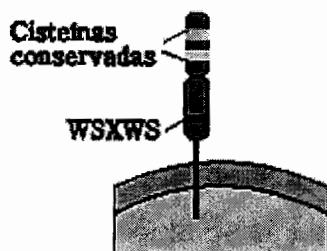
Antagonismo: Inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos.

Aunque existen muchos tipos de células productoras de citocinas dentro de la respuesta inmunológica innata, los macrófagos son las células más comprometidas en la síntesis de estas moléculas, mientras que en la respuesta específica lo son las células T colaboradoras (Th) activadas por el contacto con las correspondientes células presentadoras de antígeno (CPA) ya que sus citocinas son esenciales para que se lleve a cabo, de forma adecuada, la respuesta inmunológica (Karulin et al., 2000).

Las citocinas se unen a receptores específicos de la membrana de las células donde van a ejercer su función, iniciando una cascada de transducción de señales intracelulares que alteran el patrón de expresión génica, de modo que esas células diana producen una determinada respuesta biológica. La afinidad de cada receptor hacia su citocina correspondiente suele ser bastante alta. Al igual que con las hormonas, la acción de las citocinas se puede clasificar en: Autocrina, Paracrina y Endocrina (en pocas ocasiones) (Toshitkatsu y Akihiko, 2002).

Existen dos clases de receptores de membrana para citocinas: I) Receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que poseen varios dominios extracelulares de tipo Ig. II) Receptores de citocinas tipo I, que pertenecen a la familia de receptores alfa, beta y gamma. Se han reconocido en este grupo las siguientes citocinas: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, GM-CSF (Taiguchi., 1988). La mayor parte de los receptores de citocinas del sistema inmunológico pertenecen a la familia de clase I. Todos sus miembros tienen en común, una proteína anclada a membrana, con un dominio extracelular en el que hay al menos un motivo característico llamado CCCC (cuatro cisteínas cercanas en posiciones equivalentes) y el llamado motivo WSXWS (Trp-Ser-X-Trp-Ser). Tras su porción transmembranal se encuentra una larga cola citoplásmica con ciertas tirosinas susceptibles de fosforilación (Choy E y Panayi G. 2001).

Figura 3. Familia de receptores tipo I. (Tomado de Abbas, 2002).



La mayor parte de los receptores de clase I poseen dos proteínas de membrana: I) Cadena alfa, que es la subunidad específica de reconocimiento de la citocina, sin capacidad para enviar señales al citoplasma. II) Cadena beta, que es la subunidad transductora de señales. A menudo no es específica de una sola citocina, sino que es compartida por receptores de otras citocinas, lo cual permite explicar dos cualidades: la redundancia y el antagonismo (Cooper et al.,2006).

Las citocinas, son factores importantes relacionados con el desarrollo de la respuesta inmunológica a nivel celular y humoral. A continuación se enuncian las características principales de las Interleucinas 2, 4 y 6.

1.4.1 INTERLEUCINA-2

CARACTERÍSTICAS GENERALES

La interleucina 2 (IL-2) es un factor de crecimiento para los linfocitos T estimulados por antígenos o mitógenos, es responsable de la expansión clonal de las células T tras el reconocimiento del antígeno. Por este motivo, la IL-2 se denominó inicialmente factor de crecimiento de células T. La IL-2 actúa principalmente sobre las mismas células que la producen, es decir, actúa como factor de crecimiento autocrino. A pesar de su designación como IL-2 fue realmente la primera citocina que se identificó y se caracterizó a nivel molecular (Gullberg y Smith, 1986).

El estudio de IL-2 se ha realizado en varias fases: el descubrimiento de la actividad, el descubrimiento de la molécula, la identificación del receptor y el descubrimiento del gene que la codifica. El primer descubrimiento se basó en una observación hecha por Morgan y colaboradores (1976) quienes determinaron que el medio condicionado por linfocitos poseía una actividad que parecía única, en el sentido de que promovía la proliferación continua de las células T. También se demostró actividad del factor soluble de crecimiento de células T (TCGF) que era responsable

del crecimiento a largo plazo de la célula T, la cual se iniciaba y se mantenía después del estímulo del antígeno. La segunda fase en el proceso del descubrimiento fue la identificación bioquímica, aislamiento, caracterización y purificación de la molécula ahora conocida como IL-2 (Robb et al., 1981). La tercera fase del descubrimiento fue hecha por el grupo de Tadamitsu Taniguchi, que fueron los primeros en aislar DNA que codificó para una proteína que tenía la misma actividad detectada para TCGF (Taniguchi, 1988; Löhning et al 2002).

CARACTERÍSTICAS DEL GEN

En 1983 se clono el gen humano de IL-2 (Taniguchi, 1988). También se encontró que el gen de IL-2 tiene una secuencia del promotor homóloga a la del gen del IFN- γ del humano (Fujita et al., 1983).

El gen de la IL-2 se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 4 en las bandas 26-28 (4q26-28), la inducción de este gen es controlada a nivel transcripcional por elementos amplificadores (enhancer) ubicados hacia 5'. La expresión del gen de IL-2 esta controlado por modificaciones post-transcripcionales, al parecer mediada por secuencias ricas en AU presentes en la región 3' no codificadora del RNAm de IL-2. Tiene un peso molecular de 15 kb (Seigel et al., 1984; Thomson, 1994).

FACTORES DE TRANSCRIPCION DE IL-2

En la parte 5' del gen de la IL-2 se encuentra una region de aproximadamente trescientos pares de bases (entre las bases -319 y -52) que contiene los sitios de unión para factores como, NF- κ B, NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cells), factores octaméricos, y además un sitio de unión conocido como CD28RE (CD28 responsive element). Estudios moleculares han demostrado que la acción conjunta

de estos factores es necesaria para conseguir una activación completa del gen de la IL-2. La expresión de alguno de estos factores está restringida a determinados tipos celulares, como es el caso de NF-AT.

NF-AT y otros factores de transcripción activan el gen de la IL-2, el ARNm de la IL-2 es producido y transportado fuera del núcleo; después los ribosomas traducen el ARNm en la proteína IL-2, la cual es procesada en el retículo endoplásmico y por último la IL-2 es exportada fuera de la célula T (Gómez del Arco et al., 2000).

CARACTERÍSTICAS DE LA PROTEÍNA

IL-2 es una glicoproteína de entre 14 y 17 kD que está plegada formando una proteína globular que consta de cuatro hélices α y es producida principalmente por la subpoblación de linfocitos Th1. La estructura representa el prototipo de las citocinas de cuatro hélices α que interacciona con los receptores de citocinas tipo I (Brandhuber et al., 1987).

PRODUCCIÓN

La IL-2 es producida por los linfocitos T CD4⁺ y, en menores cantidades, por las células T CD8⁺. La activación de las células T por antígenos y coestimuladores hace que se realice la transcripción del gen de la IL-2 para la posterior síntesis y secreción de esta proteína. La producción de IL-2 es transitoria, presentándose la secreción máxima entre 8 a 12 horas después de la activación. Para poder sintetizar IL-2, los linfocitos Th1 deben estar activados, es decir, deben haber reconocido los determinantes antigénicos expuestos por una CPA y deben, además, haber recibido la estimulación de la IL-1 que liberan estas células. Se ha observado que los linfocitos Th1 que se encuentran en reposo no producen IL-2. Una vez activados,

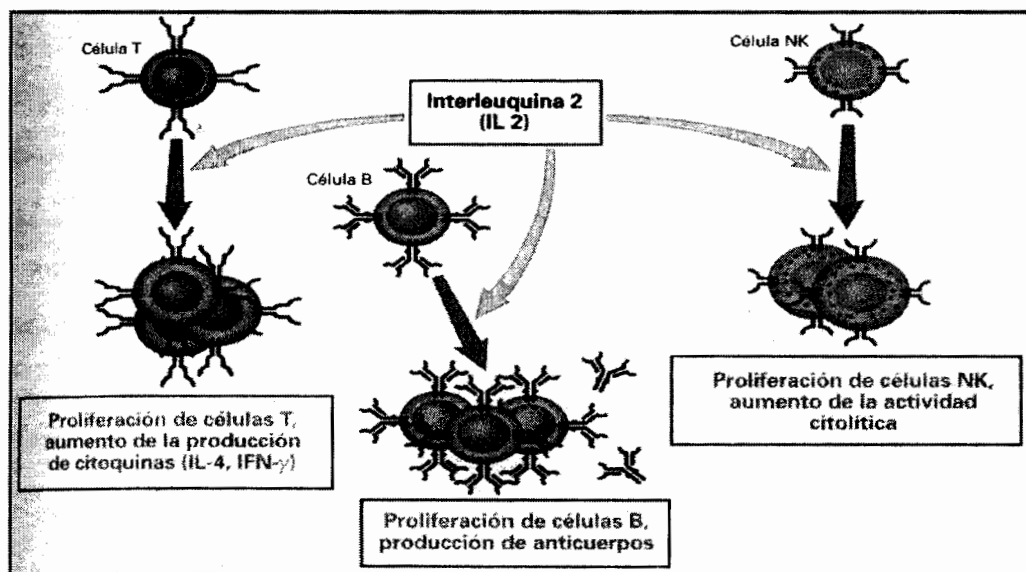
comienzan a secretar IL-2 y ejercen sus principales funciones a través de esta citocina, la cual es una señal coestimuladora para la proliferación de otras células, generalmente linfocitos citotóxicos, que tienen sobre su membrana los receptores para IL-2 (IL-2R) (Ellery y Nicholls, 2002). Una vez liberada al exterior, esta citocina actúa sobre las células que expresan su receptor y les estimula sus principales actividades. La unión de la IL-2 a su receptor estimula a los linfocitos T para que pasen de la fase G1 a la fase proliferativa. Previamente, el linfocito T en reposo que se encontraba en la fase G₀ había pasado a la fase G1 después de su interacción con el antígeno que le presentó alguna CPA. Una vez formado el complejo (IL-2/IL-2R) tiene una vida media de 25-30 minutos, antes de que sea endocitado (Rickert et al., 2005).

ACCIONES BIOLÓGICAS

La principal acción de la IL-2 es autocrina, pero puede estimular la proliferación de algunas células T adyacentes actuando como factor de crecimiento paracrino. Además de estimular la proliferación de las células T, la IL-2 aumenta la producción de otras citocinas, como IFN- γ e IL-4, por las células T (Caligiuri et al., 1990). La IL-2 estimula la proliferación y diferenciación de otras células del sistema inmunológico. La capacidad de ésta interleucina para estimular la citotoxicidad depende tanto de su tasa de producción por las células Th1 como de la facilidad para expresar el IL-2R por parte de los linfocitos T_c y de los macrófagos. Entre las células sensibles al efecto de la IL-2 se encuentran los linfocitos T citotóxicos que han sido activados por antígenos, generalmente virales, y también las células NK que se ocupan de la lisis inespecífica de otras células. La IL-2 y posiblemente también el IFN- γ son las únicas moléculas conocidas que pueden inducir la formación de las células LAK (en inglés "lymphokine activated killer cells"), las cuales resultan sumamente efectivas para lisis

células tumorales o formar parte de la inmunidad celular mediada por anticuerpos (inmunidad específica) (Fontenot y Rudensky, 2004).

Figura 4. Acciones biológicas de IL-2. (Tomado de Abbas, 2002).



RECEPTOR

El receptor de IL-2 (IL-2 R) consta de tres proteínas unidas de forma no covalente, denominadas α , β y γ , siendo las dos últimas miembros de la familia de receptores de citocinas tipo I. Las cadenas α y β intervienen en la unión a la citocina, y las cadenas β y γ intervienen en la transducción de señales (Rickert et al., 2005).

IL-2R α es un polipéptido de 55 kD que aparece tras la activación de la célula T y que originalmente se denominó antígeno TAC (del inglés, T activation). La IL-2 se une a la cadena α aislada con baja afinidad, y esta unión no da lugar a una respuesta biológica detectable. La proteína IL-2R β se expresa en niveles bajos en las células T

en reposo asociada a la cadena común γ (γc) conocida así porque está presente en los receptores de otras citocinas, como IL-4, IL-7 e IL-15 (Katsiari y Tsokos, 2006).

Debido a que la estimulación por el antígeno potencia la expresión del IL-2R completo, las células T que reconocen al antígeno también son las células que proliferan preferentemente en respuesta a niveles fisiológicos de IL-2 producidos durante las respuestas inmunológicas adaptativas. La unión de IL-2 a su receptor da lugar a la activación de varias vías de transducción de señales, incluida la vía de JAK/STAT, exclusiva de las citocinas (Kiyoshi y Shizuo, 2002).

HALLAZGOS RECIENTES

Las consecuencias de una disfunción en la expresión de IL-2 han sido estudiadas en animales transgénicos que expresan, ya sea el gen humano de IL-2 o el receptor para IL-2. Los ratones que llevan el gen humano para IL-2 o el receptor, expresan constitutivamente IL-2 en el bazo, timo, médula ósea, pulmones, músculo y piel. Entre otras cosas, estos animales muestran un pronunciado retraso en el crecimiento y mueren prematuramente. Histológicamente se observa una pérdida selectiva de células de Purkinje en el cerebelo y una infiltración focal de linfocitos, terminando en neumonía. El bazo muestra un incremento masivo de células con fenotipo Th1 (Lodolce et al., 2002). Ratones transgénicos que expresan constitutivamente IL-2 murina en los islotes pancreáticos, mueren tempranamente, debido a una respuesta inflamatoria predominante de macrófagos que destruye el páncreas. Animales con niveles menores de IL-2 sobreviven y tienen islotes que llegan a ser invadidos por infiltrados linfocitarios y desarrollan autoinmunidad en contra de antígenos propios de los islotes (Yuko et al., 2005).

Los ratones deficientes en IL-2 desarrollan una enfermedad inflamatoria del intestino en estados tardíos (pasadas las 6 semanas de edad), con una sorprendente similitud histológica y clínica a la colitis ulcerativa en humanos. Con respecto a las respuestas inmunológicas *in vivo*, los ratones knock-out para IL-2, presentan respuestas primarias de células T citotóxicas contra vaccinia y el virus de la coriomeningitis linfocítica. La respuesta de las células T cooperadoras está disminuida, pero biológicamente es funcional. Estas observaciones sugieren que otras linfocinas pueden compensar los defectos de la deficiencia de IL-2 *in vivo* (Fontenot y Rudensky, 2004). La reciente generación de ratones knock-out que no expresan IL-2 e IL-4, muestran, sin embargo, que éstos también tienen poblaciones normales de células T y de células B, y que muestran altos niveles de proliferación, indicando que ambas interleucinas no son esenciales para el desarrollo de estas células (Becknell y Caligiuri 2005).

1.4.2 INTERLEUCINA-4

CARACTERISTICAS GENERALES

La interleucina 4 (IL-4) fue descubierta en 1982, teniendo como característica estimular la proliferación de las células B que habían sido tratadas con anticuerpos anti-IgM. También fue caracterizada independientemente como factor producido por las células T, capaz de inducir la diferenciación de las células B (Paul, 1991).

Se utilizaron inicialmente nombres alternativos para IL-4, primero fue llamada el factor de crecimiento de la célula B (BCGF). También fue llamado factor de diferenciación de la célula B (BCDF). Una vez que llegó a ser evidente que BCGF y BCDF eran la misma proteína, y que sus efectos biológicos eran idénticos y subsecuentes a la transcripción del DNA que codificaba esta proteína, se le asignó el nombre de IL-4 (Paul, 1991).

CARACTERÍSTICAS DEL GEN

El gen de la IL-4, está compuesto por 4 exones y tres intrones, tiene un tamaño aproximado de 10 Kb (Arai et al., 1989), se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 5 en las bandas 23-31 (5q23-31). El gen y los productos de la proteína demuestran semejanzas estructurales y funcionales entre el ratón y el ser humano (Thomson, 1994; Foster et al, 2002).

FACTORES DE TRANSCRIPCION DE IL-4

EL NF-IL6 (factor de transcripción de IL-6), el IRF-2 (factor regulador del interferón-2) y el IF-1 like factor (factor similar a ala insulina -1), entre otros son denominados como factores del asma y la alergia (NF-AA), los que están bajo el control de secuencias reguladoras, inducen la síntesis de RNAm necesario para activación o respuesta celular a la IL-4 y juegan un rol fundamental en la diferenciación de células TH2 (Kiani, et al., 2000).

PRODUCCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA PROTEÍNA

La IL-4 se caracteriza porque promueve la multiplicación de los linfocitos B en reposo y, en este sentido, tiene una actividad sinérgica con el IFN- γ producido por los linfocitos Th1, aunque sus otras funciones son antagónicas o simplemente diferentes. Es producida por linfocitos Th2, mastocitos, basófilos, células del estroma de la médula ósea y, posiblemente, por determinadas subpoblaciones de células NK. La IL-4 es una glicoproteína de aproximadamente 20 kD, es el estímulo más importante para la producción de anticuerpos IgE. La IL-4 es miembro de la familia de las citocinas con cuatro hélices α . Es la citocina característica de la subpoblación Th2 y actúa como citocina inductora y efectora de éstas células (Löhning et al., 2004).

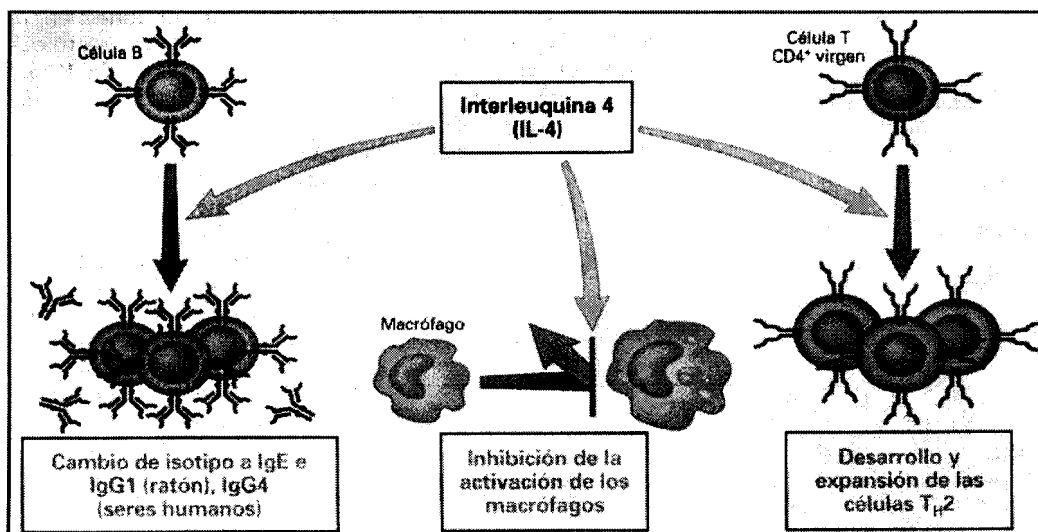
ACCIONES BIOLÓGICAS

La IL-4 es una molécula pleiotrópica, ya que no actúa solamente sobre los linfocitos B sino que lo hace sobre diferentes tipos celulares. Ésta interleucina además de ser producida por linfocitos T activados, también puede ser producida por las células cebadas y actúa sobre ellas en una forma autocrina. En los linfocitos B, IL-4 aumenta la expresión de los antígenos de histocompatibilidad Clase II, estimula la producción de IgG1 e IgE pero deprime la síntesis de IgG2 e IgG3. En el timo, la IL-4 estimula el crecimiento y la diferenciación de los precursores de los linfocitos T. También, se ha demostrado que ayuda a mantener la viabilidad de los linfocitos T que están en reposo e influye sobre las actividades biológicas de los macrófagos; además puede inhibir la producción de $\text{TNF}\alpha$. Así mismo, antagoniza la activación de los macrófagos por el $\text{IFN-}\gamma$. La IL-4, lo mismo que la IL-10, inhibe algunas funciones de los monocitos, incluyendo la producción de IL-1, IL-6 e IL-8. Por esta razón la IL-4 se considera una citocina anti-inflamatoria. Cuando IL-4 se añade a los cultivos de linfocitos T activados, deprime la síntesis de IL-2 y de $\text{IFN-}\gamma$. Las funciones pleiotrópicas de IL-4 dependen de la existencia de los receptores específicos para ella sobre la membrana de células que se encuentran en numerosos tejidos (Löhning et al., 2004).

RECEPTOR

El receptor de IL-4 de las células linfoides está constituido por una cadena α , que es miembro de la familia de receptores de citocinas tipo I, asociada a la cadena γ_c que es compartida con los receptores de IL-2. Este receptor libera señales por la vía de JAK/STAT. La IL-4 es la única citocina que activa a la proteína STAT6, responsable de muchas de las acciones de la IL-4, como la diferenciación de Th2 (Hebenstreit et al., 2006).

Figura 5. Acciones biológicas de IL-4. (Tomado de Abbas, 2002).



HALLAZGOS RECIENTES

Las consecuencias de la expresión alterada de IL-4, han sido estudiadas en animales transgénicos que sobreexpresan IL-4 humana en todos los tejidos. En estos animales se observa la producción excesiva de altos niveles en suero de IgE. También se observó que la sobreexpresión de IL-4 interfiere con la maduración de las células T y reduce fuertemente la población de linfocitos CD4+, CD8+ y de células T periféricas, mientras que los timocitos maduros CD8+ se incrementan excesivamente. Los niveles de IL-4 no pueden incrementarse sobre un cierto nivel, debido a que la sobreexpresión descontrolada conduce a la muerte de estos animales (Holland et al., 2005).

La expresión de algunos mRNAs de citocinas, tales como los que codifican para IL-5, IL-6, INF- γ y también al receptor de IL-4, se encuentra incrementada en ratones transgénicos que sobreexpresan IL-4, mientras que los niveles de mRNA de IL-1, IL-2, IL-3, TNF- α y TNF- β no parecen estar alterados (Bañas et al., 2005).

La expresión de IL-4 en ratones transgénicos, tiene profundos efectos en la función de las células B. Las células B de estos animales aumentan su tamaño y muestran una expresión elevada de MHC clase II. Los animales presentan un nivel elevado de IgG1 e IgE en el suero y niveles disminuidos de IgG2a, IgG2b e IgG3. El tratamiento de los ratones transgénicos para IL-4 con anticuerpos neutralizantes para esta citocina, revierte muchas de las alteraciones, lo que sugiere que este cambio se origina como consecuencia directa de la secreción de IL-4 (Park et al., 2004).

La IL-4 parece jugar un papel importante en el establecimiento de una respuesta inmunológica Th2 funcional. Las células T CD4⁺ de ratones deficientes en IL-4, fracasaron en producir citocinas tipo Th2, después de una estimulación *in vitro*. Los ratones deficientes en IL-4, también han demostrado ser resistentes al síndrome de inmunodeficiencia inducida por retrovirus (MAIDS), pero no muestran letalidad ni un desarrollo anormal de células T, ambas asociadas con el MAIDS (Cooper et al., 2006).

1.4.3 INTERLEUCINA-6

CARACTERISTICAS GENERALES

La interleucina 6 (IL-6) fue conocida inicialmente como BCDF o factor que estimula la diferenciación de los linfocitos B para que inicien la producción de inmunoglobulinas. Debido a sus diversas actividades biológicas, la IL-6 al igual que otras proteínas aisladas por investigadores independientes, recibió diferentes nombres: IFNb2,

Factor 2 estimulante de los linfocitos B (BSF2), Factor estimulante de hepatocitos y Factor II inductor de granulocitos y macrófagos (Hirano et al., 1985). La IL-6 no influye sobre la proliferación de los linfocitos B. Para que IL-6 estimule la diferenciación de los linfocitos B, se necesita que otras citocinas como IL-2, IL-4 e IL-5 hayan estimulado previamente su multiplicación (Ishihara y Hirano, 2002).

CARACTERÍSTICAS DEL GEN

El gen que codifica para IL-6 consta de aproximadamente 1.3 Kb, se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, en la banda 21 (7q 21). En la posición -174 existe un polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) que consiste en el cambio de una G por C (Thomson, 1994).

FACTORES DE TRANSCRIPCION DE IL-6

El NF-IL6 (factor de transcripcion IL-6) es un factor de transcripción con dominios básicos y con leucina. Se une específicamente a un elemento de respuesta en el promotor del gen de IL-6. El NF-IL6 se activa por fosforilación en respuesta a estímulos inflamatorios e interviene en las respuestas de los macrófagos (Ishihara y Hirano, 2002).

PRODUCCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA PROTEÍNA

La IL-6 es una glicoproteína de 26KD, producida por los linfocitos Th2 CD4+ que ya han reconocido un antígeno o que han sido estimulados por mitógenos, siempre y cuando estén en presencia de monocitos o de IL-1. Sin embargo, la IL-6 también puede ser producida por muchas otras células, como monocitos, macrófagos, fibroblastos y varias líneas de células tumorales (Boulanger et al., 2003).

ACCIONES BIOLÓGICAS

La IL-6 tiene un espectro de actividades biológicas sumamente amplio. Es una interleucina pleiotrópica porque puede actuar sobre varios tejidos diferentes y estimularles distintas actividades biológicas. Uno de sus primeros efectos conocidos fue estimular la síntesis de las proteínas de fase aguda por los hepatocitos, contribuyendo así a los efectos sistémicos de la inflamación. IL-6 también puede participar en la modulación de la inflamación desde el momento que, *directa o indirectamente, estimula la hipófisis y provoca un aumento en la producción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH)* que, a su vez, estimula las adrenales y eleva la síntesis de glucocorticoides. Estas últimas hormonas esteroides controlan la extensión y la intensidad de las reacciones inflamatorias en las cuales participa la IL-6. Por otra parte, los glucocorticoides inhiben la expresión del gene de IL-1 e IL-6. La actividad antiinflamatoria de IL-6 es más extensa porque, aparentemente, actúa como un regulador negativo de la síntesis de TNF α por los macrófagos que han sido estimulados (Boulanger et al., 2003).

RECEPTOR

El receptor de la IL-6 (IL-6R), está formado por dos subunidades. La primera es la cadena polipeptídica que forma el receptor en cuya porción extramembranal se encuentra un dominio similar a los dominios de las inmunoglobulinas. La porción citoplásmica de ésta subunidad del IL-6R es relativamente pequeña y no está asociada a tirosinas cinasas (PTK). La segunda subunidad del IL-6R es una glicoproteína de 101 kDa denominada gp 130, cuya posición citoplásmica induce actividad de PTK (Mitsuyama et al., 2006).

HALLAZGOS RECIENTES

La sobreexpresión combinada de IL-6 y la proteína receptora transductora de señal, gp130, provoca una hipertrofia miocárdica. Estas observaciones fueron inesperadas y cuestionaron la seguridad de una terapia con IL-6. Sin embargo, en estudios toxicológicos experimentales, se toleró bien la inmunoterapia con IL-6 humana recombinante (rhIL-6). Altas dosis de rhIL-6, administradas a roedores o a primates, indujeron trombocitosis e incrementaron la síntesis de proteínas de fase aguda sin ningún signo de toxicidad sistémica (Katsuhiko y Hirano., 2002).

La inactivación del gen IL-6 en ratones knock-out, no provocó ninguna anomalía grave, se observó que estos ratones no son capaces de controlar las infecciones de bacterias intracelulares y que después de la respuesta inflamatoria de fase aguda, el daño al tejido y la infección están muy desarrollados. Los resultados preliminares sugieren que la deficiencia en IL-6 provoca una reducción de células precursoras hematopoyéticas. Otra observación interesante es que la inmunidad de las mucosas está severamente reducida y que el número de células plasmáticas productoras de IgA, están dramáticamente disminuidas en la lámina propia de la mucosa del intestino (Jong-Hwan et al., 2004).

Los ratones transgénicos que expresan IL-6 bajo el control del promotor del gen de la queratina humana, expresan IL-6 en células epiteliales escamosas. Estos ratones son mucho más pequeños que los ratones normales y también presentan un desarrollo tardío de la piel, con un incremento en la proliferación de las células epidérmicas, aunque no se observa una infiltración de leucocitos. La expresión intracerebral de la IL-6 en ratones transgénicos ha demostrado estar asociada con síndromes neurológicos, y la severidad de los mismos se relaciona con el nivel de expresión de IL-6. Estos ratones se caracterizan por presentar enanismo, temblor, neurodegeneración, astrocitosis, angiogénesis e inducción de la producción de proteínas de fase aguda, sugiriendo un papel patogénico directo de IL-6 en enfermedades inflamatorias, infecciosas y neurodegenerativas del sistema nervioso central (Kallen 2002).

Las actividades biológicas de IL-6 también han sido estudiadas en ratones deficientes de esta citocina, generados por eliminación específica del gen IL-6 en células embrionarias. Los ratones deficientes en IL-6 de ambos sexos, son viables y fértiles y no presentan ninguna anomalía fenotípica. No obstante, el análisis del metabolismo óseo de las hembras demuestra que estos animales tienen mayores tasas de reorganización ósea que los controles. Estos resultados sugieren que IL-6 juega un papel muy importante en la regulación local de la reorganización ósea y parece ser esencial en la pérdida ósea causada por deficiencia de estrógenos (Erices A et al., 2002).

2. JUSTIFICACIÓN

La desnutrición se considera un grave problema de Salud Pública en México, ya que su relación con procesos infecciosos es causa importante de mortalidad infantil. La alta prevalencia de desnutrición a nivel mundial ha motivado a los investigadores a estudiar las alteraciones a nivel del sistema inmunológico relacionadas con la alta susceptibilidad a contraer infecciones observada en los niños desnutridos. Estudios recientes sobre las proteínas inmunomoduladoras conocidas bajo el término de citocinas, han demostrado su papel relevante en la defensa del organismo. Las citocinas han sido ampliamente estudiadas, sin embargo, no se sabe si el estado nutricional modula la expresión génica de las mismas.

Hasta el momento existen pocos estudios que muestran que la DCP está relacionada con cambios en la expresión de genes; algunos se han realizado en animales de experimentación (Cho et al., 2000; Cho et al., 2002; Lee et al., 2002), y sólo uno en linfocitos humanos (González et al., 2006).

Debido a lo anterior es importante estudiar la expresión de los genes que codifican para IL-2, IL-4 e IL-6, ya que éstas, junto con otras citocinas, son las encargadas de coordinar todas las interacciones que se llevan a cabo en el sistema inmunológico. Por otro lado esta aproximación experimental nos permitirá tener un panorama más amplio de los posibles mecanismos relacionados con las alteraciones inmunológicas observadas en niños con DCP.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar, en niños con desnutrición de primero, segundo y tercer grado; los niveles de expresión de algunos genes de Interleucinas.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

A) Determinar si la desnutrición afecta los niveles de expresión relativa de los genes de IL-2, IL-4 e IL-6.

B) Establecer si el grado de desnutrición tiene influencia sobre la expresión de los genes de IL-2, IL-4 e IL-6.

C) Establecer si el tipo de infección (gastrointestinal o respiratoria) que presentan los niños con DCP cambia el nivel de expresión de los genes de IL-2, IL-4 e IL-6.

4. HIPÓTESIS

Si los niños desnutridos presentan alteraciones en su capacidad de respuesta inmunológica, se esperan encontrar cambios en la expresión relativa de IL-2, IL-4 e IL-6 entre niños bien nutridos infectados y niños con desnutrición calórico-proteica de primero, segundo y tercer grado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CARACTERISTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se obtuvieron muestras de aproximadamente 1.5 mL de sangre periférica (con jeringas previamente heparinizadas) de niños con edades entre 6 meses a 5 años que acudieron al Hospital Pediátrico de Iztapalapa perteneciente al Gobierno del Distrito Federal.

Para el estudio se conformaron cuatro grupos de niños con las siguientes características:

- 1) Niños bien nutridos con infección (BNI): Niños con infección grave de tipo bacteriano en vías respiratorias bajas (bronconeumonía) o infección gastrointestinal, que no se encontraban tomando medicamentos al momento de la toma de la muestra. Con peso y talla adecuados para su edad cronológica.
- 2) Niños con infección de vías respiratorias bajas o gastrointestinales y con desnutrición de Primer grado (DN1).
- 3) Niños con infección de vías respiratorias bajas o gastrointestinales y con desnutrición de Segundo grado (DN2).
- 4) Niños con infección de vías respiratorias bajas o gastrointestinales y con desnutrición de Tercer grado (DN3).

El diagnóstico de la infección se basó en la sintomatología y en los exámenes de laboratorio realizados a cada niño. El déficit de peso de los niños desnutridos fue establecido comparando el peso que tenía cada niño, al momento de la toma de la muestra, con el peso reportado para niños mexicanos bien nutridos (Ramos-Galván, 1976).

La investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Dirección de Servicios Médicos de la Secretaría de Salud del Gobierno del Distrito Federal.

Los criterios de inclusión y de exclusión utilizados para la selección de los niños estudiados fueron los siguientes:

5.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

NIÑOS BIEN NUTRIDOS CON INFECCIÓN (BNI)

- Niños entre los 6 meses y 5 años de edad.
- Todos con el peso y la talla esperada para su edad cronológica.
- Infección de tipo bacteriano (respiratoria o gastrointestinal) que amerite su hospitalización.
- Sin tomar medicamento al momento de la toma de la muestra.

NIÑOS DESNUTRIDOS INFECTADOS (DN)

- DN1: El individuo presentó un déficit de entre 10 y 24% del peso corporal correspondiente para su edad cronológica.

- DN2: Déficit de peso corporal que va del 25 al 39% del promedio correspondiente para la edad cronológica del paciente.
- DN3 (tipo marasmo): El déficit del peso fue de más de 40 % del promedio correspondiente para la edad cronológica del paciente.
- Todos los niños presentaron desnutrición de tipo primaria.
- Infección de tipo bacteriano (respiratoria o gastrointestinal) que amerito su hospitalización.

5.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

NIÑOS BIEN NUTRIDOS CON INFECCIÓN (BNI)

- Menores de 6 meses o mayores de 5 años.
- Infección de tipo viral, tuberculosis y alergias.
- Bajo peso al nacimiento < 2.5 Kg.
- Problemas de tipo congénito.

NIÑOS DESNUTRIDOS INFECTADOS (DN)

- Menores de 5 meses o mayores de 5 años.
- Infección de tipo viral, tuberculosis y alergias.

- Bajo peso al nacimiento < 2.5 Kg.
- Problemas de tipo congénito.
- DN de origen secundario

5.2 AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

A partir de las muestras de sangre periférica se aislaron linfocitos de la siguiente manera: La sangre obtenida de cada uno de los niños se diluyó en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, Microlab) en proporción 1:1. Esta suspensión celular se colocó cuidadosamente en un tubo de centrifuga que contenía 1ml de Linfograd (Microlab). Los tubos se centrifugaron a 2500 rpm por 20 min. Se colectaron los linfocitos separados por el Linfograd, se colocaron en otro tubo para centrifugar y se lavaron dos veces más con PBS, por medio de centrifugación.

5.3 OBTENCION DE RNA

A partir de los linfocitos, se efectuó el aislamiento de RNA con el kit Qiagen (RNeasy Mini Kit). Primero se les agregaron 350 µl de amortiguador RLT, para lisar los linfocitos, éste contiene isotiocianato de guanidina que inactiva las RNAsas, asegurando de ésta manera la obtención de RNA total. La mezcla se homogenizó fuertemente durante 1 min en un vortex. A esta mezcla se añadieron 350 µL de etanol al 70% para proporcionar las condiciones óptimas de unión del RNA a la columna, 700 µL de ésta suspensión se colocaron en una mini columna RNeasy y se centrifugó a 10.000 rpm por 15 segundos. A la columna se le agregaron 700 µL del amortiguador RW1 para eliminar contaminantes, se centrifugó nuevamente por 15s a 10.000 rpm. La columna se lavó nuevamente con 500 µL del amortiguador RPE,

centrifugando 3 minutos a 10.000 rpm. Se transfirió la mini columna RNeasy a un tubo ependorff de 1.5 ml y se le agregaron 40 µl de agua libre de RNasas. Obteniendo así un RNA de alta calidad. El RNA obtenido fue fraccionado en alícuotas de 10 µL y almacenado a -70°C hasta que se utilizó para la retrotranscripción.

5.4 RETROTRANSCRIPCION (RT)

Se usaron 10 µL del RNA aislado para la síntesis de la primera cadena de cDNA por transcripción reversa. A la alícuota de RNA se le agregó 1 µL de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Promega), 1 µl de dinucleótidos trifosfatos (dNTP's, Promega) y 1 µl agua grado biología molecular (miliQ). Se homogenizó suavemente y se incubó a 65°C por 5 min. Posteriormente se le agregó 1µL de transcriptasa reversa (Superscript III, Invitrogen), se homogenizó por pipeteo y la RT se llevó a cabo incubando esta mezcla a 50°C durante 50 min. Al terminar la reacción, la enzima se inactivó a 70°C durante 15 min, el cDNA se cuantificó por espectrofotometría y posteriormente se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.5 CUANTIFICACION DE LA EXPRESION GENICA POR PCR EN TIEMPO REAL

La cuantificación de la expresión de los genes de IL-2, IL-4 e IL-6 se realizó por PCR en tiempo real utilizando la tecnología del LightCycler (Roche Applied Science). El cDNA se amplificó utilizando pares de oligonucleótidos iniciadores específicos para cada una de las citocinas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de cada una de las citocinas y el gen constitutivo.

Gen constitutivo β actina- forward

5'- AGC CAC ATC GCT CAG ACA -3'

Gen constitutivo β actina- reverse

5'- ATT GGC AAT GAG CGG TTC -3'

IL-2- forward

5'- AAG TTT TAC ATG CCC AG AAG G-3'

IL-2- reverse

5'- AAG TGA AAG TTT TTG CTT TGA -3'

IL-4- forward

5'- CAC CGA GTT GAC CGT AAC AG-3'

IL-4- reverse

5'- GCC GGC AGA AGG TTT CC-3'

IL-6- forward

5'- AGC TAT GAA CTA CTT CTA CAC AA-3'

IL-6- reverse

5'- GGT ACT GGG GCA GGG AAG-3'

Las sondas utilizadas para realizar la cuantificación relativa fueron tomadas de la Universal ProbeLibrary (Roche). Estas estuvieron marcadas con el fluorocromo FAM y fueron las siguientes: para β -Actina la sonda # 11, para IL-2 la sonda # 65, para IL-4 la sonda #16 y para IL-6 la sonda # 68. Las sondas Taq Man se unen a secuencias específicas del ADN. Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda esta intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador y del aceptor rompiendo así la distancia que existe entre ambos y con ello emitiendo la fluorescencia del donador. Esta fluorescencia es cuantificada por los detectores del equipo de PCR en tiempo real. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) (Costa, 2004).

Para la cuantificación de la expresión de genes por PCR en tiempo real fue necesario utilizar un gen calibrador (β - actina). Se construyó una curva patrón para comparar los genes a medir con el gen calibrador. Para ello se realizaron tres diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) del cDNA a analizar y la siguiente mezcla de reacción para PCR:

5.4 μ L de agua, 0.2 μ L de cada uno de los oligonucleotidos correspondientes (10 μ M), 0.1 μ L de sonda TaqMan, 0.1 μ L de enzima Uracil-DNA Glicosilasa

(LightCycler-Roche), 2 μ L de la solución maestra LightCycler Taqman Master (Roche) y 2 μ L de cDNA (200ng).

Posteriormente se procedió a cuantificar la expresión de los genes que codifican para IL-2,4 y 6, utilizando la dilución de cDNA previamente calibrada. Y para ello se realizó el PCR tiempo real usando la mezcla de reacción mencionada anteriormente

Las muestras de todos los casos y controles se amplificaron por triplicado con el siguiente programa de PCR:

Desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min.

Desnaturalización a 95°C durante 10 seg.

Alineamiento a 60°C durante 30 seg.

Extensión a 72°C durante 1 seg.

La intensidad de fluorescencia se registró al final de cada ciclo de PCR.

5.6 ANALISIS ESTADISTICO

Para comparar los valores de expresión relativa de los niños DN con los de los niños BNI se utilizó la prueba estadística U de Mann-Whitney, es una de las pruebas no paramétricas más poderosas ya que se utiliza para analizar datos de tipo cuantitativo, ya sean ordinales, jerarquizados o nominales y no depende del conocimiento de cómo se distribuye la población además de que sirve para realizar comparaciones cuando el número de datos es pequeño.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACION ESTUDIADA

En el grupo de niños BNI se incluyeron 14 niños de los cuales 3 eran de sexo femenino y 11 de sexo masculino. El intervalo de edad fue de 7 a 36 meses. Todos presentaron el peso y la talla esperada para su edad cronológica, y algún tipo de infección bacteriana grave que ameritó su hospitalización. El diagnóstico de la infección se basó en la sintomatología, así como en los exámenes de laboratorio de rutina, 9 de los niños presentaron infección de tipo respiratoria el resto presentaron infección de tipo gastrointestinal (Cuadro 4).

Se obtuvieron 16 muestras de niños DN, los cuales 5 correspondieron a niños DN1, 3 a niños DN2 y 8 muestras a niños con DN3.

En el grupo de niños con DCP de primer grado (DN1) se incluyeron 5 niños, de los cuales 1 era del sexo femenino y 4 del sexo masculino. El intervalo de edad fue de 7 a 27 meses, 3 de los niños presentaron infección de tipo respiratoria y los otros 2 de tipo gastrointestinal (Cuadro 5).

Cuadro 4. Características clínicas de los niños bien nutridos infectados

NIÑO	EDAD (meses)	SEXO	*PESO (Kg)	**TALLA (cm)	TIPO DE INFECCION
1	7	Masculino	7.3	63	Gastrointestinal
2	8	Masculino	7.7	64	Respiratoria
3	8	Masculino	7.3	67	Gastrointestinal
4	9	Femenino	8.7	66	Gastrointestinal
5	15	Masculino	10.0	78	Gastrointestinal
6	16	Masculino	10.7	79	Gastrointestinal
7	16	Masculino	10.5	75	Respiratoria
8	24	Femenino	12.0	80	Respiratoria
9	24	Femenino	14.0	81	Respiratoria
10	27	Masculino	14.3	93	Respiratoria
11	29	Masculino	14.0	96	Respiratoria
12	29	Masculino	13.5	91	Respiratoria
13	32	Masculino	15.8	95	Respiratoria
14	36	Masculino	19.0	105	Respiratoria

*Peso al momento de la toma de la muestra, **Talla al momento de la muestra

Cuadro 5. Características clínicas de los niños desnutridos de primer grado

NIÑO	EDAD (meses)	SEXO	*PESO (Kg)	**TALLA (cm)	DEFICIT DE PESO %	TIPO DE INFECCION
1	7	Masculino	6.5	63	20	Respiratoria
2	10	Masculino	6.5	60	16	Gastrointestinal
3	10	Masculino	7.2	61	19	Respiratoria
4	18	Masculino	9.6	86	15	Gastrointestinal
5	27	Femenino	10.6	90	12	Respiratoria

*Peso al momento de la toma de la muestra, **Talla al momento de la muestra

En el grupo de niños con DCP de segundo grado (DN2) se incluyeron 3 niños de los cuales 1 era del sexo femenino y 2 del sexo masculino. El intervalo de edad fue de 8 a 43 meses, todos con infección de tipo respiratoria (Cuadro 6).

Cuadro 6. Características clínicas de los niños desnutridos de segundo grado

NIÑO	EDAD (meses)	SEXO	*PESO (Kg)	**TALLA (cm)	DEFICIT DE PESO %	TIPO DE INFECCION
1	8	Masculino	5.7	68	28.7	Respiratoria
2	10	Masculino	6.5	66	27.7	Respiratoria
3	43	Femenino	12.5	90	25	Respiratoria

*Peso al momento de la toma de la muestra, **Talla al momento de la muestra

En el grupo de niños con DCP de tercer grado (DN3), sólo se incluyeron niños con desnutrición severa tipo marasmo (déficit de peso > 40 %), y algún tipo de infección bacteriana grave, 5 fueron del sexo femenino y 3 del sexo masculino, el intervalo de edad fluctuó de 6 a 60 meses. El diagnóstico de la infección se basó igual que en el grupo anterior en la sintomatología y en los exámenes de laboratorio. De igual forma por su condición todos ameritaron hospitalización, el déficit de peso se determinó según las tablas de Ramos Galván para niños mexicanos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Características de los niños desnutridos de tercer grado

NIÑO	EDAD (meses)	SEXO	*PESO (Kg)	**TALLA (cm)	DEFICIT DE PESO %	TIPO DE INFECCION
1	6	Masculino	3.8	55	53	Respiratoria
2	6	Masculino	2.5	50	68	Respiratoria
3	8	Masculino	3.7	60	57	Respiratoria
4	11	Femenino	5.5	66	41	Respiratoria
5	15	Femenino	4.6	58	55	Respiratoria
6	21	Femenino	6.4	74	46	Respiratoria
7	36	Femenino	9.5	86	39	Respiratoria
8	60	Femenino	10.2	103	55	Gastrointestinal

*Peso al momento de la toma de la muestra, **Talla al momento de la muestra

6.2 AMPLIFICACIÓN PARA DETERMINAR LA EFICIENCIA Y LA SENSIBILIDAD DEL METODO DE PCR EN TIEMPO REAL

6.2.1 CURVAS DE RANGO DINAMICO

La detección en tiempo real de los productos amplificados se realizó mediante la monitorización del aumento de la señal de fluorescencia generada al término de cada ciclo del proceso de amplificación.

El rango dinámico se utilizó para determinar la eficiencia de amplificación y sensibilidad de la técnica. Para evaluarlo se utilizó una curva estándar, a partir de una muestra de cDNA diluida serialmente en ordenes de 10 (1:10, 1:100, 1:1000), cada dilución se amplificó por triplicado. De la curva obtenida se calculó la correlación lineal entre los valores de Cp (crossing point) para determinar la eficiencia de amplificación. Este Cp es un número fraccional que indica cuantos ciclos le tomo a cada muestra generar cantidad suficiente de fluorescencia para llegar a un umbral de detección. El valor del Cp es calculado por el software del LightCycler (Roche Applied Science).

La fórmula empleada para calcular la eficiencia de amplificación fue:

$$N=N_0 \times E^{Cp}$$

En donde:

N= numero de moléculas obtenidas en cada ciclo

N₀= numero inicial de moléculas

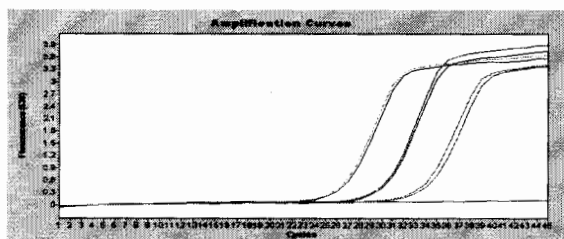
E= eficiencia de amplificación

Cp= numero de ciclo de detección del umbral

Con la eficiencia de la amplificación se comprobó la efectividad de la sonda y los oligonucleótidos utilizados para cada uno de los genes. La curva patrón generada a partir de estos datos tuvo una eficiencia de 1.97 para β -Actina (Figura 6), IL-2, IL-4 e IL-6 la eficiencia fue 1.94, 1.95 y 1.97 respectivamente (Figura 7).

β -ACTINA

A)



B)

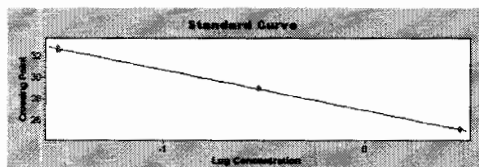
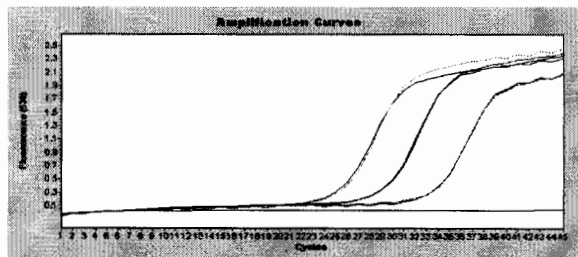


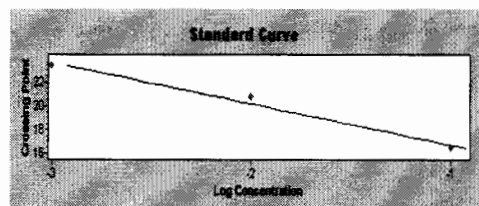
Figura 6. Eficiencia y sensibilidad de PCR en tiempo real. A) Curvas de amplificación obtenidas para el gen de β - actina en una muestra de cDNA de un niño BNI. Diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 respectivamente. B) Correlación lineal de la reacción de PCR obtenida a partir de las curvas de amplificación observada en A con una eficiencia de 1.97.

IL-2

A)

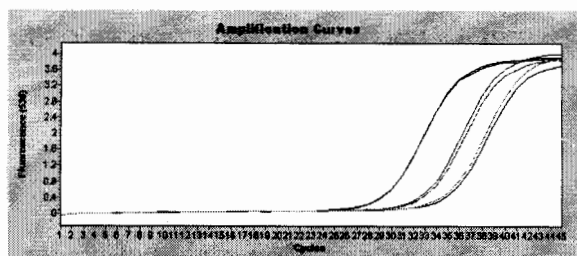


B)

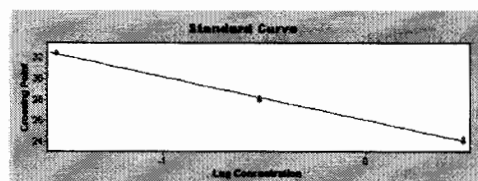


IL-4

C)

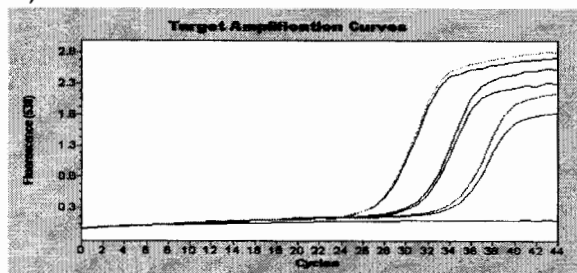


D)



IL-6

E)



F)

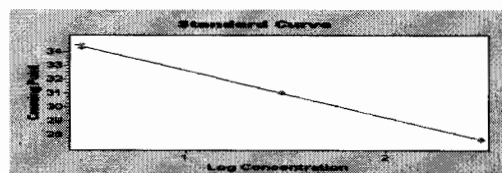


Figura 7. Eficiencia y sensibilidad de PCR en tiempo real. A, C, E) Curvas de amplificación obtenidas para el gen de IL-2, IL-4 e IL-6 en una muestra de cDNA de un niño BNI. Diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 respectivamente. B, D y F) Correlación lineal de la reacción de PCR obtenida a partir de las curvas de amplificación observada en A, C y E con una eficiencia de 1.94, 1.95 y 1.97 respectivamente.

6.3 EXPRESION RELATIVA DE LOS RNAm DE LAS INTERLEUCINAS 2, 4 Y 6

Se incluyó una referencia de amplificación, que se refiere a la amplificación de un gene de expresión constitutiva a partir de la misma muestra de cDNA, en este caso se utilizó β -Actina (referencia).

Se requiere determinar el gen de interés y el de referencia para cada muestra problema y para un calibrador (muestra positiva que establece una relación entre el gen de interés y el de referencia) en cada corrimiento en el LightCycler. La cuantificación relativa del gen de interés y el de referencia de cada muestra problema y del calibrador es calculada en un primer paso.

El valor de Cp obtenido del gen de interés (muestra problema), se dividió entre el valor obtenido para cada una de las referencias (muestra problema), a su vez este valor se dividió entre el valor de otro ensayo que se refiere al gen de interés del calibrador sobre la referencia del calibrador. Como segundo paso los resultados se normalizan para asegurar que las variaciones observadas en expresión sean realmente debidas a cambios de expresión y no a cantidad variable de muestra añadida entre dos ensayos de la muestra.

$$\text{NORMALIZACION} = \frac{\text{Gen de interés (muestra problema)}}{\text{Referencia (muestra problema)}} \bigg/ \frac{\text{Gen de interés (calibrador)}}{\text{Referencia (calibrador)}}$$

Una vez normalizado el resultado de expresión con respecto a la referencia (β -actina) y el gen de interés, se compararon los niveles de expresión relativa de IL-2, IL-4 e IL-6 para los niños DN1, DN2, DN3 y BNI utilizando la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney.

Para obtener los datos individuales de expresión se eligió un niño BNI y uno DN que tuvieran un tipo de infección y edad similares.

Los resultados mostraron que para los niños DN1 existe una disminución significativa en los niveles de expresión relativa del gen de IL-2 con respecto a los niños BNI (BNI Cp= 1.02, DN1 Cp= 0.35, $P < 0.004$). Algo similar se observó cuando se compararon los grupos de niños BNI y DN2 (BNI Cp= 1.3, DN2 Cp= 0.53, $P < 0.05$), los niños BNI contra los DN3 (BNI Cp= 1.4, DN3 Cp= 0.45, $P < 0.0008$) (Figura 8). Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las muestras de los niños BNI, DN1, DN2 y DN3.

Al comparar las diferencias de expresión relativa entre los grados de desnutrición se encontró que no hay diferencias significativas para la IL-2 (DN1 Cp= 0.35, DN2 Cp=0.53, $P > 0.28$), (DN1 Cp= 0.35, DN3 Cp= 0.45, $P > 0.24$) y (DN2 Cp=0.53, DN3 Cp= 0.45, $P > 0.68$).

También se realizaron comparaciones de acuerdo al tipo de infección entre los pacientes DN y BNI para IL-2 con infección de tipo respiratoria (R) y con infección de tipo gastrointestinal (G) (DN R Cp= 0.31, DN G Cp= 0.19 $P > 0.62$) y (BNI R Cp=0.92, BNI G n=0.98 $P > 0.95$), donde tampoco se encontraron diferencias significativas.

Como el número de muestra de los niños BNI fue menor al número de DN se tomaron 2 muestras de niños BNI como repetición para realizar las comparaciones.

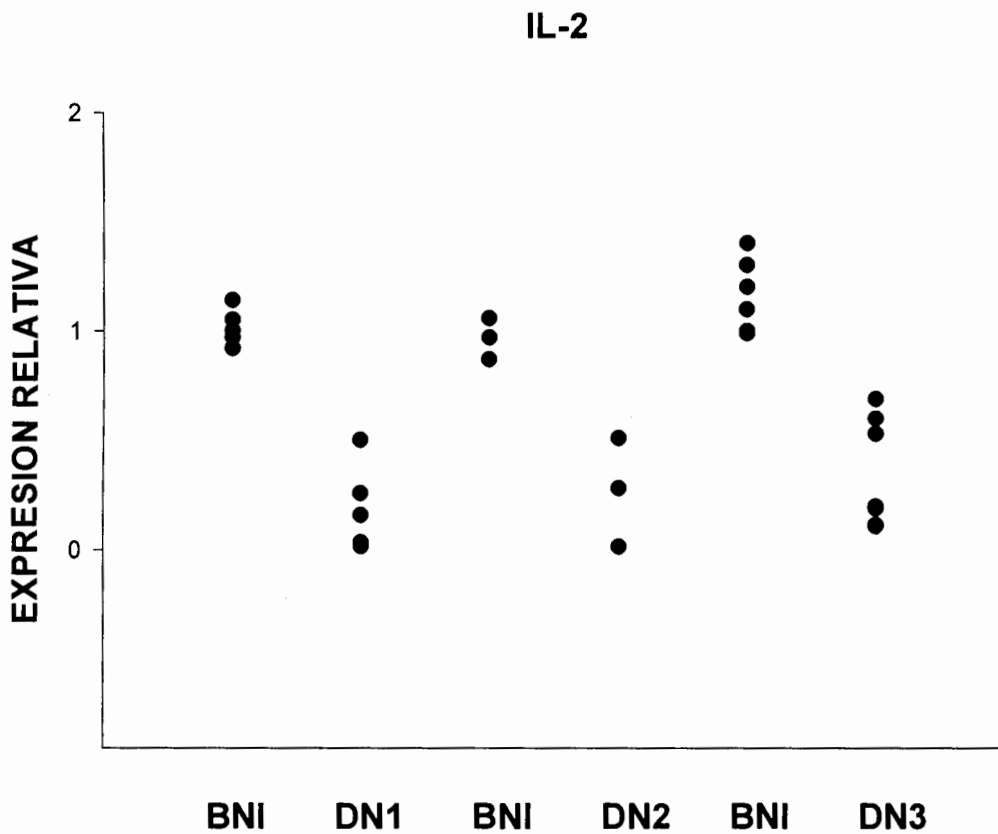


Figura 8. Niveles de expresión relativa del gen de IL-2 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), de segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3). Los experimentos se realizaron por triplicado, los puntos de la gráfica representan el promedio de los triplicados.

La comparación de los niveles de expresión relativa de IL-4 entre el grupo de niños BNI y DN1, mostraron que los niños DN1 presentaron un aumento significativo con respecto a los niños BNI, (BNI Cp= 1.03, DN1 Cp =2.35, $P < 0.004$), lo mismo ocurrió entre los niños DN2 y los niños BNI ($P < 0.05$) y entre los niveles de expresión relativa de IL-4 obtenidos para los niños BNI y DN3 (BNI Cp=1.07, DN3 Cp= 2.5, $P < 0.0063$) (Figura 9).

Al comparar las diferencias de expresión relativa entre los grados de desnutrición no se encontró diferencias significativas para la IL-4 entre todos los grupos (DN1 Cp= 2.35, DN2 Cp= 4.12, $P > 0.28$), (DN1 Cp =2.35, DN3 Cp= 2.5, $P > 0.1$) y (DN2 Cp= 4.12, DN3 Cp= 2.5, $P > 0.1025$).

También se realizaron comparaciones de acuerdo al tipo de infección entre los pacientes DN y BNI para IL-4 con infección de tipo respiratoria (R) y con infección de tipo gastrointestinal (G) (DN R n= 12, DN G n= 4 $P > 0.27$) y (BNI R Cp=0.95, BNI G Cp=0.99 $P > 0.1004$), donde tampoco se encontraron diferencias significativas.

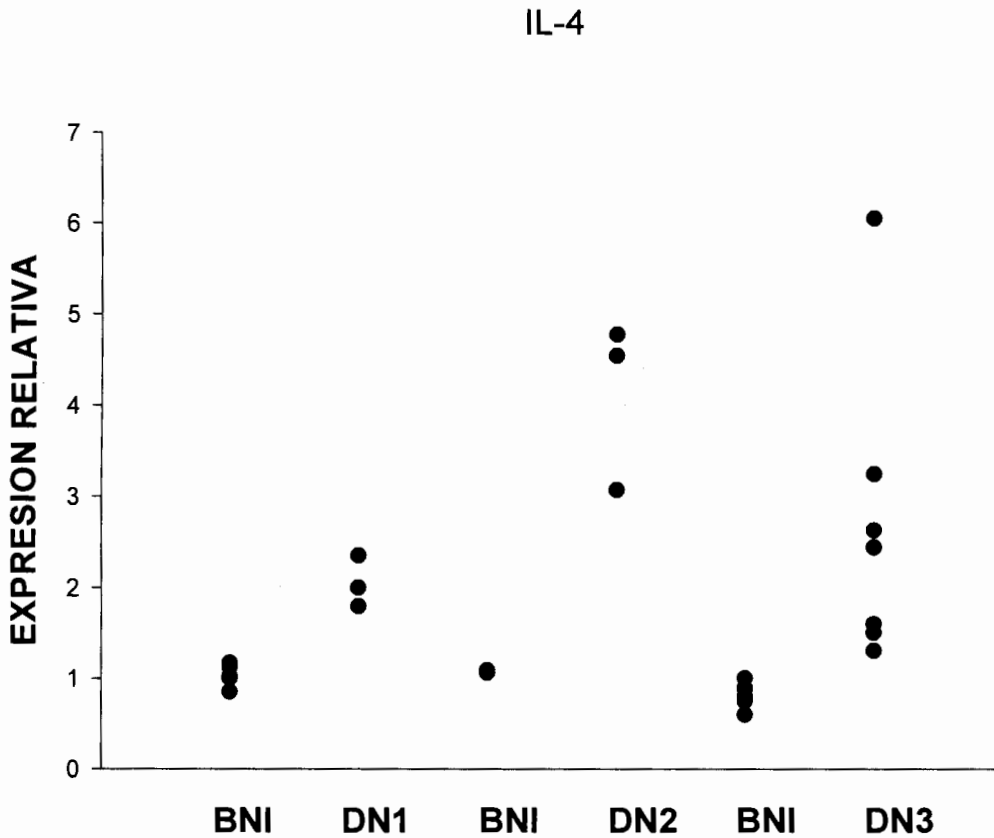


Figura 9. Niveles de expresión relativa del gen de IL-4 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3). Cada punto en la gráfica corresponde al promedio de los corrimientos que se realizaron por triplicado.

Al comparar los datos de la expresión relativa para la IL-6, el resultado de la prueba estadística mostró que para los niños DN de primer grado, existe disminución significativa de la expresión relativa con respecto a los niños BNI (BNI Cp= 1.1, DN1 Cp= 0.54, $P < 0.004$); (Figura 10) y lo mismo para los niños DN2 (BNI Cp= 1.04, DN2 Cp = 0.62, $P < 0.05$) y los DN3 con respecto a los niños BNI (BNI Cp= 1.19, DN3 Cp= 0.64 , $P < 0.0209$) (Figura 10). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Al comparar las diferencias de expresión relativa entre los grados de desnutrición se encontró que no hay diferencias significativas para la IL-6 (DN1 Cp= 0.24, DN2 Cp= 0.32, $P > 0.285$), (DN1 Cp= 0.54, DN3 Cp= 0.64, $P > 0.273$) y (DN2 Cp = 0.62, DN3 Cp= 0.64, $P > 0.2616$).

También se realizaron comparaciones de acuerdo al tipo de infección entre los pacientes DN y BNI para IL-6 con infección de tipo respiratoria (R) y con infección de tipo gastrointestinal (G) (DN R Cp=0.63, DN G Cp=0.77, $P > 0.8557$) y (BNI R Cp=0.99, BNI G Cp=0.95, $P > 0.5711$), donde tampoco se encontraron diferencias significativas.

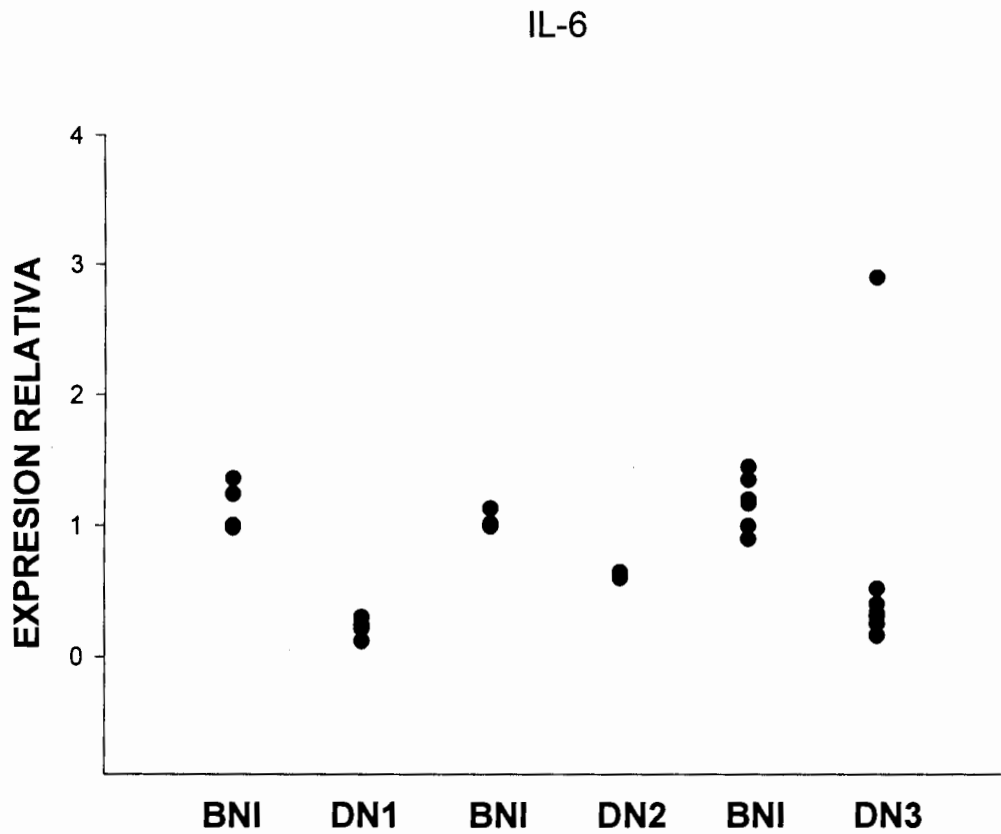


Figura 10. Niveles de expresión relativa del gen de IL-6 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3).

7. DISCUSIÓN

Diferentes estudios han demostrado que la desnutrición afecta al sistema inmunológico, particularmente a la inmunidad celular (Chandra, 1991a; Nájera et al, 2001a; Nájera et al, 2001b; Nájera et al., 2004), lo que favorece que las infecciones sean mas frecuentes, prolongadas y graves en los individuos con DCP. La alta prevalencia de la desnutrición a nivel mundial ha motivado a los investigadores, desde hace varias décadas, a estudiar las alteraciones que suceden en el desnutrido como consecuencia del ajuste que sufre el organismo ante el cambio de abastecimiento de nutrientes. Este ajuste lleva a una reducción de los niveles funcionales de los órganos y células favoreciendo el establecimiento de procesos infecciosos.

En relación a estos, se ha determinado que la desnutrición altera la capacidad de los linfocitos T para responder apropiadamente a las citocinas (Malavé et al., 1998a). Las citocinas comprenden un amplio grupo de glicoproteínas que poseen la capacidad de modular la actividad funcional de células individuales y de tejidos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Son polipéptidos que se producen en respuesta a microorganismos y otros antígenos y que median y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias. La producción de las citocinas suele ser breve (transitoria) y limitada al lapso que dura el estímulo (es decir, el agente extraño). En muchos casos ello se debe a que los correspondientes ARNm tienen una vida media corta (Karulin et al., 2000).

Hasta el momento se han realizado diversos trabajos en los que se han evaluado los niveles séricos de ciertas citocinas (Mc Murray y col, 1998; Lofty y col 1998; Amesty y col, 2003; Dülger y col, 2002) , pero aún no se ha descrito ningún trabajo sobre la expresión génica de éstas en niños desnutridos. Por lo que es importante el estudio de la expresión de algunos de los genes relacionados con la síntesis de citocinas.

Con respecto a la producción de algunas citocinas, se han observado cambios asociados con el factor nutricional. Mc Murray y cols (1998), demostraron que la producción de IL-2 disminuyó en cobayos que fueron alimentados con dieta baja en proteínas. Lofty y cols (1998) observaron una disminución significativa en la producción de IL-2 en células mononucleares provenientes de niños con DCP al ser comparados con niños bien nutridos. En animales experimentales y en humanos se ha demostrado que la producción de varias citocinas, incluyendo a la IL-2, están también disminuidas en pacientes con DCP (Chandra, 1991b). Un estudio reciente de Rodríguez y col (2005) muestra que existe disminución en la producción de IL-2 (respuesta tipo 1) en células CD8+ y CD4+ en niños DN, con respecto a los bien nutridos infectados. Los resultados en relación a la producción de IL-2 muestran claramente que ésta disminuye en organismos desnutridos. Se ha observado, en ratones con deficiencia para la producción de IL-2, un incremento en la susceptibilidad a infecciones, acompañada por disminución de la producción de TNF- α e IFN- γ . Adicionalmente se ha observado que la disminución en la síntesis de IL-2 puede provocar anergia (falla para proliferar ante un antígeno) en células T CD8+, lo que provoca pérdida de su capacidad para la producción de IL-2 autócrina, después de ser estimuladas (Malek, 2002). Las consecuencias de una disminución en la expresión de IL-2 es, que la respuesta de las células T cooperadoras está disminuida, pero biológicamente es funcional, aunque este estudio en ratones deficientes en IL-2 desarrollaron una enfermedad inflamatoria del intestino en estados tardíos (pasadas las 6 semanas de edad), con una sorprendente similitud histológica y clínica a la colitis ulcerativa en humanos (Becknell y Caligiuri 2005).

Los datos obtenidos en el presente trabajo apoyan los resultados previos, con lo que respecta a la expresión del gen de IL-2 ya que se observó una disminución relativa de la expresión de este gen en niños con DN de primero, segundo o tercer grado al ser comparados con los niños BNI. Como se mencionó anteriormente las citocinas juegan un papel central en el sistema inmunológico, donde IL-2 es requerida para

iniciar y amplificar la respuesta inmunológica, por lo que la disminución en la producción de esta citocina puede parcialmente explicar el deterioro de la respuesta inmune celular observada en los niños desnutridos.

Con relación a IL-4 los resultados de la presente investigación mostraron, en el grupo de DN de primero, segundo y tercer grado; un aumento significativo en la expresión de este gen en comparación con el grupo de BNI, estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Rodríguez y col (2005), quienes reportaron incremento en la producción de IL-4 en linfocitos de niños DN. Este hallazgo se relacionó con un incremento en el porcentaje de células productoras de IL-4 en las subpoblaciones TCD4+ y TCD8+ de sangre periférica de niños DN en relación con los BNI. Este incremento de la producción de IL-4, indica que existe una alteración en el balance de las respuestas Th1/Th2 en niños DCP. Aunque los mecanismos por los cuales la desnutrición incrementa la producción de IL-4 son desconocidos (Rodríguez et al., 2005). Un dato interesante muestra que IL-4 inhibe la expresión de CD25 (cadena α del receptor para IL-2) con lo cual se afecta la respuesta de los linfocitos a IL-2, se ha observado que las células CD4+ y CD8+ que expresan CD25 en respuesta a IL-2 disminuyen en presencia de IL-4, lo cual podría explicar la disminución de la producción de IL-2 (Yamanouchie et al., 2007). Las consecuencias de la expresión alterada de IL-4, han sido estudiadas en animales transgénicos que sobreexpresan IL-4 humana en todos los tejidos. En estos animales se observa la producción excesiva de altos niveles en suero de IgE. La sobreexpresión de IL-4 interfiere con la maduración de las células T y reduce fuertemente la población de linfocitos CD4, CD8 y de células T periféricas, mientras que los timocitos maduros CD8+ se incrementan excesivamente. Los niveles de IL-4 no pueden incrementarse sobre un cierto nivel, debido a que la sobreexpresión descontrolada conduce a la muerte de estos animales (Holland et al., 2005).

Con relación a la evaluación de la producción de IL-6 en sangre de niños, existen reportes controversiales, ya que un estudio realizado por Malavé y col (1998b), mostró que en cultivos de células mononucleares de sangre periférica de niños desnutridos existe aumento significativo en el contenido de esta citocina. Posteriormente las investigaciones realizadas por Amesty y col (2003) y Dülger y col (2002), apoyan los datos antes señalados al reportar aumento de la IL-6 en niños con desnutrición; sin embargo, Vethencourt y col, (1994) han encontrado que hay una tendencia a mantener los niveles de producción de IL-6, es decir no se encontraron cambios en la producción de ésta citocina. Por el contrario, Doherty y col (1994), encontraron niveles bajos de ésta citocina al evaluar la producción de citocinas *in vitro* en niños desnutridos. Éste último resultado coincide con el de la presente investigación en donde se observó una disminución significativa de la expresión del gen de IL-6 en los niños desnutridos de primero, segundo y tercer grado comparados con los bien nutridos infectados. Es importante señalar que la diferencia entre los resultados reportados por los distintos investigadores para producción de IL-6 y los encontrados en este trabajo sobre la expresión de la IL-6 podría estar condicionada por el tipo de desnutrición estudiado, ya que algunos sólo utilizan niños con desnutrición leve o moderada.

Por otro lado diferentes estudios han mostrado que la inactivación del gen IL-6 en ratones knock-out, no provoca ninguna anomalía grave, también se ha observado que estos ratones no son capaces de controlar las infecciones de bacterias intracelulares y que después de la respuesta inflamatoria de fase aguda, el daño al tejido y la infección están muy desarrollados. Lo que sugiere, que la deficiencia en IL-6 provoca una reducción de células precursoras hematopoyéticas (Kammüller y Ryffel., 2000).

Se sabe que hay diferencias entre la expresión de genes y la producción de proteínas ya que las células regulan la expresión de sus genes mediante diferentes

procesos, pero la forma más eficiente y usual es por medio del control transcripcional, por medio del cual la célula puede aumentar ó disminuir la cantidad del transcrito primario de ARN por medio de promotores adecuados, enhancers e incluso SNP's presentes en los promotores, los cuales hasta el momento sólo nos muestran un panorama general de la regulación de estos. Por otro lado, el nivel de síntesis de una proteína no está siempre definido por el nivel de síntesis de su correspondiente ARNm, pues las etapas posteriores a la transcripción están sujetas también, a modificaciones postranscripcionales que pueden modificar la eficiencia de la síntesis proteica (Vinogradov, 2006).

La detección de alteraciones en la síntesis del ARNm en función de parámetros nutricionales permite predecir afectaciones en los niveles de producción de una proteína, pero la no detección de alteraciones a este nivel transcripcional, no permitirá asegurar que la síntesis proteica se realizará de manera óptima independientemente al factor nutricional evaluado, pues este puede ejercer su influencia en el control postranscripcional. Los pasos críticos del control postranscripcional a que está sometida la expresión génica a través del ARNm son el empalme, la poliadenilación, la transportación hacia el citoplasma en función de la estabilidad que presente el ARNm, su localización subcelular y finalmente la traducción en la secuencia polipeptídica (Cagigas et al., 2002). Hoy se acepta internacionalmente la función de los nutrientes en el control postranscripcional y existen muchos ejemplos de esta interacción, aunque no siempre se ha podido definir si los factores regulatorios son los nutrientes en sí, sus metabolitos o cambios hormonales producidos en respuesta a cambios dietéticos (Wieringa et al., 2004).

En las últimas décadas, se ha profundizado en el estudio de las citocinas, teniendo en cuenta su importante papel como mediadores involucrados en los mecanismos de transducción de señales, entre las células del sistema inmunológico y otras células especializadas en tejidos, a través de las cuales regulan y activan la respuesta

inmunológica (Karulin et al., 2000). Recientemente se ha reconocido el término desnutrición inducida por citocinas, teniendo en cuenta no sólo que la síntesis y la actividad biológica de las citocinas se afectan por cambios en la disponibilidad de macro y micronutrientes, sino porque pueden ser responsables del desgaste metabólico que a su vez, puede incidir negativamente sobre el estado nutricional (Sánchez-Álvarez et al., 2002). Este término se ha asociado particularmente a las citocinas, ya que por su actividad pleiotrópica y reguladora ocasionan un desgaste severo al organismo, alterando el metabolismo y con ello, el estado nutricional. Los factores nutricionales afectan el metabolismo de las citocinas tanto en su síntesis como en su liberación, pero además inciden directa o indirectamente en la acción de las citocinas sobre tejidos diana y pueden influir en la respuesta resultante de estos tejidos. Por tales razones se postula que la manipulación dietética para el control de la síntesis y actividad de las citocinas puede facilitar, incrementar o suprimir eventos, en dependencia del cuadro clínico de que se trate (Grimble, 1996).

Las deficiencias de micronutrientes (vitaminas y minerales) son una parte importante, aunque no aislada, del más amplio y serio problema de la desnutrición que afecta a un número muy elevado de niños. Como problema de salud pública, la desnutrición de micronutrientes, cuando se presenta, se puede relacionar con el consumo insuficiente de alimentos ricos en estos nutrientes y con infecciones recurrentes. Un estudio demostró que la deficiencia de vitamina A no provocó afectaciones en la expresión génica de IL-1, pero sin embargo, al combinarse la deficiencia de vitamina A y proteínas se produjo una estimulación significativa de la expresión de IL-1 (Sánchez-Álvarez et al., 2002). Otro estudio demuestra que los niños con deficiencia de vitamina A tienen una producción reducida de citocinas proinflamatorias, especialmente IFN- γ , al ser estimuladas con mitógenos. Los niños con deficiencia de zinc presentan un número de células blancas más bajas, así como una producción más baja de IL-6 *in vivo* (Wieringa et al., 2004). Por otro lado la deficiencia de zinc también se ha relacionado en humanos con la disminución de la expresión del gen

de IL-2 (Prasad A, 2007). Estudios *in vitro* han demostrado que la vitamina D inhibe la proliferación de células T y disminuye la producción de IL-2 e IFN- γ . La destrucción de las células esta mediada por la regulación de Th1 y se cree que la vitamina D podría disminuir el riesgo la Diabetes Mellitus 1 (Borras, 2006).

Las anteriores observaciones permiten explicar por que en diferentes padecimientos el aumento o la disminución de estas citocinas son importantes para la adecuada funcionalidad del organismo, por ejemplo en la necrobiosis lipoidea, se ha observado mejoría con varios tratamientos antiinflamatorios, como la ciclosporina que actúa como un antiinflamatorio muy específico, inhibiendo selectivamente la proliferación de células T en respuesta a mitógenos. Es más eficaz al inicio de la respuesta inmunológica y se cree que el mecanismo de acción fundamental es la inhibición selectiva de la expresión de ciertos genes, en particular el de IL-2. La IL-2 juega un papel fundamental en la orientación hacia el crecimiento y desarrollo de las células Th colaboradoras y la maduración de células T citotóxicas inducida por las células Th. (Smith, 2000). La IL-4 está implicada en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias incluyendo enfermedades de la piel como la dermatitis atopica (AD), aunque algunos estudios señalan que la AD no depende de la sobre-expresión de IL-4 (Elber-Burger et al., 2002; Howell et al., 2007).

La evaluación de la interacción de las características genéticas con los requerimientos nutricionales ha comenzado a ser objeto de investigación, y se están realizando estudios sobre las variantes génicas que influyen en las necesidades nutricionales de los individuos y los factores genéticos de predisposición a enfermedades multifactoriales con componente nutricional.

Con lo que respecta a las comparaciones entre la expresión de cada una de las citocinas y el grado de desnutrición, así como el tipo de infección que presentaron los niños se pudo observar que no hay diferencias estadísticamente significativas que

las distingan. Estos datos se muestran como preliminares ya que este resultado puede deberse a que el número de muestra para los niños de primer grado y de segundo es pequeña, así como para los niños con infecciones gastrointestinales.

8. CONCLUSIÓN

Los resultados de la presente investigación amplían la información sobre las causas de las alteraciones inmunológicas observadas en el niño desnutrido y permiten concluir que:

1. Los niños desnutridos leves, moderados y graves presentan disminución significativa en la expresión relativa de los genes de la IL-2 e IL-6 al compararlos con los niños bien nutridos infectados.
2. En cuanto a la expresión relativa del gen de IL-4 en niños desnutridos leves, moderados y graves presentan aumento al compararlo con los niños bien nutridos.
3. Al comparar las diferencias de expresión relativa entre el grado de desnutrición DN1, DN2 y DN3, se encontró que no hay diferencias significativas.
4. En las comparaciones de acuerdo al tipo de infección entre los pacientes DN y niños BNI para IL-2, IL-4 e IL-6 con infección de tipo respiratoria (R) y con infección de tipo gastrointestinal, no se encontraron diferencias significativas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbas A, Lichtman A y Pober J. *Inmunología Celular y Molecular*. 2002. 4a Edición. McGraw-Hill Interamericana. México. pp 243-279, 340-362
- Arai N, Nomura D, Villaret D, DeWaal R, Seiki M, Yoshida M, Minoshima S, Fukuyama R y Maekawa M. 1989. Complete nucleotide sequence of the chromosomal gene for human IL-4 and its expression. *J Immunol*. 142: 274-82.
- Amesty V, Pereira N, García M, Núñez J, Cayama N y Villadiego N. 2003. Niveles séricos de citocinas proinflamatorias en niños con diferentes grados de desnutrición. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 60: 14-21.
- Banias G, Martin C, Mishina M, Ross W, Rivera-Nieves J, Marini M y Comineli M. 2005. Proinflammatory effects of T_H2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. *Gastr*. 128: 654-666.
- Barreto J, Santana S y Martínez C. 2000. Desnutrición e infecciones respiratorias. *A Med*. 9: 15-21.
- Becknell B y Caligiuri M. 2005. Interleukin-2, Interleukin-15, and Their Roles in Human Natural Killer Cells. *Adv Immunol*. 8: 209-223.
- Borras Perez. 2006. Tesis doctoral Diabetes Mellitus tipo 1 en niños menores de 5 años. Estudio epidemiológico en Cataluña.
- Boulanger M, Chow D, Brevnova E y Garcia K. 2003. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science*. 300: 2101-2104.
- Cagigas A, Ferreira R y Tam M. 2002. *Biología Molecular y Nutrición*. Revista Cubana Aliment Nutr. 16: 69-76.
- Caligiuri M, Zmuidzinas A, Manley T, Levine H, Smith K.A y Ritz, J. 1990. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med*. 171: 1509-1526.
- Chandra R K. 1991a. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr*. 53: 1087-1101.
- Chandra R K. 1991b. Immunocompetence is a sensitive and functional barometer of nutritional status. *Acta Paediatr Scand Suppl*. 374: 129-132.
- Chandra R K. 1999. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proc Nutr. Soc*. 58: 681-683.

- Chtanova T y Mackay R. 2001. T Cell effector subsets: Extending the Th1/Th2 paradigm. *Adv Immunol.* 78: 233-266.
- Chevalier P, Sevilla R, Zalles L, Sejas E, Belmonte G, Parent G y Jambon B. 1996. Immunonutritional recovery of children with severe malnutrition. *Am J Clin Nutr* 6: 201-208.
- Cho M, Kim Y, Lee M y Kim S.G. 2000. The effect of cysteine on the altered expression of class α and μ glutathione S- transferase genes in the rat liver during protein-calorie malnutrition. *Biochem Pharmacol Acta.* 1502: 235-246.
- Cho M, Kim Y, Lee M y Kim S.G. 2002. Prevention of c-Jun/activator protein-1 activation and microsomal epoxide hidrolase induction in the rat liver by cysteine during protein-calorie malnutrition. *Biochem Pharmacol.* 61: 15-24.
- Choy E y Panayi G. 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *J Med.* 344: 907-916.
- Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. *Enferm Infecc. Microbiol Clin.* 22: 299-305.
- Cooper C y Bouseteao N. 2006. Characterization of STAT5B phosphorylation correlating with expression of cytokine-inducible SH2-containing protein (CIS). *Cell Sign.* 18:851-860.
- Cunningham S, Mc Neeley F. 2005. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J A Clin Immunol* 6: 1237-1237.
- De Onis M. 2000. Prevalence and trends of overweight among preschool children in developing countries. *Am J Clin Nutr.* 72: 1032-1039.
- Doherty J, Golden M, Remick D y Griffin G. 1994. Production on interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in vitro is reduced in whole blood of severely malnourished children. *Clin Sci.* 83: 347-351.
- Dölger H, Arik M, Ramazan M, Tarakcioglu H, Noyan M y Balahoroglu. 2002. Pro-inflammatory cytokines in Turkish children with protein-energy malnutrition. *Mediators Inflamm.* 11: 363-365.
- Elbe-Burger A, Egyed A, Olt S, Klubal R, Mann U, Rappersberger K, Rot A y Stingl G. 2007. Overexpression of IL-4 alters the homeostasis in the skin. *J. Invest. Dermatol* 5: 767-768.
- Ellery M y Nicholls J. 2002. Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor Cytokine Growth Factor Rev. 13: 27-40.
- Erices A, Conget P, Rojas C y Minguell J. 2002. gp130 activation by soluble Interleukin-6 Receptor/Interleukin-6 enhances osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 280: 24-32.

- Fernández O, Rivera J, Shamah T, Hernández-Ávila y Villalpando- Hernández. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública. 2006.
- Flores-Huerta S. 1995. Desnutrición energético-proteica. Editorial Médica Panamericana. Nutriología Médica. México. 157-167.
- Fontenot J D y Rudensky A. 2004. Molecular aspects of regulatory T cell development. *Semen Immunol*.16: 73–80.
- Fujita T, Takaoka C, Matsui H, y Taniguchi T. 1983. Structure of the human interleukin 2 gene. *Proc Natl Acad Sci*. 80: 7437–7441.
- Grimble R. 1996. Interaction between nutrients, proinflammatory cytokines and inflammation. *Clin Sci*. 91: 121-30.
- Gómez del Arco, Martínez M, Maldonado JL y Ortega P, Redondo J. 2000. A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J Biol Chem* 5: 13872-8.
- Gómez F, Ramos-Galván R, Frenck S, Cravioto J, Chávez R. y Vázquez J. 1956. Mortality in second and third degree malnutrition. *J Trop Pediat London*. 2: 77.
- González C, González H, Rodríguez L, Cortés E, Nájera O, Hernández-Hernández, Flores L y Bonilla E. 2006. Differential gene expression in lymphocytes from malnourished children. *Cell Biol Int*. 30: 610-614.
- Haluk D, Mehmet A, Ramazan S, Mehmet T, Tevfik N, Yasar C. 2002. Pro-inflammatory cytokines in Turkish children with protein-energy malnutrition. *M Inflamm*. 6: 363-365.
- Hebenstreit D, Wirnsberger G, Horejs-Hoeck y Duschl A. 2006. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev*. 17: 173-188.
- Hernán C. 2001. Malnutrición de micronutrientes. Estrategias de prevención y control. *Columb Med*. 2: 95-98.
- Hesketh J, Vasconcelos M y Bermano G. 1998. Regulatory signals in messenger RNA: determinants of nutrient-gene interaction and metabolic compartmentation. *Br Nutr* 80: 307-21.
- Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, Nakajima K, Pyun K y Kishimoto T. 1985. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci*. 82: 5490–5494.
- Hoffman-Goetz L. 1986. Malnutrition and immunological function whit special reference to cell-mediated immunity. *Yearb Phys Anthropol*. 29: 139-159.

- Holland J, Harcus M, Balic A y Maizels R. 2005. Th2 induction by *Nippostrongylus* secreted antigens in mice deficient in B cells, eosinophils or MHC Class I-related receptors. *Immunol Lett.* 96: 93-101.
- Howell M, Gao P, Grant A, Boguniewicz M, De Benedetto A, Schneider L, Barnes K y Leung D. 2007. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin. *J Allergy Clin Immunol* 6: 32-36.
- Hughes. S y Kelly Y. 2006. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. *Parasite Immunol* 28: 577-588.
- Ishihara K y Hirano T. 2002. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 357-368.
- Jong-Hwan P, Dong-Jae K, Yong-Ho P, Seung-Hyeok S, Sun-A C, Min-Won B, Hui-Young L y Jae-Hak P. 2004. Characteristics of the gastritis induced by *Listeria monocytogenes* in mice: microbiology, histopathology, and mRNA expression of inflammatory mediators with time course of infection. *Microb Pathog.* 37: 87-94.
- Kägi D, Lederma B, Burki k, Hengartner H y Zinkernaquel R. 1994. CD8+ T-Cell mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur J Immunol* 12: 3068-3072.
- Kallen K. 2002. The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases. *Mol Cell.* 1592: 323-343.
- Kammüller M y Ryffel B. 2000. Extrapolation of Experimental Safety Data to Humans: The Interleukin-6 Case. *Clin Immunol Immunopathol.* 83: 15-17.
- Karulin A, Hesse M, Tary-Lehmann M y Lehmann P. 2000. Single-Cytokine-Producing CD4 Memory Cells Predominate in Type 1 and Type 2 Immunity. *J Immunol.* 1164: 1862-18.
- Katsiari C G. y Tsokos G C. 2006. Transcriptional repression of interleukin-2 in human systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 5: 118-121.
- Katsuhiko I y Hirano T. 2002. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 357-368.
- Kiani A, Rao A y Aramburu J. 2000. Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity.* 124: 359-72.
- Kiyoshi T y Shizuo A. 2002. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11: 199-207.
- Lee A, Kang K, Kim Y, Cho M, Lee M, Shim C y Chung S. 2002. Identification of genes enhanced by protein-calorie malnutrition by essential display protein-calorie malnutrition

polymerase chain reaction (expression of fibrinogen B beta chain). *Cell Biochem.* 231: 163-171.

Lodolce J, Burkett P, Koka R, Boone D y Averil M. 2002. Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-2. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 42-439.

Lofty O, Selenh W y Barbari M. 1998. Study of some changes of cell-mediated immunity in protein energy malnutrition. *J Egypt Soc Parasitol.* 28: 413-428.

Löhning M, Chan H, Tykocinski L, Niesner U y Radbruch A. 2004. Cytokine memory in chronic immune activation. *Autoimmunity Rev.* 12: 590.

Löhning M, Richter A y Radbruch A. 2002. Cytokine memory of T helper lymphocytes. *Adv Immunol.* 80: 115-18.

Majewski J y Ott J. 2002. Distribution and Characterization of Regulatory Elements in the Human Genome. *Genome Res.* 12: 1827-1836.

Malavé I, Vethercourt M, Pirela M y Cordero R. 1998a. Serum levels of thyroxine-binding prealbumin, C-reactive protein and interleukin6 in protein-energy undernourished children and normal controls without or with associated clinical infections. *J Trop Pediatr.* 44: 256-262.

Malavé I, Vethercourt M, Chacón R, Quiñones D, Rebrij C y Bolivar G. 1998b. Production of interleukin-6 in cultures of peripheral blood mononuclear cells from children with primary protein-calorie malnutrition and from eutrophic control. *Ann Nutr Metab.* 42: 266-273.

Malek T. 2002 T helper cell, IL-2 and the generation of cytotoxic T cell responses. *Trends Immunol.* 23: 465-467.

Mac Donald y Nabholz. 1986. T-cell activation. *Ann Rev Cell Biol.* 2: 231-253.

Mc Guirk. P y Mills K .2002. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol.* 23: 450-455.

Mc Murray, Mintzer R, Bartow y Parr R. 1998. Dietary protein deficiency and Mycobacterium Boris BCG affect interleukin-2 activity in experimental pulmonary tuberculosis. *Infect Immunol.* 57: 2606-2611.

Miyazaki. T, Kawahara. A, Fujii H, Nakagawa Y, Minami Y, Liu Z.J, Oishi I, Silvennoinen O, Witthuhn B.A. y Ihle J.N. (1994). Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science.* 266: 1045-1047.

Mitsuyama K, Michio S y Rose-John S. 2006. Interleukin-6 trans-signaling in inflammatory bowel disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17: 451-461

- Mora R. 1999. Malnutrition: Organic and functional consequences. *World J Surg.* 23: 530-535.
- Morgan D A, Ruscetti F W y Gallo R. 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science.* 193: 1007-1008.
- Mugerwa. W. 1971. The lymphoreticular system in Kwashiorkor. *J Path.* 105: 105-109.
- Nájera O, González C, Toledo G, Cortés E, López L, Betancourt M y Ortiz R. 2001a. Early activation of T, B and NK lymphocytes in infected malnourished and infected well-nourished children. *J Nutr Immunol.* 5: 85-97.
- Nájera O, González C, Toledo G, López L, Cortés E, Betancourt M y Ortiz R. 2001b. CD45RA and CD45RO isoforms in infected malnourished and infected well-nourished children. *Clin Exp Immunol.* 126: 461-465.
- Nájera O, González C, Toledo G, López L y Ortiz R. 2004. Flow cytometry study of lymphocyte subsets in malnourished and well-nourished children with bacterial infections. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11: 577-580.
- Nájera O, González C y Ortiz R. 2006. El niño la desnutrición y las infecciones. Cap 61. En: *Tratado de pediatría Volumen II. El niño enfermo.* Editores, Emilo Escobar, Enrique Espinoza y Mauro Nono. Edit. Manual Moderno. Mexico. 1825- 1836.
- Nieto C. 2007. The effects of protein-energy malnutrition on the central nervous system in children. *Rev Neurol.* 2: 571-574.
- Palacio A, López M, Pérez B, Monkeberg F y Schlesinger L. 2002. Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 3040-3046.
- Park E, Kim B, Jong H, Son M, Kim S y Jin M. 2004. Control of IgE and allergy-related Th1 and Th2 cytokines by PG102, a water-soluble extract from *Actinidia*. *J A Clinical Immunol.* 113: 323-333.
- Paul W E. 1991. IL-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood.* 77: 1859-1870.
- Pelletier D, Frongillo E, Schroeder G, Habitch P. 1996. Efectos de la malnutrición en la mortalidad de menores de 5 años en países en desarrollo. *Bol OPS.* 120: 425-432.
- Prasad A. 2007. Zinc: mechanisms of host defense. *J Nutr.* 5: 1345-1349.
- Puntis J. 2001. Nutritional support at home and in the community. *Arch Dis Child.* 84: 295-298.
- Ramos-Galván R. 1976. Somatometría pediátrica. *Arch Inv Med. México.* 6: 5.

Resano-Pérez E, Vicencio-Acevedo C, Landeros-Díaz A, Shamah-Levy T, Rivera Dommarco J. Metodología. En: Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando Hernández S, González-Cossío T, Hernández-Prado B, Sepúlveda-Amor J. 2000. Encuesta Nacional de Nutrición II: Estado Nutricio de Niños y Mujeres en México. Cuernavaca, Morelos: Instituto Nacional de Salud Pública. 21-28.

Reyes H. 2002. Frequency and Determinants of Vitamin A Deficiency in Children Under 5 Years of Age with Pneumonia. *Archi Med. Res.* 33: 180-185.

Rickert M, Wang X, Boulanger MJ, Goriatcheva N y Garcia KC. 2005 . The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. *Science.* 308: 1477-80.

Robb R.J, Munck A y Smith K.A. 1981. T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. *J Exp Med.* 154: 1455-1474.

Rodríguez L, González C, Flores L, Graniel J y Ortiz R. 2005. Assessment by flor cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12: 502-507.

Romagnani P, Annunziato F, Piccinni. M, Maggi E y Romagnani S. 2000. Cytokines and chemokines in T lymphopoiesis and T-cell effector function. *Immunology Today* 21: 416-418.

Sanchez-Alvarez, Hernández T y Abreu P. 2002. Expresión génica de interleucina 1 en la deficiencia de proteínas y vitamina A. *ALAN* 52: 35-42.

Seigel L, Harper M, Wong S, Nash W y O'Brien S. 1984. Gene for T cell growth factor:location on human chromosome 4q and feline chromosome B1. *Science.* 223: 175-178.

Sepúlveda-Amor J, Lezana M, Tapia C, Valdespino J y Madrigal H. 1985. Estado nutricional de preescolares y mujeres en México: Resultados de una encuesta probabilística nacional. *Gac Med Mex.* 6: 207-225.

Scherbaum V y Fürst P. New concepts on nutritional management of severe malnutrition: the role of protein. 2000. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 3: 31-38.

Singh M. 2004. Role of micronutrients for physical growth and mental development. *Science.* 1: 59-62.

Taniguchi T. 1988.Regulation of cytokine gene expression. *Ann Rev Immunol.* 6: 439-454.

Kevin Smith, M.D. 2000. Evolution necrobios lipoidea. *J Derma* 1: 12-15.

Toshitkatsu H y Akihiko Y. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 413-421.

Ulíbarri J, González M, González A, Fernández G, Rodríguez F y Mancha A. 2002. Nuevo procedimiento para la detección precoz y control de la desnutrición hospitalaria. *Nutr Hosp.* 17: 179-188.

Vásquez-Garibay E. 2003. Citocinas y desnutrición proteica energética en el niño. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 60: 5-8.

Venter C, Mark D, Adams E, Myers P, Li, Mural R, Sutton G, Smith H., Yandell M, Cheryl A, Evans, Holt R, Gocayne J., Amanatides P, Ballew R, Huson D, Wortman J, Zhang Q, Chinnappa. 2001. The Sequence of the Human Genome. *Science.* 1304

Vethencourt M, Pirela, Sousa P, Acuña M, Cordero R y Baute L. 1994. Correlacion entre prealbúmina, proteína C reactiva e interleuquina-6 en niños desnutridos con o sin infección clínica. *Arch Lat Nutr.* 44: 93-95.

Vinogradov E. 2006. Genome design model: Evidence from conserved intronic sequence in human-mouse comparison. *Genome Res.* 16: 347-354.

Wieringa M, Dijkhuizen C y West J. 2004.Reduced production of immunoregulatory cytokines in vitamin A- and zinc-deficient Indonesian infants. *Eur J Clinical Nutrition.* 58: 1498-1504.

www.unicef.org/spanish Un balance sobre la nutrición. Número 4, ABRIL DE 2006, UNICEF.

Yamanouchi J, Rainbow D, Serra P, Howlett S, Hunter K, Garner V, Gonzalez-Munoz, Clark J, y Veijola, R. 2007. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nature Genet.* 39: 329-337.

Yuko S, Steven C, Wojciech K, Bruce A y Jack A. 2005. The role of cytokine mRNA stability in the pathogenesis of autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 5: 517-527.

Zurita J y Hernández M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública. 2006.