

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-UNIDAD IZTAPALAPA**



**Casa abierta al tiempo**

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD**

**EVALUACION DE LA EXPRESION GENICA DE CITOCINAS RELACIONADAS  
CON EL BALANCE T1/T2 EN NIÑOS CON DESNUTRICION CALORICO  
PROTEICA SEVERA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN BIOLOGIA  
EXPERIMENTAL.**

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

**M. en 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.**

## **COMITE 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.**

**El Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, esta incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio 0904-0.**

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

**Para la realización de esta tesis se contó con la Beca Mujeres ICyTDF Ruth Galla BM09-308**

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 génica de citocinas relacionadas con el balance T1/T2 en niños con desnutrición calórico proteica severa que presentó:

M en Biol. Exp. Haydeé González Martínez

El día 22 de Julio del 2010

Jurado de Exámen:

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

\_\_\_\_\_

Dr. David Cruz Robles  
S E C R E T A R I A

\_\_\_\_\_

Dra. Leonor Rodríguez Cruz  
V O C A L

\_\_\_\_\_

Dr. Dr. Rubén Darío Martínez Pérez

V O C A L

\_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Cristina González** por dejarme ser parte de este proyecto, por su paciencia, apoyo y confianza, por no rendirse y hacerme entender que todo es posible y juntas sacar adelante este trabajo, pero sobre todo por ser una amiga que siempre está en los momentos alegres y tristes de mi vida. Mil gracias.

A la **Dra. Oralia Nájera** por los consejos, el apoyo en los momentos difíciles y por los comentarios que me ayudaron a mejorar esta investigación.

Gracias a la **Dra. Leonor Rodríguez** por sus recomendaciones y su apoyo para alcanzar las metas propuestas en esta investigación y sobre todo por alentarme a no darme por vencida.

Al **Dr. David Cruz** por la revisión de esta tesis las recomendaciones y por aceptar ser miembro del 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. Ruben Darío Martínez Pérez** por ser parte del jurado y por el apoyo con esas clases en las que aprendí mucho

Al **Dr. Jaime Graniel** y a sus secretarias por la obtención del material biológico necesario para concluir este trabajo.

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

## DEDICATORIA

Dedico este recorrido profesional y personal a mi **Mamita Mari**, a mi **Papito José Luís** y a mi **hermano Alejandro**, porque **Dios** siendo tan grande me dio la oportunidad de ser parte de su familia y gracias a sus consejos cada día me convierto en un mejor ser humano, con la capacidad de entender lo maravillosa que es la vida. ¡Los amo!

A esas personitas que hoy forman parte de mi vida que por suerte son muchas, 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.

## INDICE

	Página
Indice de figuras .....	i
Indice de cuadros .....	ii
Resumen en español.....	1
Resumen en ingles .....	2
1 INTRODUCCION .....	3
1.1 Aspectos de la desnutrición .....	4
1.2. Inmunológica y desnutrición .....	9
1.3 Sistema inmunológico .....	12
1.4 Origen de las células Th .....	13
1.5 El tipo de citocinas define la dominancia Th1-Th2 .....	14
1.5.1 Interleucina-12 .....	18
1.5.2 Interleucina-18 .....	22
1.5.3 Interleucina-21.....	24
1.5.4 Factor de necrosis tumoral.....	25
1.5.5 Interferón-γ .....	31
1.5.6 Interleucina-10 .....	34
2. JUSTIFICACION .....	38
3. OBJETIVO GENERAL .....	39
3.1 Objetivos particulares .....	39
4 HIPOTESIS .....	39
5 MATERIAL Y METODOS .....	40
5.1 Características de la población de estudio .....	40
5.2 Aislamiento de células mononucleares .....	42
5.3 Obtención de RNA .....	42
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 .....	45
6 RESULTADOS .....	45
6.1 Características clínicas de la población estudiada .....	45

7 Amplificación para determinar la eficiencia y la sensibilidad del método de PCR en tiempo real .....	49
7.1 Curvas de rango dinámico .....	49
7.2 Expresión relativa de los RNAm de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18, IL-21 e IL-10 .....	51
7 DISCUSION .....	59
8 CONCLUSION .....	67
9 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	68



**INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Características físicas de la desnutrición .....	8
Figura 2. Acciones biológicas de la IL-12 .....	20
Figura 3. Acciones biológicas del factor de necrosis tumoral .....	28
Figura 4. . Acciones biológicas del IFN- $\gamma$ .....	34
Figura 5. Eficiencia y sensibilidad de PCR en tiempo real .....	50
Figura 6. Eficiencia y sensibilidad de PCR en tiempo real .....	50
Figura 7. Niveles de expresión relativa del gen de IL-12 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), de segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3) .....	52
Figura 8. Niveles de expresión relativa del gen de IL-18 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3) .....	53
Figura 9. Niveles de expresión relativa del gen de IL-21 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3) .....	54
Figura 10. Niveles de expresión relativa del gen de IFN- $\gamma$ en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3) .....	55
Figura 11. Niveles de expresión relativa del gen de TNF- $\alpha$ en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3) .....	56
Figura 12. Niveles de expresión relativa del gen de IL-10 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3) .....	57
Figura 13. Niveles de expresión relativa de los genes de IL-12, IL-18, IL-21, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-10 en niños bien nutridos con infección de tipo gastrointestinal y respiratoria (BNI) y en niños desnutridos con infección de tipo gastrointestinal y respiratoria (DN1, DN2 y DN3). .....	58

**INDICE DE CUADROS**

Cuadro 1. Características de las dos formas de desnutrición severa.....	9
Cuadro 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de cada una de las citocinas y el gen constitutivo .....	44
Cuadro 3. Características clínicas de los niños bien nutridos infectados	46
Cuadro 4. Características clínicas de los niños desnutridos de primer grado	47
Cuadro 5. Características clínicas de los niños desnutridos de segundo grado .....	47
Cuadro 6. Características de los niños desnutridos de tercer grado .....	48

## RESUMEN

La desnutrición calórico proteica (DCP) constituye un serio problema de Salud Pública en nuestro país. A la desnutrición se le relaciona con alteraciones en diferentes mecanismos de defensa inmunológica. Algunas moléculas importantes del sistema inmunológico son las citocinas, las cuales juegan un papel central en éste. La disminución o aumento en la expresión de ellas podría ser uno de los factores que permitiría explicar el deterioro de la respuesta inmunológica observada en los niños desnutridos.

El objetivo del presente trabajo fue determinar los niveles de expresión relativa del RNAm de los genes que codifican para citocinas de respuesta T1 (*IL-12*, *IL-18*, *IL-21*, *IFN- $\gamma$*  y *TNF- $\alpha$* ) y de respuesta T2 (*IL-10*) en niños DN1, DN2, DN3 y BNI. Los resultados obtenidos revelaron que existe una disminución en la expresión relativa del RNAm de los genes que codifican para *IL-12*, *IL-18*, *IL-21* e *IFN- $\gamma$* , y un aumento en la expresión relativa del RNAm de los genes que codifican para *TNF- $\alpha$*  e *IL-10* en niños desnutridos en comparación con niños bien nutridos. Los niños DN1 mostraron diferencia estadísticamente significativa con los DN2 y DN3 sólo para *TNF- $\alpha$* , en cuanto al tipo de infección entre los pacientes desnutridos y bien nutridos con infección de tipo respiratoria y gastrointestinal no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las citocinas estudiadas.

La disminución en la expresión de los genes de *IL-12*, *IL-18*, *IL-21* e *IFN- $\gamma$*  y el incremento de *TNF- $\alpha$*  e *IL-10* observada en este estudio, indican que existe una alteración en el balance T1/T2, esta modificación podría estar provocando que el sistema inmunológico de los niños desnutridos sea incapaz de combatir las infecciones ya que es precisamente el balance entre las respuestas Tipo 1 y Tipo 2 el que finalmente conduce a la resolución de la infección. Con base en todo lo anterior, se considera que las alteraciones en la expresión relativa de los genes de citocinas demostradas en este estudio, podrían estar relacionadas con la deficiente respuesta inmunológica reportada previamente en niños con desnutrición.

## ABSTRACT

Protein-Calorie malnutrition (PCM) is a serious Public Health problem in Mexico. Malnutrition is related with different immunologic-defense mechanisms. Some important molecules of the immune system are the cytokines, which play a central role in it. A decrease or increase in its expression is one of the factors which could let us explain the immune system deterioration observed in malnourished children.

Results obtained in this work revealed that there is a diminution in the relative expression of RNAm of the genes which codify for *IL-12*, *IL-18* and *IFN- $\gamma$* , and a raise in the relative expression of RNAm of the genes which codify for *TNF- $\alpha$*  and *IL-10* in malnourished children in comparison with well-nourished children. DN1 children showed a significant difference with DN2 and DN3 children only for *TNF- $\alpha$* . As regards the infection type, comparing well-nourished with malnourished children with respiratory and gastrointestinal infections no significant differences in any of the cytokines studied were found.

The decrease in expression of *IL-12*, *IL-18*, *IL-21* and *IFN- $\gamma$*  genes and the increase of *TNF- $\alpha$*  and *IL-10* observed in this research indicate that there is an alteration in the balance T1/T2, this modifications could be the origin of the inability of malnourished children's immune system to fight infections, given that the balance between the responses Type 1 and Type 2 is precisely the one which leads to healing an infection.

Thus, it is considered that alterations in the relative expression of cytokine's genes demonstrated in this work could be related with the deficient immune response previously reported in malnourished children.

## 1. INTRODUCCION

El crecimiento y desarrollo de los niños se caracteriza por una secuencia ordenada de eventos cronológicos, de numerosos detalles en su expresión física y cognoscitiva, y por la gran variabilidad de resultados en cuanto a la capacidad física y funcional del individuo. Asimismo, la interacción de múltiples factores nutricionales que condicionan el crecimiento y el desarrollo, determina la óptima realización del potencial genético de cada ser humano. 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 está 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., 2000).

La desnutrición puede definirse como un desbalance entre los aportes y requerimientos de uno o varios nutrientes, al que el organismo responde con un proceso de adaptación. Un déficit de nutrientes de corta duración sólo compromete las reservas del organismo, sin alteraciones funcionales importantes en el individuo; en cambio una desnutrición de larga duración puede llegar a comprometer funciones vitales (Hernán, 2001). El deterioro nutricional, en los casos graves de desnutrición aparte del consumo de las reservas musculares y grasas y de la detención del crecimiento, compromete en forma importante y precoz la inmunidad del individuo, especialmente la inmunidad celular, produciéndose así una estrecha interrelación entre desnutrición e infección, con subsecuente agravamiento del problema, especialmente frente a condiciones ambientales adversas.

El papel del sistema inmunológico es reconocer a los agentes invasores, repelerlos y/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 la defensa del organismo, 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 DESNUTRICION**

La desnutrición calórico proteica (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).

En los países en vías de desarrollo, la desnutrición infantil se encuentra entre las primeras cinco causas de mortalidad y se inserta en un contexto de variables sociales, económicas y culturales que además de ser muy desfavorables son, por sí mismas, factores de riesgo que alteran el desarrollo infantil (UNICEF, 2005). En México aunque ha disminuido la prevalencia de la desnutrición en menores de cinco años continúa siendo un grave problema de Salud Pública, a pesar de que durante décadas se han llevado a cabo diversos programas nacionales con el propósito de mejorar la situación nutricional de los niños.

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 (Olaiz-Fernández et al., 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 de peso y consumo de las 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 (Vásquez-Garibay et al., 1999).

En los estudios sobre desnutrición, se han establecido tres grados de desnutrición primaria basados en la relación peso corporal-edad cronológica y peso para la talla (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 grave 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 rápidamente agravarse (Pelletier et al., 1996).

La desnutrición comprende 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).

Los niños con desnutrición severa presentan síntomas denominados signos universales que están siempre presentes:

- I. Alteraciones en el crecimiento y desarrollo
- II. Dilución y alteraciones del metabolismo hidromineral. Aumento del contenido de agua de los espacios intra y extracelulares, disminución del potasio intracelular, sodio intracelular elevado, calcio y fosfatos bajos.
- III. Disproteïnemia.
- IV. Alteraciones en el funcionamiento renal. Disminución de la filtración glomerular y del flujo plasmático renal.



- V. Alteraciones endocrinas. Disminución del metabolismo basal y del consumo de oxígeno.
- VI. Trastornos del metabolismo de las grasas. La absorción de grasas se encuentra disminuida. Concentración plasmática baja de lípidos totales.
- VII. Alteraciones inmunológicas. Inmunidad natural e inmunidad adquirida afectadas.

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

#### 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 (MacDonald, 2008; Collins et al., 2006). Fenotípicamente el marasmo se caracteriza por la falta extrema de crecimiento, atrofia de los músculos; cara delgada, marchita con apariencia de “anciano”, diarrea y signos de deshidratación (Figura 1).

#### 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 (MacDonald, 2008; Collins et al., 2006). (Figura 1).



Marasmo



Kwashiorkor

Figura 1. Características físicas de la desnutrición.

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). 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 et al, 1995).

	MARASMO	KWASHIORKOR
Inicio	Primer año de vida	Segundo año de vida
Se asocia	Destete temprano	Destete tardío
Evolución	Crónica	Aguda
Enfermedades Infecciosas	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

## 1.2 INMUNOLOGIA Y DESNUTRICION

El estado nutricional-metabólico puede tener una influencia notable sobre la evolución de las enfermedades producidas por agentes biológicos. La DCP 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 (Hernán, 2001; Barreto et al., 2000).

Por sí mismas, las infecciones provocan 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 (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 inmunológicos se verán comprometidos y se repetirán nuevamente las infecciones, lo que conducirá a las formas graves de la DCP (Hughes y Kelly, 2006). La inmunocompetencia constituye una medida 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 más frecuentes, prolongadas y graves (Nájera et al., 2006; Chandra, 1999).

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 et al., 2003).

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).

En cuanto a los órganos linfoides primarios, que son de vital importancia en la respuesta inmunológica, 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 (Hoffman-Goetz, 1986).

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, 1991). Existen afectaciones en algunos mecanismos inductores inespecíficos relacionados con la inflamación como la fagocitosis y el complemento. 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).

Con relación a las sub-poblaciones de linfocitos circulantes en niños desnutridos se observó una disminución significativa en el número de linfocitos T CD4+, T CD8 y T totales (Chandra, 1991); sin embargo en otros estudios los cambios en los linfocitos T se asocian mas con las infecciones que padecen estos niños. Se ha determinado que estas anormalidades fueron rápidamente revertidas cuando se sometió a los pacientes a terapias de nutrición adecuada.

Otro reporte señala que no hay diferencias significativas entre las sub-poblaciones 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 también 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<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> en sangre periférica, en niños con desnutrición moderada o severa (Nájera et al., 2001b), así como también en células CD4<sup>+</sup>CD62 cooperadoras) y CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> citotóxicas (Nájera et al., 2007).

### **1.3 SISTEMA INMUNOLOGICO**

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. 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, estos dos componentes, brindan un sistema de protección notablemente efectivo (Guerrero, 2007).

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 la lisozima, 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) (Guerrero, 2007).

Mientras que la inmunidad adquirida puede ser de dos tipos: inmunidad celular e inmunidad humoral. La inmunidad humoral que es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas, en el cual, los componentes del sistema inmune que atacan a los antígenos son los anticuerpos secretados por activación antigénica. 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 (Collado et al., 2008).

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, la clasificación de las sub-poblaciones de linfocitos B generalmente se realiza tomando en cuenta la clase de inmunoglobulina que sintetizan. Por otro lado los linfocitos T, dentro de los cuales existen dos sub-clases principales: los llamados T cooperadores ( $CD4^+$ ) y los citotóxicos ( $CD8^+$ ). (McGuirk y Mills, 2002). Las sub-poblaciones 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 se expresan en la superficie de la membrana. Los linfocitos T cooperadores o colaboradores se caracterizan porque presentan sobre su membrana el antígeno  $CD4^+$ , de estos se han identificado dos sub-poblaciones, en base a su producción de citocinas las cuales han sido denominadas Th1 y Th2 (Beutler, 2004).

#### **1.4 ORIGEN DE LAS CELULAS Th**

Las células  $CD4^+$  cooperadoras tipo 1 (Th1) y tipo 2 (Th2) se originan a partir de un grupo general de células T conocidas como células T  $CD4^+$  vírgenes. La diferenciación se lleva a cabo por la interacción entre las células T  $CD4^+$  y las células presentadoras de antígeno (APC). La presentación del antígeno a las células T  $CD4^+$  ocurre a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y del péptido inmunogénico. A este proceso de diferenciación se le conoce como polarización (Lafaille, 1998; Mosmann y Sad, 1996,). La interacción entre las células T  $CD4^+$  y APC requiere señales mediadas por el MHC (sobre las APC) y el péptido inmunogénico y para el antígeno de células T ( $CD4^+$ ), además de señales co-estimuladoras mediadas por CD40, CD80 ó CD86 (sobre las APC) y CD54 ó CD28 (sobre  $CD4^+$ ) (Kuchroo et al, 1995). Al llevarse a cabo esta interacción, las células T pasan por un estado de preactivación (Th0) antes de diferenciarse en Th1 ó Th2. La polarización de las células Th puede ser un indicador de una polarización más profunda del sistema inmunológico en general, ya que las células que tienen un contacto directo con el

antígeno, con las células dendríticas (CDs), monocitos, macrófagos y otras APC, y comienzan una polarización tipo 1 o tipo 2 (Mosmann, y Coffman, 1989). El proceso de polarización de las células T es dirigido, principalmente, por citocinas y CDs. Las CDs inmaduras (CDi), ubicadas en tejidos periféricos, son células altamente endocíticas adaptadas para la captura de antígenos, aunque son APC ineficientes. Al llevarse a cabo el encuentro con el antígeno, las CDi migran a los nodos linfáticos y aumentan la expresión de moléculas del MHC, de adhesión y de moléculas co-estimuladoras, convirtiéndose en CDs maduras (CDm). En este estado de maduración las CDs son potentes APC que despliegan una capacidad única para activar y polarizar las células T vírgenes (Lanzavecchia y Salluto, 2001). Las CDs pueden polarizar las células T por mediadores inflamatorios presentes en el microambiente periférico. Las CDi que son expuestas a un estímulo de maduración e interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) producen cantidades elevadas de interleucina-12 (IL-12), IL-18 e IL-21 factores cruciales en la inducción de la respuesta Th1; asimismo, esta diferenciación a Th1 se da por la interacción de señales co-estimuladoras CD28-CD80. Los niveles de IL-12 derivados de las CD son un mecanismo de balance en la polarización Th1-Th2, pero también pueden estar involucrados factores adicionales, como la cantidad y duración de la estimulación antigénica o la naturaleza de las moléculas co-estimuladoras (Hilkens et al., 1997).

### **1.5 EL TIPO DE CITOCINAS DEFINE LA DOMINANCIA Th1-Th2**

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 RNA mensajero (RNAm) 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.

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 (Taniguchi, 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 trans-membranal se encuentra una larga cola citoplásmica con ciertas tirosinas susceptibles de fosforilación (Choy y Panayi, 2001). 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 y gamma, son las subunidades transductoras 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 y Bosteau, 2006).

Las células T CD4+ vírgenes, o Th0, se diferencian en sub-poblaciones celulares tradicionalmente denominadas Th1 y Th2, con funciones diferentes, determinadas por la forma de inducción, los patrones de citocinas que producen y los mecanismos efectores desencadenados por ellas. Para su diferenciación, las células Th1 necesitan la presencia de estímulos que favorezcan la producción de IL-12 por parte de las células presentadoras de antígeno (APC), como los organismos intracelulares, lo que lleva a la activación de vías de señalización en las que participan factores de transcripción como STAT1 (del inglés Signal Transducer and Activator of Transcription), STAT4 y t-bet induciendo la producción de IFN- $\gamma$  e inhibiendo el desarrollo de una respuesta de tipo Th2 (Vélez et al., 2007).

La polarización por estimulación antigénica a Th1 induce la liberación de IL-12, esta citocina provoca la activación de las células asesinas (NK) que responden liberando IFN- $\gamma$ , reforzando la producción de IL-12 por las APC ayudando a que más células T vírgenes se diferencien a Th1. Al alcanzar la madurez, las células Th1 producen IFN- $\gamma$ , el cual (junto con el liberado por las NK) estimula a las APC y células T vírgenes a polarizarse en más células Th1 sirviendo como una señal reguladora autocrina. Al igual que las células Th1, las células Th2 dependen de las citocinas de su ambiente. Su maduración probablemente sea iniciada por IL-6 producida por las APC, pero también por IL-4 secretada por las células NK, mastocitos y eosinófilos. Al alcanzar la madurez las células Th2 producen su propia IL-4 que, junto con la secretada por otras células, conforma su autorregulación comprometiendo a las células T vírgenes a diferenciarse en Th2 (Jankovic et al., 2001).

Las células Th1 producen principalmente IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . La IL-2 es un factor de crecimiento que estimula células CTLs (Linfocitos T citotóxicos) y NK a proliferar. El TNF- $\alpha$  activa a las células NK además de a los macrófagos. El IFN- $\gamma$

es una citocina que activa macrófagos, y da señal a las células B durante el cambio de clases de Igs, para que produzcan anticuerpos IgG3 que son buenos opsonizadores víricos y bacterianos y fijadores de complemento. Por estas razones, es posible referirse a las células Th1 como células responsables de la respuesta inmune mediada por células, por que liberan citocinas que instruyen al sistema innato y adaptativo a producir células y anticuerpos que son efectivos en este tipo de respuesta (Isomaki et al., 1999).

Las células Th2, secretoras de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, median el crecimiento, la diferenciación y la activación de mastocitos y eosinófilos, promueven la producción de anticuerpos no-citotóxicos, dirigen el cambio de Igs hacia los subtipos IgE, IgG1 e IgA, e inhiben la activación de los macrófagos. Por lo tanto, es apropiado referirse a las células Th2 como células responsables de la respuesta inmunológica de tipo humoral (Aarvak et al., 2000).

Una característica importante en el balance Th1-Th2 es realizada por el bloqueo de maduración del tipo celular contrario; por ejemplo, el IFN- $\gamma$  secretado por las células Th1 puede impedir la proliferación de las células Th2 y por el contrario, altas concentraciones de IL-4 ó IL-6 pueden bloquear la generación de células Th1. La presencia de células Th1 produce un tipo de inmunidad mediada por células y la inflamación dependiente de fagocitos. A su vez, las células Th2 inducen una respuesta fuerte de anticuerpos (incluyendo la clase IgE) y la acumulación de eosinófilos, pero inhibe varias funciones de las células fagocíticas (inflamación independiente de fagocitos) (Romagnani, 2000).

Las citocinas, como se mencionó anteriormente son factores importantes relacionados con el desarrollo de la respuesta inmunológica a nivel celular y humoral. A continuación se enuncian las características principales de IL-12, IL-18, IL-21, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-10.

### **1.5.1 INTERLEUCINA-12**

#### Características generales

La interleucina 12 (IL-12) es una citocina de la inmunidad innata que fue descubierta en 1989 por su capacidad de estimular la actividad de las células naturales asesinas (NK), poco después se han ido conociendo sus múltiples efectos sobre las diferentes poblaciones de linfocitos responsables de la inmunidad celular de nuestro organismo. En contraste con otras citocinas, la IL-12 es la única que en su estructura tiene 2 cadenas polipeptídicas: la P-40 y la P-35. Su actividad va desde los múltiples efectos sobre las NK y la diferenciación de las células T, incluye la inducción de la síntesis y secreción de otras citocinas, el aumento de la actividad de las células citotóxicas, hasta la proliferación de las células T y NK. La función más importante de la IL-12 es la inducción de la síntesis de IFN- $\gamma$  porque él es un mediador de la resistencia viral, fúngica, bacteriana y parasitaria (Del Vecchio et al., 2007).

#### Acciones biológicas y producción

La IL-12 es esencial para el inicio de una secuencia de respuestas en la que intervienen macrófagos, células NK y linfocitos T, que da lugar a la erradicación de microorganismos intracelulares. Los macrófagos producen IL-12 en respuesta a diversos microorganismos. La IL-12 secretada estimula en las células NK y en las células T la producción de IFN- $\gamma$ , que a su vez activa a los macrófagos para que destruyan los microorganismos fagocitados (Herrera et al., 2005). Se producen grandes cantidades de IL-12 en la sepsis grave por bacterias gramnegativas, lo cual da lugar a la producción de IFN- $\gamma$ , que establece sinergia con el LPS para estimular en los macrófagos la producción de TNF, el principal mediador del choque séptico (Sánchez de la Rosa y Rodríguez H. 2001). Los antagonistas de la IL-12 previenen la letalidad en modelos experimentales de choque séptico inducido por LPS. IL-12 estimula la diferenciación de los linfocitos T colaboradores CD4+ en células Th1 productoras de IFN- $\gamma$ . La sub-población Th1 de las células T colaboradoras activa a los fagocitos en la inmunidad celular. La IL-12 también es un factor de crecimiento para las células T; aumenta la

función citolítica de las células NK activadas y de los linfocitos CD8<sup>+</sup>. (Figura 2) (Yadav y Sarvetnick, 2003).

Las principales fuentes de IL-12 son los fagocitos mononucleares activados y las células dendríticas. Parece que hay muchas células que sintetizan la subunidad p35, pero sólo estas células presentadoras profesionales sintetizan el componente p40 y, por tanto, la citocina biológicamente activa. Los estímulos para la producción de IL-12 son el LPS, la infección por bacterias intracelulares tales como *Listeria* y micobacterias, y la infección por virus. Además, las células T colaboradoras estimuladas por el antígeno inducen la producción de IL-12 en los macrófagos y las células dendríticas, principalmente por el acoplamiento del ligando de CD40 de las células T con el CD40 de los macrófagos y las células dendríticas. El IFN- $\gamma$  producido por las células NK o por las células T también estimula la producción de IL-12. De esta forma, las APC profesionales generan IL-12 cuando presentan antígenos a las células T durante las fases de inducción y efectora de las respuestas inmunitarias celulares (Herrera et al., 2005).

#### Características de la proteína y del receptor

La molécula biológicamente activa es un heterodímero compuesto por dos subunidades de 35 y 40 kDa respectivamente. La primera subunidad p35 tiene secuencias de aminoácidos que la relacionan con la IL-6, mientras que la subunidad p40 tiene una homología con el dominio extracelular del receptor de IL-6 (IL-6R) (Oshimi y Hoshino, 1992).

El receptor de IL-12 (IL-12R) es un complejo glicoprotéico formado por al menos dos subunidades, relacionadas estructuralmente con la superfamilia de receptores de citocinas Tipo I. La afinidad de IL-12 por cada una de las subunidades por separado es baja, se requiere la co-expresión de la dos subunidades para que la citocina se una al receptor con elevada afinidad. La cadena p40 interacciona con la subunidad 1 y la cadena p35 es la responsable de inducir la señal. Al igual que muchos receptores de citocinas, el IL-12R carece de actividad enzimática

intrínseca, de manera que transduce la señal a través de la acción de la quinasa janus (JAKs) (O' Shea et al., 2002).

Características del gen y factores de transcripción

El gen que codifica para IL-12 se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6 en las bandas 31 –33 ( 6p31-33) (Thomson, 1994).

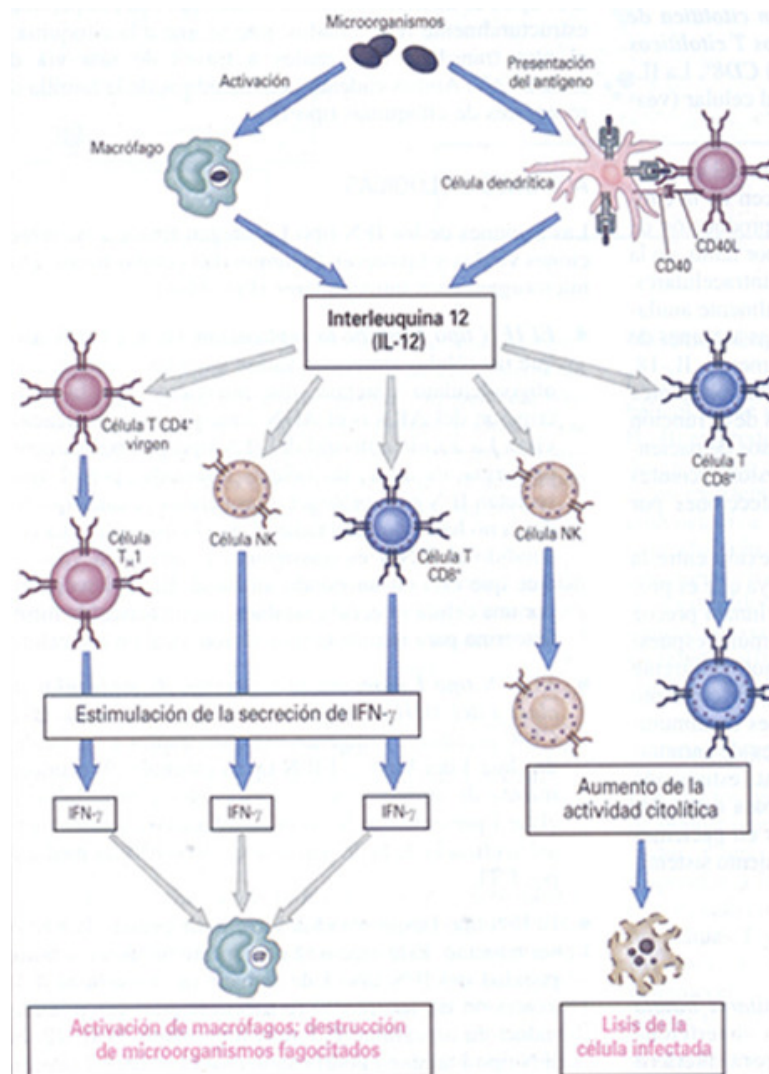


Figura 2. Acciones biológicas de la IL-12. La IL-12 es producida por los macrófagos y las células dendríticas. Actúa sobre los linfocitos T y las células NK estimulando la producción de IFN- $\gamma$  y la actividad citolítica, acciones que contribuyen a la erradicación de microorganismos intracelulares (Tomado de Abbas et al., 2002)

Los ratones con inhibición génica selectiva del componente p40 de la IL-12, carecen de la citocina funcional, presentan un defecto de la producción de IFN- $\gamma$  y del desarrollo de las células Th1 y, por consecuencia, de la inmunidad celular frente a microorganismos intracelulares. Sin embargo, la síntesis de IFN- $\gamma$  no está totalmente anulada en estos ratones, probablemente debido a las acciones de otras citocinas compensadoras. Los ratones knock out para IL-12 también presentan defectos de la función de las células NK. Se han descrito algunos casos de pacientes con mutaciones del receptor de la IL-12; estos pacientes, tienen una susceptibilidad elevada a las infecciones por Salmonella y micobacterias atípicas (Barrie y Plevy, 2005). Recientemente se ha descrito un factor proteico denominado p19, sin actividad biológica por sí mismo, que se combina con la subunidad p40 de la IL-12 para dar lugar a una nueva citocina biológicamente activa denominada IL-23. Esta citocina es producida por células dendríticas activadas, se une al receptor de la IL-12 y comparte algunas de las funciones biológicas con ella (Oppmann et al., 2000). Se reportó la existencia de una mutación en el gen que codifica para IL-12Ra1, en esta inmunodeficiencia se presenta un fenotipo inmunológico y celular intermedio en el que hay una respuesta baja a la IL-12, misma que es posible incrementar con IL-18, en esta deficiencia sólo es posible detectar el receptor en el citoplasma de las células, pero no en su superficie. La incidencia de individuos estrictamente asintomáticos con mutaciones genéticas que abaten la inmunidad mediada por IL-12 sugiere que es posible la existencia de vías alternas que compensen la pérdida de señalización por esta citocina, tales como las mediadas por IL-18 y/o IL-23 (Lichtenauer-Kaligis et al., 2003).

### **1.5.2 INTERLEUCINA-18**

#### Características generales

La IL-18 es la citocina de la inmunidad innata que juega un papel importante en la respuesta de tipo Th1 a través de la inducción de la síntesis de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el aumento de la actividad citotóxica de los LTC (linfocitos T citolíticos) y de las células NK. Posee también la capacidad de inducir la producción de otros mediadores pro-inflamatorios, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, que aumentan la proliferación de células T, y la activación de los LTC. La IL-18 cumple sus actividades biológicas a través de un receptor heterodimérico compuesto por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$  (IL-18R $\alpha$  y IL-18R $\beta$ ). La IL-18R $\alpha$  se une al ligando, mientras que la IL-18R $\beta$  es la cadena transductora de señal (Akira, 2000).

#### Acciones biológicas y producción

La IL-18 es una citocina pleiotrópica, induce la producción de IFN- $\gamma$  en las células T, B y NK, particularmente en sinergia con IL-12 (Dinarello 1999). Además, IL-18 actúa como co-estimulador de las células Th1 aumentando la producción de IFN- $\gamma$ , IL-2, GM-CSF e IL-2R $\alpha$ , mientras que no tiene ningún efecto sobre las células Th2. De hecho, solamente las células Th1 expresan IL-18R (Kohno et al., 1997). IL-18 estimula la síntesis de IFN- $\gamma$  en células T, y en combinación con IL-12 la síntesis se incrementa. IL-18 junto con IL-12 inhiben la producción de IgE en células B activadas (Micallef et al., 1996). Cuando las células T son estimuladas con IL-12 e IL-18 en presencia o la ausencia de anti-CD3, esas células T estimuladas por la unión al receptor de células T (TCR) pueden convertirse en células Th1 (Yoshimoto et al., 1998).

La IL-18 es producida por monocitos y macrófagos en presencia de diversos componentes microbianos; desempeña un papel importante en la inmunorespuesta natural a los patógenos. Los macrófagos murinos, tales como células de Kupffer, macrófagos alveolares, células peritoneales y células de la microglia, secretan IL-18 funcional una vez que son activadas con los estímulos



apropiados (Conti et al., 1999; Prinz et al., 1999). En cambio, las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) pueden secretar pro-IL-18 bajo condiciones normales. Las células dendríticas también expresan IL-18 maduro. Las células epidérmicas, particularmente queratinocitos, células epiteliales intestinales y de las vías aéreas expresan IL-18 (Cameron et al., 1999; Takeuchi et al., 1997), las células del estroma de osteoblastos pueden secretar IL-18. La secreción IL-18 es también perceptible en el sistema nervioso central y el endocrino (Udagawa et al., 1997; Mizutani et al., 1991).

#### Características de la proteína y del receptor

IL-18 en humanos es una proteína que consiste en 193 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de IL-18 humano es 65% homólogo con el de IL-18 murino. IL-18 carece de una secuencia líder generalmente necesaria para la secreción; se sintetiza como una proteína de 24 kDa y se ha observado que IL-18 tiene semejanzas tridimensionales con la estructura proteica de IL-1 $\beta$ , con una conformación similar de unión al receptor de IL-1, sugiriendo que IL-18R puede tener homología con IL-1R. Así IL-18 es un citocina caracterizado por una semejanza estructural a IL-1 $\beta$  (Bazan et al., 1996).

#### Características del gen y factores de transcripción

El gen de IL-18 se expresa constitutivamente en muchos tipos celulares, mientras que el mRNA para la mayoría de las otras citocinas no se expresa bajo condiciones normales sino se induce generalmente después de un estímulo apropiado. El gen de IL-18 murino se compone de siete exones y un intron. Tiene dos promotores, uno que está situado corriente arriba desde el exón 1 y el otro corriente arriba del exón 2. Ambos promotores son bajos en secuencias TATA y en G y C, que son utilizados por una amplia gama de tipos celulares, mientras que la mayoría de las otras citocinas utilizan un promotor tipo TATA, lo que puede explicar porque IL-18 se expresa no sólo en macrófagos sino también en células no inmunes (Tone et al., 1997).

Recientemente se reporto que IL-18 participa en la diferenciación de las células Th17 estimulando la producción de IL-17 en sinergia con IL-23 (Pradeep et al., 2009).

### **1.5.3 INTERLEUCINA-21**

#### Características generales

La IL-21 es miembro de la familia del factor de crecimiento de células T (TCGF), al igual que IL-2 e IL-15. IL-21 está implicada en el desarrollo y la diferenciación de las células NK, así como en la activación y la proliferación de las células B y contribuye a la proliferación de los linfocitos T nativos, pero no de memoria. Sin embargo, el espectro completo de la actividad IL-21 en las células T sigue siendo confuso. Se ha observado, que IL-21 desempeña un papel autocrino/paracrino en la regulación de inmuno-respuestas (Ferrari-Lacraz et al., 2008).

#### Acciones biológicas y producción

La estructura de la proteína y del gen de IL-21 tiene gran semejanza a IL-2 y a IL-15. Como estas citocinas, IL-21 recluta las cadenas  $\gamma$ c como componente del complejo de su receptor. Las actividades primarias de IL-21 son inmunomoduladoras. La IL-21 comparte características de una citocina Th1. IL-21 es estimuladora potente de la producción de IFN- $\gamma$  y de la actividad citolítica para las células NK y las células T CD8+. Colectivamente, los efectos moduladores de IL-21 proporcionan un acoplamiento entre la inmunidad natural y adaptativa (Strengell et al., 2002). La IL-21 es producida por las células T CD4+ activadas, por las células B y NK (Suto et al., 2008).

#### Características de la proteína y del receptor

La secuencia del cDNA humano de IL-21 contiene un marco de lectura abierto que codifica un precursor polipéptido de 162 aminoácidos y consiste en un dominio de cuatro hélices alfa con homología significativa a IL-2, IL-4 y a IL-15 (Parrish-Novak et al., 2000). Las semejanzas estructurales entre IL-21 e IL-2,

IL-4, e IL-15 y entre el IL-21R y la cadena  $\beta$  del IL-2R y la cadena  $\alpha$  de IL-4R (Hironobu et al., 2001).

#### Características del gen y factores de transcripción

El gen humano de IL-21 se encuentra en el cromosoma 4 (q26-q27) aproximadamente a 180 kb del gen de IL-2. Aunque el gen de IL-2 tiene solamente cuatro exones, su estructura es totalmente similar a la de IL-21. Los primeros tres intrones en ambos genes están en posiciones idénticas. La única diferencia estructural entre ambos genes es la presencia de un cuarto intrón en IL-21 (Parrish-Novak et al., 2000). Se ha demostrado que Tax1 induce directamente la expresión de IL-21 y de IL-21R en células T. La inducción de la expresión de IL-21 y de IL-21R es mediada por la activación de factores de transcripción en respuesta a Tax1; en el caso del gen de IL-21, se encuentran implicados en la activación: NF- $\kappa$ B y AP-1 mientras que IRF-1 y AP-1 participan en la activación del gen de IL-21R (Mariko et al., 2009).

Recientemente se ha detectado un nueva sub-población de linfocitos T denominada Th17 la cual produce IL-21 importante en la protección contra ciertos patógenos extracelulares. No obstante, células Th17 con especificidad a antígenos propios son altamente patogénicas y permiten el desarrollo de inflamación y autoinmunidad severa (Bettelli et al., 2007).

#### **1.5.4 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL**

##### Características generales

El factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés) es una citocina pro-inflamatoria, de la que se han identificado dos formas moleculares, denominadas TNF- $\alpha$  o Caquexina y TNF- $\beta$  o Linfotoxina. Entre las similitudes que comparten los miembros de esta superfamilia están el ser proteínas monotriméricas, estar principalmente expresadas en la membrana celular y participar en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis, aunque varios miembros, tal como el TNF- $\alpha$ , tienen una importante actividad pro-inflamatoria (Anaya, 2003). El TNF- $\alpha$  tiene

una potente actividad citotóxica, capaz de eliminar células tumorales y de actuar como un mediador letal en la respuesta inmunológica aguda o crónica de enfermedades inflamatorias crónicas e infecciosas (Anaya, 2003; Locksley et al., 2001).

#### Acciones biológicas y producción

El TNF- $\alpha$  estimula en las células endoteliales y macrófagos la secreción de citocinas denominadas quimiocinas que inducen la quimiotaxis y el reclutamiento de leucocitos. También actúa sobre los fagocitos mononucleares para estimular la secreción de IL-1, que actúa de forma similar al TNF- $\alpha$ . (Opal y DePalo, 2000). Además de su papel en la inflamación, el TNF- $\alpha$  induce la apoptosis de algunos tipos celulares. Las acciones del TNF- $\alpha$  sobre el endotelio y sobre los leucocitos son críticas para las respuestas inflamatorias locales frente a los microorganismos. Si hay cantidades insuficientes de TNF- $\alpha$  una consecuencia puede ser el fracaso en la contención de las infecciones. El TNF también contribuye a reacciones inflamatorias locales que son dañinas para el huésped, por ejemplo, en las enfermedades autoinmunes (Anaya, 2003). Si el estímulo para la producción del TNF es suficientemente intenso, se producen cantidades tan grandes de la citocina que ésta entra en el torrente sanguíneo y actúa a distancia, como una hormona endocrina que produce alteraciones patológicas del choque séptico (Figura 3) (Tracey y Cerami, 1994)

El estímulo más potente para inducir la producción de TNF- $\alpha$  por los macrófagos son los LPS (lipopolisacáridos), y pueden producirse grandes cantidades en las infecciones por bacterias gramnegativas, las cuales los liberan. La principal función fisiológica del TNF es la estimulación del reclutamiento de neutrófilos y monocitos en los focos de infección y la activación de estas células para erradicar al microorganismo patógeno. El TNF media estos efectos por medio de diversas acciones sobre las células del endotelio vascular y los leucocitos (García y Kaski, 2000).

El TNF actúa sobre el hipotálamo induciendo fiebre y, por tanto, se denomina pirógeno endógeno (es decir, derivado del huésped) (Meiorin et al., 2006). La producción de fiebre como respuesta al TNF- $\alpha$  (y a la IL-1) está mediada por el aumento de la síntesis de prostaglandinas por las células del hipotálamo estimuladas por las citocinas. El TNF- $\alpha$  actúa sobre los hepatocitos aumentando la síntesis de ciertas proteínas séricas, como la proteína A amiloide sérica y el fibrinógeno (Sanchez-Ramírez y Talamás-Rohana, 2002). La combinación de las proteínas plasmáticas derivadas de los hepatocitos inducidas por el TNF- $\alpha$ , por la IL-1 y la IL-6, otras dos citocinas de la inmunidad innata, constituyen la respuesta de fase aguda a estímulos inflamatorios. La producción prolongada de TNF da lugar a las alteraciones metabólicas de la caquexia, estado caracterizado por la pérdida de células musculares y adiposas, la caquexia es debida en gran parte a la supresión del apetito que induce el TNF (Tisdale, 2001; Wajant et al., 1999). El TNF también inhibe la síntesis de la lipoproteína lipasa, enzima necesaria para liberar los ácidos grasos de las lipoproteínas circulantes de manera que puedan ser utilizados por los tejidos (Ware, 2003).

También produce la apoptosis o muerte celular programada. En este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis es por tanto considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades. Las rutas apoptóticas, por tanto, intervienen en algunos procesos fisiológicos, a saber: a) Las etapas de desarrollo donde se producen células en exceso. b) En el refinamiento de la inervación al retirar aquellas neuronas menos capacitadas, a modo de selección celular darwiniana en el sistema nervioso. c) En la apertura de los orificios en el tubo digestivo. d) En la formación de órganos como los riñones. e) En la remodelación de los huesos y cartílagos y la selección de linfocitos. Al mediar en la eliminación de aquellos que reconocen antígenos propios y en la eliminación de células infectadas o tumorales por histólisis y también, en los mecanismos de defensa frente a tumores en que

intervienen células que incluyen los linfocitos T citolíticos, las natural killer y los macrófagos (Reed J, 2002).

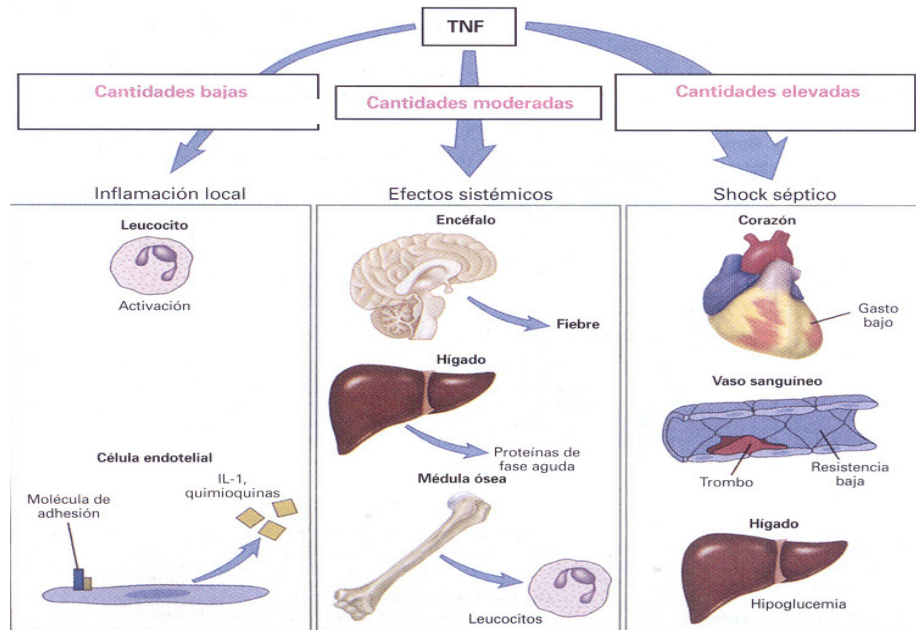


Figura 3. Acciones biológicas del factor de necrosis tumoral. En concentraciones bajas, el TNF actúa sobre los leucocitos y el endotelio induciendo inflamación aguda. En concentraciones moderadas, el TNF media los efectos sistémicos de la inflamación. En concentraciones elevadas, el TNF causa alteraciones patológicas del shock séptico (Tomado de Abbas et al., 2002)

### Características de la proteína y del receptor

El TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$  interactúan con los mismos receptores, desplegando una amplia variedad de respuestas inmunológicas y han sido asociadas como mediadores patogénicos de enfermedades en humanos (Wajant et al, 2003), es una proteína no glucosilada que está formada por 17 aminoácidos, tiene un solo puente disulfuro, el cual es necesario para mantener la estructura de la molécula (Aggarwal et al., 1985). Existen dos receptores distintos para el TNF, cuyos tamaños moleculares son de 55 kD (denominado receptor de TNF tipo I [TNF-RI], o receptor p55) y 75 kD (denominado receptor de TNF tipo II [TNF-RII], o receptor p75), respectivamente. Ambos receptores de TNF están presentes en casi todos los tipos celulares. La mayoría de los efectos biológicos del TNF están mediados por el TNF-RI. Los receptores de TNF pertenecen a una gran familia de proteínas,

muchas de las cuales intervienen en las respuestas inmunitarias e inflamatorias (Watts, 2005; Solorzano et al., 1998). La unión de citocinas a algunos miembros de la familia de receptores del TNF, como TNF-RII, da lugar a la unión de proteínas, denominadas factores asociados a los receptores del TNF (TRAF, del inglés TNF receptor-associated factors), a los dominios citoplásmicos de los receptores y, en último término, a la activación de factores de transcripción, principalmente del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, del inglés nuclear factor  $\kappa$ B) y la proteína de activación I (AP-1, del inglés activation protein-1) (Bouwmeester et al., 2004). Los receptores que participan en los procesos de muerte celular se clasifican en dos grupos: aquellos cuya activación siempre conduce a la muerte de la célula, conocidos como receptores Fas y el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) y aquellos que desempeñan una función fisiológica, pero su sobre activación puede conducir también a la muerte (receptores de glutamato, de trombina y canales iónicos dependientes de voltaje). Los receptores de muerte se caracterizan por presentar un dominio extracelular, rico en cisteína y un segundo dominio de localización citoplasmática conocido como el “dominio de la muerte” que es el responsable de la activación de la maquinaria apoptótica.

#### Características del gen y factores de transcripción

El gen del TNF- $\alpha$  se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 6, formando parte del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En el humano se localiza aproximadamente a 250 kilobases del locus HLA-B (MHCI). La cercanía de estos dos loci puede ser útil en la regulación coordinada de los productos de los genes del sistema inmunológico. Cuatro exones codifican para el producto precursor de 230 aminoácidos y uno maduro de 157, después de que una inusual y prolongada cadena líder es removida, tan sólo el último exón codifica para el 80% de la proteína secretada (Bouwmeester et al 2004; Thomson, 1994).

La mayor cantidad de proteína del TNF- $\alpha$  es elaborada en células del sistema inmunológico, aunque su RNAm es expresado en otros tipos de células, como fibroblastos, astrocitos y osteoblastos. La regulación postranscripcional es un

sistema de control muy importante en el sistema inmunológico y común a muchas citocinas. Este sistema de control consta de una secuencia rica en adenosina. La rápida fragmentación del RNAm busca limitar la producción del TNF- $\alpha$ , para que éste se genere únicamente cuando el sistema inmunológico lo necesite. Este proceso se da por la detección de señales celulares en la región AURE (elemento rico en adeninas y uracilos) del RNAm (Anaya, 2003). Otros AURE-BP son el AUF1 y el tristetrapirolin (TTP), proteína con dedos de zinc, encargada de desestabilizar estos transcritos y promover la degradación del RNAm para el TNF- $\alpha$ . De otro lado están los TIA-1 y el TIAR, ambos homólogos estructural y funcionalmente, pertenecientes a la familia de las proteínas con motivos de reconocimiento del RNA (RRM), que están encargados de unirse a regiones ricas en uridina y se comportan como silenciadores transduccionales que regulan selectivamente la expresión del TNF- $\alpha$ . El TIA-1 parece estar involucrado en la inhibición del ensamblaje del RNAm del TNF- $\alpha$  y promover su desintegración a nivel lisosomal. Tanto el TIA-1 como el TIAR pueden actuar como reguladores de la expresión de diferentes proteínas reguladoras de la liberación del RNAm-TNF- $\alpha$  (Anaya, 2003).

Análisis en ratones *knockout* para el receptor TNF II (TNF-RII), revelaron resistencia a la necrosis tisular a dosis que en ratones de tipo silvestre se inducía la necrosis, sin embargo, al incrementar significativamente la concentración plasmática de la proteína, tal efecto de resistencia se ve anulado (Szlosarek et al., 2006). Es posible que en ausencia de TNF-RII, las bajas concentraciones de TNF sean incapaces de unirse a TNF-RI, protegiendo de los efectos tóxicos de las dosis elevadas de la citocina a los ratones *knoc-kout* (Locksley et al., 2001; Pfeffer, 2003). En los últimos 10 años se han evidenciado asociaciones entre el TNF y un sin número de patologías de fondo infeccioso tales como la malaria cerebral, choque séptico y lepra; por otro lado, también se ha asociado a patologías de origen autoinmune como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso (Choy y Panayi, 2001). Los avances en tecnología de ADN recombinante han permitido el desarrollo de agentes inhibidores del TNF no sólo en modelos de artritis animal, sino en pacientes con artritis reumatoide activa. La



sobre expresión de TNF precipita la poliartritis inflamatoria crónica, la cual puede ser impedida completamente por el tratamiento de los animales con anticuerpos monoclonales anti TNF. Los ratones transgénicos que sobre expresan constitutivamente TNF en células T, bajo el control de señales regulatorias del gen humano cA2, desarrollan marcados cambios histológicos y celulares en sus órganos linfoides y un síndrome de decaimiento letal, asociado con una trombosis vascular diseminada y necrosis de los tejidos. Estos cambios pueden ser neutralizados por la administración de anticuerpos monoclonales específicos contra el TNF humano (Feldmann y Maini, 2001).

### **1.5.5 INTERFERON- $\gamma$**

#### Características generales

El interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) es una citocina producida por los linfocitos T activados, los macrófagos y las células asesinas naturales (NK). Forma parte de las llamadas citocinas Th1 que participan en la respuesta inmunológica mediada por células, e inhibe la proliferación de células Th2, disminuyendo, por consiguiente, la inmunidad humoral (Khabar y Young 2007).

#### Acciones biológicas y producción

El IFN- $\gamma$  activa a los macrófagos para que destruyan a los microorganismos fagocitados. Por otro lado esta citocina estimula la expresión de moléculas de clase I y II del MHC y de co-estimuladores en las APC, también activa a los neutrófilos y estimula la actividad citolítica de las células NK. IFN- $\gamma$  induce la diferenciación de las células T CD4+ vírgenes a la sub-población Th1 e inhibe la proliferación de la sub-población Th2 (Smeltz et al., 2002). Actúa activando monocitos y macrófagos aumentando los mecanismos necesarios para la lisis intracelular de los microorganismos fagocitados; les incrementa además su actividad tumoricida y los induce a liberar al exterior una mayor cantidad de TNF $\alpha$ . Los macrófagos activados por IFN- $\gamma$  también aumentan la expresión de receptores para la porción (Fc) de las IgG. De esta forma el IFN- $\gamma$  puede modular la respuesta del sistema inmunológico. El aumento en la actividad metabólica de

los macrófagos que han sido estimulados por el IFN- $\gamma$  ha permitido proponer su utilidad para el tratamiento de enfermedades en las cuales los parásitos se localizan dentro de los fagocitos mononucleares. La otra función inmunológica importante del IFN- $\gamma$  es inhibir la proliferación de linfocitos B y la síntesis de anticuerpos (Figura 4) (Wu et al., 2005; Harris et al., 2005).

#### Características de la proteína y del receptor

El IFN- $\gamma$  es una proteína homodimérica producida por las células NK, las células CD4<sup>+</sup> Th1 y las células T CD8<sup>+</sup>. Esta citocina es producida casi exclusivamente por los linfocitos T colaboradores (Th1) y por las células NK después que ellas han sido estimuladas. Las células NK secretan IFN- $\gamma$  en respuesta al reconocimiento de componentes desconocidos de microorganismos o en respuesta a la IL-12, las células T producen IFN- $\gamma$  en respuesta al reconocimiento del antígeno, fenómeno potenciado por la IL-12. Las funciones del IFN- $\gamma$  son importantes en la inmunidad celular frente a microorganismos intracelulares (Nathan et al., 1983).

El receptor de IFN- $\gamma$  se compone de dos polipéptidos estructuralmente homólogos que pertenecen a la familia de receptores de citocinas tipo II; uno se une a la citocina y el otro participa en la señalización. La unión de la citocina activa a la molécula STAT1, que a su vez estimula la transcripción de genes, tales como los genes que codifican las moléculas del MHC, enzimas que sintetizan sustancias microbicidas como el óxido nítrico, y citocinas como la subunidad p40 de la IL-12. STAT1 es un regulador “maestro” de las acciones del IFN- $\gamma$  (Darnell, 1994; Ramana et al., 2002).

#### Características del gen y factores de transcripción

El gen IFN- $\gamma$ , se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 12 contienen 3 intrones y cuatro exones que codifican para un polipéptido de 166 aminoácidos (Thomson, 1994). Las funciones en las respuestas inducidas por IFN- $\gamma$  sugieren la activación de varios caminos de señalización activados por IFN- $\gamma$ . El interferón al unirse a su receptor inicia una cascada de señalización en la que participan con

un papel fundamental las tirosina-quinasas de la familia JAK (Janus kinases) y los factores de transcripción de la familia STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription). Tales redes de señalización reguladoras se pueden controlar por distintos factores de transcripción y sus combinaciones. Después de que una señal ha sido transmitida de la superficie celular al núcleo, los factores de transcripción responden uniéndose a regiones específicas del ADN presentes en los promotores de los genes, para incrementar su expresión, la cual se manifiesta a nivel de la síntesis del RNA (transcripción), entre los cuales está el factor de transcripción AP-1 (activator protein 1) (Li et al., 2007, Khabar y Young 2007).

*In vitro*, el IFN- $\gamma$  puede estimular la producción de anticuerpos IgG2 en poblaciones purificadas de linfocitos B que han sido estimuladas con LPS. La administración de IFN- $\gamma$  a pacientes con cáncer les incrementa la actividad de los linfocitos T citotóxicos y NK. Al mismo tiempo, facilita la expresión de receptores para IL-2 sobre la membrana de esas mismas células. Esta última actividad contribuye a la proliferación de los linfocitos NK (Smyth et al., 2002). Los ratones que no expresan STAT1 son completamente resistentes a las acciones del IFN- $\gamma$ . En ratones, el IFN- $\gamma$  también potencia la expresión de la cadena de señalización del receptor de la IL-12. El IFN- $\gamma$  actúa sobre las células B favoreciendo el cambio a ciertas subclases de IgG, principalmente IgG2a en ratones, e inhibiendo el cambio a isotipos dependientes de la IL-4, como IgG e IgE. Las subclases de IgG inducidas por el IFN- $\gamma$  se unen a los receptores Fc  $\gamma$  y de los fagocitos y activan el complemento; ambos mecanismos inducen la fagocitosis de los microorganismos opsonizados (Horner et al, 2001). Ratones knock-out para el gen del receptor para Interferón gamma (IFN- $\gamma$  R), son capaces de producir cantidades normales de IFN- $\gamma$ , pero sus células no son capaces de responder a esta citocina. Estos ratones, al igual que el knock-out de IFN- $\gamma$ , mostraron un incremento en la susceptibilidad a infecciones a pesar de la respuesta normal citotóxica y de células T-cooperadoras. Además, el IFN- $\gamma$  es necesario para producir una respuesta de anticuerpos de isotipo IgG2a. Ratones deficientes en el IFN- $\gamma$  R, tienen un dramático incremento de los niveles de IFN- $\gamma$  sérico, debido a que el IFN- $\gamma$  no es eliminado de la circulación. Estos altos niveles de IFN- $\gamma$  no son

tóxicos en ausencia de un receptor funcional (Sato et al., 2001). Los ratones con eliminación específica del gen del IFN- $\gamma$ , han sido desarrollados por recombinación homóloga en células embrionarias, estos animales se desarrollan normalmente y son saludables en ausencia de patógenos. Sin embargo, se caracterizan por una producción anormal de productos antimicrobianos y una expresión reducida de antígenos del complejo principal de histocompatibilidad de clase II en los macrófagos (Pollard et al., 2005).

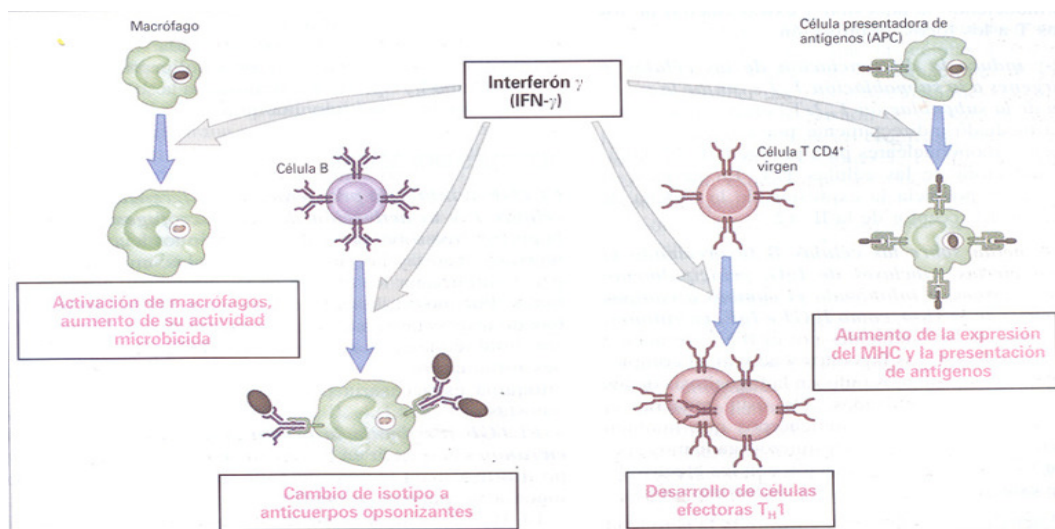


Figura 4. Acciones biológicas del IFN- $\gamma$ . El IFN activa los fagocitos y las APC, e induce en las células B el cambio a algunos isotipos e Ig. (Tomado de Abbas et al., 2002)

### 1.5.6 INTERLEUCINA-10

#### Características generales

La interleucina 10 (IL-10) es uno de los principales inhibidores de la síntesis de citocinas proinflamatorias y además, disminuye la función de los macrófagos. La IL-10 es producida por los linfocitos T, linfocitos B y macrófagos activados por antígenos o productos bacterianos. La producción de IL-10 se inhibe mediante IFN- $\gamma$ , la IL-10 actúa a través de su receptor de la superficie celular, que está

relacionado estructuralmente con la familia del IFN- $\gamma$ , lo que es interesante dada la relación antagónica entre IL-10 e IFN- $\gamma$  (Levings et al., 2001).

#### Acciones biológicas y producción

No obstante, que presentan diversas actividades inmunosupresoras, la IL-10 es un buen estimulante de la proliferación de los linfocitos T inmaduros, actúa sobre los timocitos y estimula la expresión de los marcadores CD3. Además, es un cofactor durante la estimulación de los linfocitos T citotóxicos. La IL-10, lo mismo que el IFN- $\gamma$  facilitan los mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que puede llevar a cabo el macrófago, probablemente porque estimula la expresión del receptor Fc $\gamma$ RI sobre la membrana de los fagocitos mononucleares (de Waal Malefyt et al., 1991).

La IL-10 puede inhibir la producción de IL-2, TNF e IFN- $\gamma$  por los linfocitos Th1 y, a la inversa, el IFN- $\gamma$  puede suprimir la producción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 por los linfocitos Th2. Asimismo, IL-10 disminuye la expresión de los antígenos de Histocompatibilidad Clase II sobre la membrana de monocitos, macrófagos y otras células que actúan como APC (Filippi y Von Herrath, 2008). La IL-10 también deprime la síntesis de las principales citocinas inflamatorias que producen los macrófagos, como TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6, IL-8, GM-CSF y G-CSF. Por las razones anteriores, la IL-10 ha sido estudiada como un inhibidor o modulador natural de las reacciones de hipersensibilidad tardía (DTH). Como la IL-10 también es producida por los macrófagos activados, en esos casos la interleucina puede actuar en una forma autocrina inhibiendo o controlando la producción de nuevas moléculas de IL-10 (Moore et al., 2001).

La IL-10 es producida principalmente por macrófagos activados, debido a que inhibe las funciones de los macrófagos, es un excelente ejemplo de un regulador de retroalimentación negativa (Moore et al., 2001). Los efectos biológicos de la IL-10 derivan de su capacidad de inhibir muchas de las funciones de los macrófagos activados. Los macrófagos responden a los microorganismos secretando citocinas y expresando coestimuladores que potencian la activación de las células T y la

inmunidad celular. La IL-10 actúa sobre los macrófagos activados para terminar estas respuestas y restablecer el estado de reposo del organismo una vez erradicada la infección microbiana (Trinchieri, 2007).

#### Características de la proteína y del receptor

La IL-10 homodímero de 35-40 kD, con un dominio globular de cuatro hélices- $\alpha$  que se une a un receptor de citocinas tipo II (Moore et al., 2001).

#### Características del gen y factores de transcripción

El gen que codifica la IL-10 se encuentra en el cromosoma 1 (1q31–1q32) que presenta cinco exones (Kim et al., 1992; Eskdale et al., 1997) habiéndose descrito diversos polimorfismos en la región promotora: -1082 guanina/adenina (G/A), -819 citocina/timina (C/T) y -592 citocina/adenina (C/A) (Garnacho et al., 2005). La transcripción de IL-10 se puede regular por los factores Sp1 y Sp3, que son expresados por diversos tipos celulares (Moore et al., 2001).

Varios trabajos han revelado que la IL-10 inhibe las principales actividades de las células fagocíticas que han sido estimuladas *in vitro* con las endotoxinas o LPS de las bacterias gram negativas. En los ratones knockout, las células fagocíticas se escapan de su control habitual e infiltran masivamente el intestino, que está en contacto con las endotoxinas de las enterobacterias comensales. Histológicamente, esta enfermedad de los ratones simula algunas enfermedades inflamatorias del tubo digestivo de los humanos. Los ratones que no producen IL-10 tampoco pueden controlar la producción de citocinas por los macrófagos estimulados con endotoxinas. Por esa razón, tienen niveles elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8 en el suero. Al contrario de IL-10, el IFN- $\gamma$  es un potente estimulante de la actividad de los macrófagos que han sido estimulados por las endotoxinas. Entre esas dos citocinas (IL-10 e IFN- $\gamma$ ) modulan las principales actividades de los fagocitos (Zhong et al., 2006). La administración de anticuerpos monoclonales anti-IL-10 provoca un aumento en la concentración en el suero de las principales citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) (Dumoutier et al., 2000). Los macrófagos activados *in vitro*, que son expuestos a la IL-10, disminuyen su

producción de óxido nítrico y de radicales libres, de modo que baja su capacidad para destruir los microorganismos que han fagocitado. En cambio IL-10 estimula la expresión de antígenos de histocompatibilidad Clase II sobre la membrana de los linfocitos B, aumentando su tasa de multiplicación y producción de anticuerpos. La IL-10 también estimula a los megacariocitos, las células cebadas y los timocitos (Kotenko, 2002).

## 2. JUSTIFICACION

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 observadas 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. El niño con desnutrición calórico-proteica (DCP) es más susceptible a las infecciones, ya que presenta alteraciones en diferentes mecanismos de defensa inmunológica. Uno de los mecanismos posiblemente afectados es el balance entre las respuestas Tipo 1/ Tipo 2, la primera se asocia con la respuesta celular y la segunda está relacionada con la respuesta humoral.

Hasta el momento existen pocos estudios que muestren 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., 2008).

Debido a lo anterior es importante estudiar la expresión de los genes que codifican citocinas de la inmunidad innata y específica como la IL-12, IL-18, IL-21 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e IL-10, 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 moleculares relacionados con las alteraciones inmunológicas observadas en niños con DCP.



### **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar los niveles de expresión relativa del RNAm de los genes que codifican para citocinas de respuesta T1 (IL-12, IL-18, IL-21, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ,) y de respuesta T2 (IL-10) en niños con infecciones y desnutrición de primero, segundo, tercer grado y niños bien nutridos infectados.

#### **3.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

A) Determinar las diferencias de expresión relativa de los RNAm de los genes de IL-12, IL-18, IL-21, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e IL-10, en niños bien nutridos infectados y en niños desnutridos y con infecciones de vías respiratorias o gastrointestinales.

B) Establecer si el grado de desnutrición tiene influencia sobre la expresión de los genes de IL-12, IL-18, IL-21, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e IL-10.

C) Establecer si el tipo de infección (gastrointestinal o respiratoria) que presentan los niños bien nutridos infectados y desnutridos, cambia el nivel de expresión de los genes de IL-12, IL-18, IL-21, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e IL-10.

### **4. HIPOTESIS**

Si los niños desnutridos presentan alteraciones en su capacidad de respuesta inmunológica, se esperan encontrar cambios en la expresión relativa de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18, IL-21 e IL-10 entre niños bien nutridos infectados y niños infectados con desnutrición calórico-proteica de primero, segundo y tercer grado.

## **5. MATERIALES Y METODOS**

### **5.1 CARACTERISTICAS DE LA POBLACION DE ESTUDIO**

Se eligieron niños con edades entre 6 meses a 5 años que acudieron a los Hospitales Pediátricos de Iztapalapa y Xochimilco pertenecientes al Gobierno del Distrito Federal.

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 y fue proporcionado por el médico que los atendió. 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:

***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 ameritó su hospitalización.
- Sin tomar medicamento al momento de la toma de la muestra.

**Niños Desnutridos Infectados (DN):**

Niños entre los 6 meses y 5 años de edad

**DN1:** Niños con un déficit de entre 10 y 24% del peso corporal correspondiente para su edad cronológica.

**DN2:** Niños con déficit de peso corporal que fluctuó del 25 al 39% del promedio correspondiente para su edad cronológica.

**DN3 (tipo marasmo):** Niños con déficit de peso mayor de 40 % del promedio correspondiente para la edad cronológica del paciente.

Todos los niños desnutridos presentaron desnutrición de tipo primaria e infección de tipo bacteriano (respiratoria o gastrointestinal) que ameritó su hospitalización.

***Criterios de exclusión***

**Niños bien nutridos con infección (BNI):**

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

## **5.2 AISLAMIENTO DE CELULAS MONONUCLEARES**

Se obtuvieron muestras sanguíneas de aproximadamente 1.5 ml con jeringas previamente heparinizadas a partir de las cuales 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, México) en proporción 1:1. Esta suspensión celular se colocó cuidadosamente en un tubo de centrifuga que contenía 1 ml de Linfograd (Microlab, México). Los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 min. Se colectaron los linfocitos separados con el Linfograd, se colocaron en otro tubo para centrifugar y se lavaron dos veces más con PBS.

## **5.3 OBTENCION DE RNA**

A partir de los linfocitos, se efectuó el aislamiento de RNA con el RNeasy Mini Kit (Qiagen, MD, USA). Al botón celular obtenido se le 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 en un vortex a velocidad máxima durante 1 min. A esta mezcla se le 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 seg. A la columna se le agregaron 700 µL del amortiguador RW1 para eliminar contaminantes, se centrifugó nuevamente por 15 seg a 10 000 rpm. La columna se lavó nuevamente con 500 µL del amortiguador RPE, centrifugando 3 min 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. 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  $\mu$ L del RNA aislado para realizar la síntesis de la primera cadena de cDNA por transcripción reversa. A la alícuota de RNA se le agregó 1  $\mu$ L de Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (Promega), 1  $\mu$ l de dinucleótidos trifosfatos (dNTP's, Promega) y 1  $\mu$ l agua grado biología molecular (miliQ). El contenido del tubo se homogenizó suavemente y se incubó a 65°C por 5 min. Posteriormente se le agregó 1  $\mu$ L de transcriptasa reversa Superscript III (Life Technologies, Rockville, MD, USA), 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 evaluación de la expresión de los genes de IL-12, IL-18, IL-21, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 se realizó por PCR en tiempo real utilizando la tecnología de LightCycler (Roche Applied Science). El cDNA se amplificó utilizando pares de oligonucleótidos iniciadores específicos para cada una de las citocinas (Cuadro 2).

Las sondas utilizadas para realizar la cuantificación relativa fueron tomadas de la Universal ProbeLibrary (Roche Diagnostics GmbH). Estas estuvieron marcadas con el fluorocromo FAM y fueron las siguientes: para  $\beta$ -Actina la sonda # 11, para IL-12 la # 50, IL-18 sonda # 46, IL-21 la sonda # 7, para IFN- $\gamma$  la sonda #21, TNF- $\alpha$  la sonda # 29 y para IL-10 la sonda # 67.

Para la evaluación de la expresión de genes por PCR en tiempo real fue necesario utilizar un gen calibrador ( $\beta$ - 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 µL de agua, 0.2 µL de cada uno de los oligonucleotidos correspondientes (10 µM), 0.1 µL de sonda TaqMan, 0.1 µL de enzima LightCycler Uracil-DNA Glicosilasa, 2 µL de la solución maestra LightCycler Taqman Master (Roche Diagnostics GmbH) y 2 µL de cDNA (200ng).

Cuadro 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de cada una de las citocinas y el gen constitutivo.

Nombre del gen	Secuencia del oligonucleótido 5'-3'	Temp alineación (°C)
IL-12-R	CACTCCCAAAACCTGCTGAG	60
IL-12 -F	TCTCTTCAGAAGTGCAAGGGTA	
IL-18-R	CAACAACTATTTGTCGCAGGA	60
IL-18-F	TGCCACAAAGTTGATGCAAT	
IL-21-R	AGGAAACCACCTTCCACAAA	60
IL-21-F	GAATCACATGAAGGGCATGTT	
IFN-γ -F	GGCATTTTGAAGAATTGGAAAG	60
IFN-γ -R	TTTGGATGCTCTGGTCATCTT	
TNF-α-R	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA	60
TNF-α-F	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT	
IL-10-R	GCAACCCAGGTAACCCTTAAA	60
IL-10-F	GATGCCTTCAGCAGAGTGAA	
β-Actina-R	TCTACAACGAGCTGCGAAT	60
β-Actina-F	CAATTCCTCTCGGCCTCG	

Posteriormente se procedió a cuantificar la expresión de los genes que codifican para IL-12, IL-18, IL-21, IFN-γ, TNF-α e IL-10.

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.

Posteriormente 30 ciclos en las siguientes condiciones:

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, que es una prueba no paramétrica 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 sirve para realizar comparaciones cuando el número de datos es pequeño.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA POBLACION ESTUDIADA**

En el grupo de niños BNI se incluyeron 16 niños de los cuales 5 eran de sexo femenino y 11 de sexo masculino. El intervalo de edad fue de 7 a 60 meses. Todos presentaron el peso y la talla esperada para su edad cronológica, así como una 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, 11 de los niños presentaron infección de tipo respiratoria el resto presentaron infección de tipo gastrointestinal (Cuadro 3).

Se obtuvieron 21 muestras de niños DN, de los cuales 9 correspondieron a niños DN1, 4 a niños DN2 y 8 muestras a niños con DN3.

En el grupo de niños con DCP de primer grado (DN1) se incluyeron 9 niños, de los cuales 4 era del sexo femenino y 5 del sexo masculino. El intervalo de edad fue de 7 a 48 meses, 7 de los niños presentaron infección de tipo respiratoria y los otros 2 de tipo gastrointestinal (Cuadro 4).

Cuadro 3. Características de los niños bien nutridos infectados (BNI)

NINO	EDAD (meses)	SEXO	*PESO (Kg)	**TALLA (cm)	TIPO DE INFECCION
1	7	Masculino	7.7	63	Gastrointestinal
2	8	Masculino	8.0	64	Respiratoria
3	8	Masculino	7.9	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	13.8	91	Respiratoria
13	32	Masculino	15.8	95	Respiratoria
14	36	Femenino	15.0	99	Respiratoria
15	48	Masculino	15.6	105	Respiratoria
16	60	Femenino	17.0	107	Respiratoria

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



Cuadro 4. Características de los niños desnutridos de primer grado (DN1)

Niño	Edad (meses)	Sexo	*Peso (Kg)	**Talla (cm)	Deficit de peso %	Tipo de Infección
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	12	Femenino	7.7	73	19	Respiratoria
5	16	Masculino	8.6	68	19	Respiratoria
6	18	Masculino	9.6	86	15	Gastrointestinal
7	27	Femenino	10.6	90	12	Respiratoria
8	36	Femenino	12.3	99	16	Respiratoria
9	48	Femenino	14.0	100	13	Respiratoria

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

Los niños con DCP de segundo grado (DN2) incluyeron 4 niños de los cuales 2 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 5).

Cuadro 5. Características de los niños desnutridos de segundo grado (DN2)

Niño	Edad (meses)	Sexo	*Peso (Kg)	**Talla (cm)	Deficit de peso %	Tipo de Infección
1	8	Masculino	5.7	68	28.7	Respiratoria
2	10	Masculino	6.5	66	27.7	Respiratoria
3	24	Femenino	9	79	26	Respiratoria
4	43	Femenino	12.5	90	25	Respiratoria

\*Peso al momento de la toma de la muestra, \*\*Talla al momento de la toma 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 %), que presentaban 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 utilizando las tablas de Ramos Galván (1976) para niños mexicanos (Cuadro 6).

Cuadro 6. 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 toma de la muestra

## **7. AMPLIFICACION PARA DETERMINAR LA EFICIENCIA Y LA SENSIBILIDAD DEL METODO DE PCR EN TIEMPO REAL**

### **7.1 CURVAS DE RANGO DINÁMICO**

El rango dinámico se utilizó para determinar la eficiencia de amplificación y la sensibilidad de la técnica. Para evaluarlo se utilizó una curva estándar, elaborada a partir de una muestra de cDNA de un niño bien nutrido infectado diluida serialmente en órdenes de 10 (1:10, 1:100, 1:1000), cada dilución se amplificó por triplicado para el gen constitutivo y los genes problema. De la curva obtenida se calculó la correlación lineal entre los valores de Cp (crossing point) y del logaritmo de la concentración para determinar la eficiencia de amplificación. El Cp es un número fraccional que indica cuántos ciclos le tomó 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:

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

Donde:

N= número de moléculas obtenidas en cada ciclo

N<sub>0</sub>= número inicial de moléculas

E= eficiencia de amplificación

Cp= número de ciclo de detección del umbral

Con la eficiencia de la amplificación se comprobó la efectividad de la sonda y de 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 5), mientras que para TNF-α, IFN-γ, IL-12, IL-18, IL-21 e IL-10 la eficiencia fue 1.90, 2, 1.84, 1.92, 1.86 y 1.93 respectivamente (Figura 6).

**β-ACTINA**

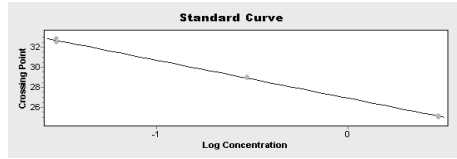
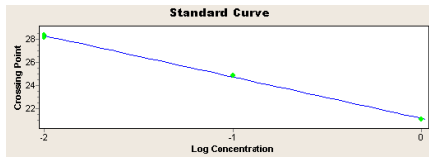
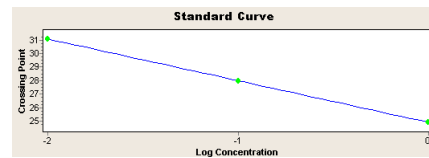


Figura 5. Correlación lineal de la reacción de PCR obtenida a partir de las curvas de amplificación con una eficiencia de 1.97.

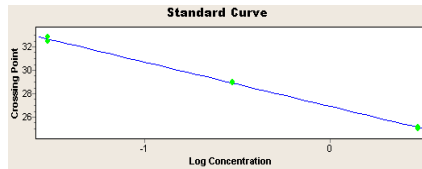
**IL-12**



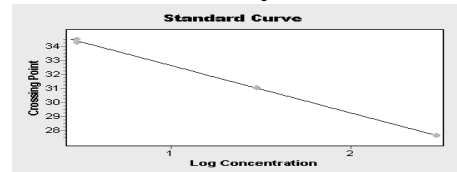
**IL-18**



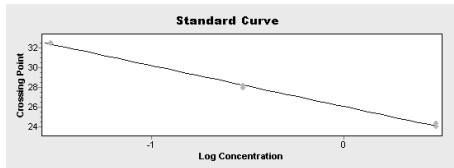
**IL-21**



**IFN-γ**



**TNF-α**



**IL-10**

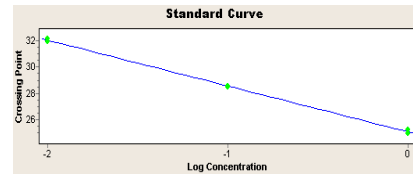


Figura 6. Correlación lineal de la reacción de PCR obtenida a partir de las curvas de amplificación con una eficiencia de 1.90, 2, 1.84, 1.92, 1.86 y 1.93 respectivamente.

## **7.2 EXPRESION RELATIVA DE LOS RNAm DE IL-12, IL-18, IL-21 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-10**

Se incluyó una referencia de amplificación, que se refiere a la amplificación de un gen de expresión constitutiva en la misma muestra de cDNA, en este caso se utilizó  $\beta$ -Actina como gen de referencia.

Se requiere evaluar la expresión del gen de interés y el de referencia en cada muestra problema y para un calibrador (muestra positiva que establece la 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 en cada muestra problema y en el calibrador, se realizó como primer paso.

Como segundo paso los resultados se normalizaron para asegurar que las variaciones observadas en la expresión fueran realmente debidas a cambios de expresión y no a una cantidad variable de muestra añadida entre dos ensayos. Para normalizar se tomó el valor de Cp obtenido del gen de interés (muestra problema), y se dividió entre el valor obtenido para la referencia (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.

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

Se compararon los niveles normalizados de expresión relativa de IL-12, IL-18, IL-21 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e IL-10 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 tipo de infección y edad similares, además de realizar las determinaciones por triplicado en cada caso.

**IL-12**

En cuanto a la expresión de IL-12 se observó que para los niños DN1 existe una disminución significativa en los niveles de expresión relativa del RNAm con respecto a los BNI (BNI Cp= 1.04, DN1 Cp=0.15, P< 0.004). Algo similar se observó cuando se compararon los grupos de niños con DN2 (BNI Cp = 0.99, DN2 Cp =0.32, P<0.05), y con los niños de DN3 contra los niños BNI (BNI Cp=1.05, DN3 Cp=0.31, P<0.0008) (Figura 7). Al comparar las diferencias de expresión relativa entre los grados de desnutrición se encontró que no hay diferencias significativas para IL-12 (DN1 vs DN2, P>0.68; DN1 vs DN3, P>0.76 y DN2 vs DN3, P>0.68).

Se realizaron comparaciones entre los pacientes DN y BNI con infección respiratoria (R) y con infección gastrointestinal (G), (DN R Cp=0.24 vs DN G Cp=0.31 P>0.71) y (BNI R Cp=1.025 vs BNI G Cp=1.06 P>0.496), no se encontraron diferencias significativas.

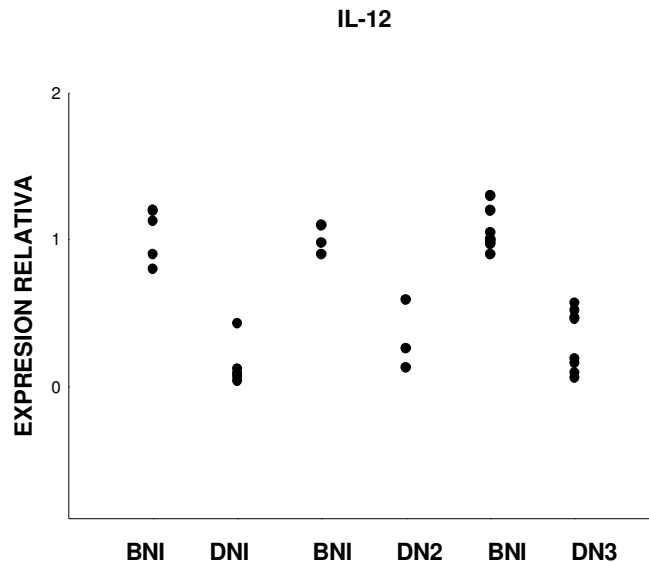


Figura 7. Niveles de expresión relativa del gen de IL-12 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3). Diferencias estadísticamente significativas BNI: DN1 P< 0.004, DN2 P<0.05, DN3 P<0.0008, DN1 vs DN2 P>0.68; DN1 vs DN3, P>0.76 y DN2 vs DN3, P>0.68. DN R vs DN G, P>0.71 y BNI R vs BNI G, P>0.496.

## IL-18

La comparación de los niveles de expresión relativa del gen de IL-18 entre el grupo de niños BNI y DN1, mostró que los niños DN1 presentaron niveles bajos de RNAm con respecto a los niños BNI (BNI  $C_p = 1.71$ , DN1  $C_p = 0.00989$ ,  $P < 0.001$ ), al igual que entre los DN2 y los BNI (BNI  $C_p = 1.1725$ , DN2  $C_p = 0.0000285$ ,  $P < 0.014$ ) y entre los niveles de expresión relativa de IL-18 obtenidos para los niños BNI y DN3 (BNI  $C_p = 0.72893$ , DN3  $C_p = 0.000305$ ,  $P < 0.001$ ) (Figura 8). Al comparar las diferencias de expresión relativa entre los grados de desnutrición se encontró que no hay diferencias significativas para IL-18 (DN1 vs DN2,  $P > 0.25$ ; DN1 vs DN3,  $P > 0.16$  y DN2 vs DN3,  $P > 0.2207$ ). Se realizaron comparaciones entre los pacientes DN y BNI con infección de tipo respiratoria (R) y con infección de tipo gastrointestinal (G) (DN R  $C_p = 0.30$  vs DN G  $C_p = 0.36$   $P > 0.571$ ) y (BNI R  $C_p = 0.44$  vs BNI G  $C_p = 1$   $P > 0.143$ ), donde tampoco se encontraron diferencias significativas.

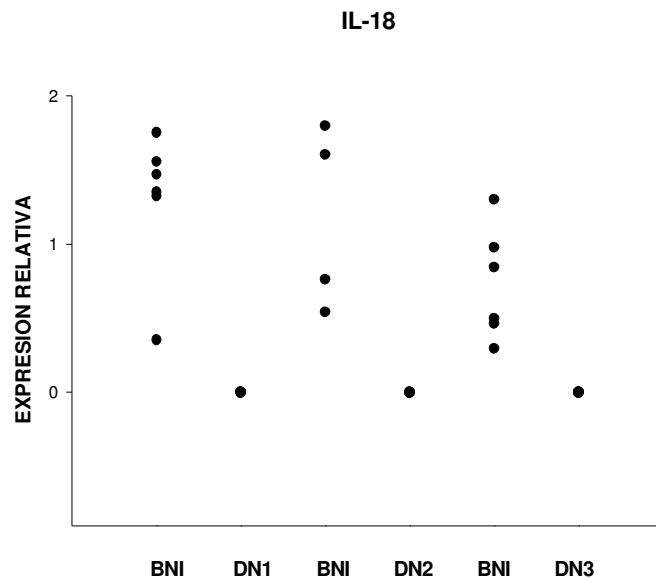


Figura 8. Niveles de expresión relativa del gen de IL-18 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), de segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3). Diferencias estadísticamente significativas BNI: DN1  $P < 0.00$ , DN2  $P < 0.014$ , DN3  $P < 0.00$ . DN1 vs DN2  $P > 0.25$ ; DN1 vs DN3  $P > 0.16$  y DN2 vs DN3  $P > 0.2207$ . DN R vs DN G  $P > 0.571$  y BNI R vs BNI G  $P > 0.143$ .

**IL-21**

Los resultados mostraron que para los niños DN1 existe una disminución significativa en los niveles de expresión relativa del gen de IL-21 con respecto a los BNI (BNI Cp= 1.2, DN1 Cp=0.015, P<0.004). Algo similar se observó cuando se compararon los grupos DN2 (BNI Cp = 0.995, DN2 Cp =0.0231, P<0.05), y DN3 contra los niños BNI (BNI Cp=1.411, DN3 Cp=0.098, P<0.008) (Figura 9). Al comparar las diferencias de expresión relativa entre los grados de desnutrición se encontró que no hay diferencias significativas para IL-21 (DN1 vs DN2, P>0.68; DN1 vs DN3, P>0.34 y DN2 vs DN3, P>0.2207).

También se realizaron comparaciones entre los pacientes DN y BNI, por tipo de infección respiratoria (R) y con infección gastrointestinal (G) (DN R Cp= 0.28 vs DN G Cp= 0.25 P>0.571) y (BNI R Cp=0.72 vs BNI G Cp=0.78 P>0.548), no se encontraron diferencias significativas.

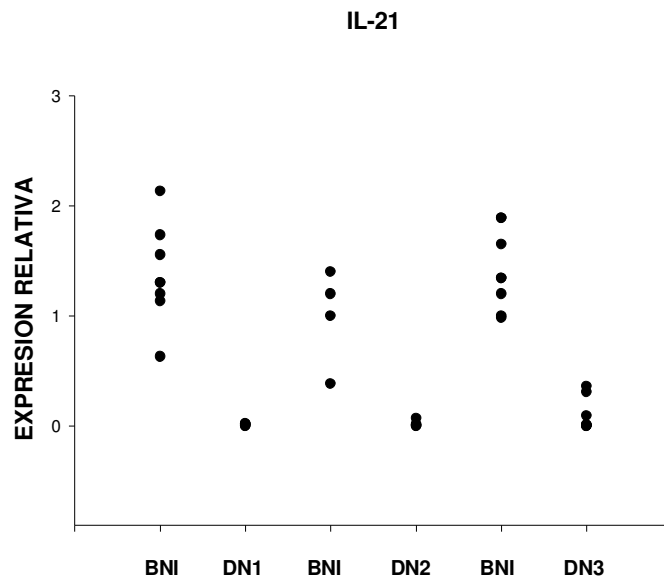


Figura 9. Niveles de expresión relativa del gen de IL-21 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), de segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3). Diferencias estadísticamente significativas BNI: DN1 P<0.004, DN2 P< 0.05 y DN3 P<0.008, DN1 vs DN2, P>0.68; DN1 vs DN3, P>0.34 y DN2 vs DN3, P>0.2207. DN R vs DN G P>0.571 y BNI R vs BNI G P>0.548



IFN- $\gamma$ 

La comparación de los niveles de expresión relativa del gen de IFN- $\gamma$  entre el grupo de niños BNI y DN1, mostró que los niños DN1 presentaron una disminución significativa con respecto a los niños BNI (BNI Cp= 0.954, DN1 Cp=0.208,  $P<0.004$ ), lo mismo ocurrió entre los DN2 y los BNI (BNI Cp=1.02, DN2 Cp=0.39,  $P<0.05$ ) y entre los niveles de expresión relativa de IFN- $\gamma$  obtenidos para los BNI y DN3 (BNI Cp=0.96, DN3 Cp=0.19,  $P<0.0008$ ) (Figura 10).

Al comparar las diferencias de expresión relativa entre los grados de desnutrición se encontró que no hay diferencias significativas para IFN- $\gamma$  (DN1 vs DN2,  $P>0.25$ ; DN1 vs DN3,  $P>0.7697$  y DN2 vs DN3,  $P>0.0625$ ). Para IFN- $\gamma$  también se realizaron comparaciones entre los pacientes DN y BNI con infección de tipo respiratoria (R) y con infección de tipo gastrointestinal (G) (DN R Cp=0.20 vs DN G Cp=0.32  $P >0.3631$ ) y (BNI R Cp=0.44 vs BNI G Cp=1  $P>0.3079$ ), donde tampoco se encontraron diferencias significativas.

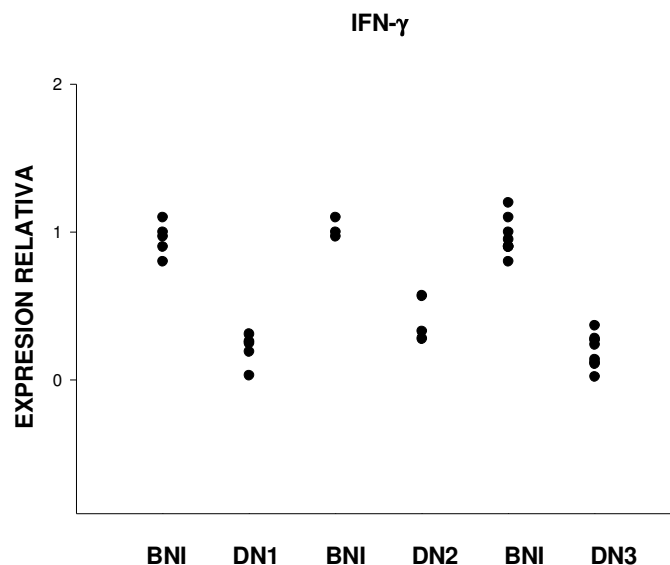


Figura 10. Niveles de expresión relativa del gen de IFN- $\gamma$  en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3). Diferencias estadísticamente significativas BNI: DN1  $P<0.004$ , DN2  $P<0.05$ , DN3,  $P<0.0008$ . DN1 vs DN2  $P >0.25$ ; DN1 vs DN3,  $P>0.7697$  y DN2 vs DN3,  $P>0.0625$ . DN R vs DN G,  $P >0.3631$  y BNI R vs BNI G,  $P>0.3079$ .

TNF- $\alpha$ 

Los resultados mostraron que para los niños con DN1 existe un aumento significativo en los niveles de expresión relativa del gen de TNF- $\alpha$  con respecto a los BNI (BNI Cp= 1.01, DN1 Cp=9.14, P<0.004). De igual forma se observó aumento de los niveles de RNAm cuando se compararon los grupos de niños con DN2 (BNI Cp= 0.87, DN2 Cp=2.54, P<0.05) y con los niños DN3 contra los niños BNI (BNI Cp=0.87, Cp=2.75, P<0.0008). Al comparar las diferencias de expresión relativa entre los grados de desnutrición se encontró que hay diferencias significativas para TNF- $\alpha$  entre DN1 y DN2 (P<0.05), y entre, DN1 y DN3 (P<0.0034), pero no se encontró diferencia significativa entre DN2 y DN3 (P>0.8363) (Figura 11). También se realizaron comparaciones entre los pacientes DN y BNI, por tipo de infección respiratoria (R) y con infección gastrointestinal (G) (DN R Cp= 0.31vs DN G Cp= 0.19 P>0.62) y (BNI R Cp=0.92 vs BNI G Cp=0.98 P>0.95), no se encontraron diferencias significativas.

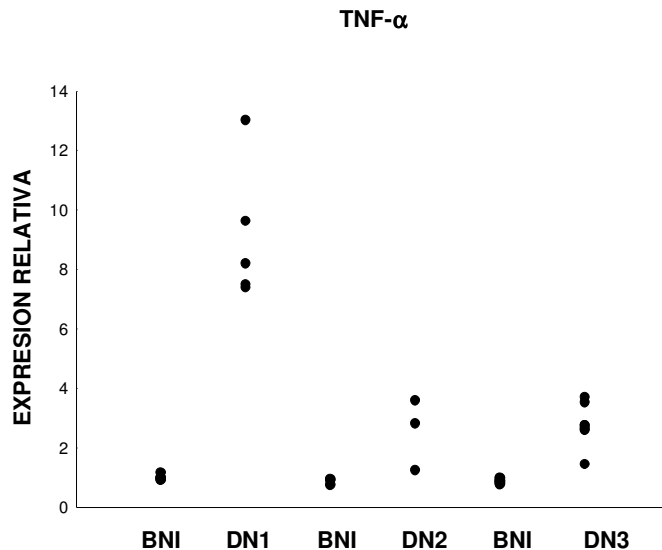


Figura 11. Niveles de expresión relativa del gen de TNF- $\alpha$  en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), de segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3). Los puntos de la gráfica representan el promedio de los triplicados. Diferencias estadísticamente significativas contra los BNI: DN1 P<0.004, DN2 P<0.05 y DN3 P<0.0008. DN1 y DN2 P<0.05 entre, DN1 y DN3 P<0.0034, no hay diferencia significativa entre DN2 y DN3 P>0.8363. DN R vs DN G, P>0.62 y BNI R vs BNI G, P>0.95.

## IL-10

Al comparar los datos de la expresión relativa para la IL-10, los resultados mostraron que los niños DN1 presentaron un aumento significativo de la expresión relativa con respecto a los niños BNI (BNI  $C_p=0.854$ , DN1  $C_p=3.45$ ,  $P<0.004$ ); (Figura 12) y lo mismo para los niños con DN2 (BNI  $C_p=0.83$ , DN2  $C_p=1.96$ ,  $P<0.05$ ) y con DN3 con respecto a los niños BNI (BNI  $C_p=0.88$ , DN3  $C_p=1.94$ ,  $P<0.0008$ ) (Figura 12). Al comparar las diferencias de expresión relativa entre los grados de desnutrición se encontró que no hay diferencias significativas para la IL-10 (DN1 vs DN2  $P<0.255$ ), (DN1 vs DN3  $P<0.190$ ) y (DN2 vs DN3  $P<0.274$ ). Se realizaron comparaciones entre los pacientes DN y BNI para IL-10 con infección de tipo respiratoria (R) y con infección de tipo gastrointestinal (G) (DN R  $C_p=1.33$  vs DN G  $C_p=1.63$ ,  $P>0.667$ ) y (BNI R  $C_p=2.85$  vs BNI G  $C_p=2.87$ ,  $P>0.83$ ), no se encontraron diferencias significativas.

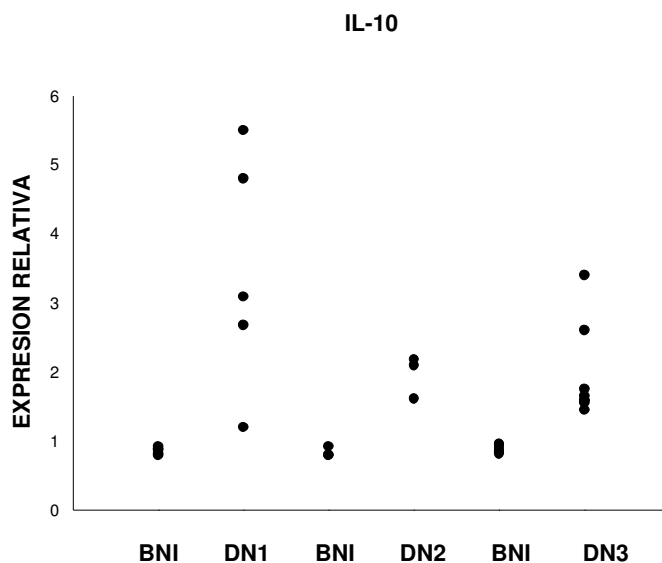


Figura 12. Niveles de expresión relativa del gen de IL-10 en niños bien nutridos infectados (BNI) y en niños desnutridos de primer grado (DN1), de segundo grado (DN2) y de tercer grado (DN3). Diferencias estadísticamente significativas BNI: DN1  $cP<0.004$ , DN2  $P<0.05$  y DN3  $P<0.0008$ . DN1 vs DN2  $P<0.255$ , DN1 vs DN3  $P<0.190$  y DN2 vs DN3  $P<0.274$ . DN R vs DN G  $P>0.667$  y BNI R vs BNI G  $P>0.83$ .

Los resultados demostraron que para BNI con infección de tipo respiratoria (R) y con infección de tipo gastrointestinal (G) existe un aumento significativo para la expresión relativa de IL-12, IL-18 e IL-21, y disminución de los niveles de RNAm en TNF e IL-10 al compararlo con los niños desnutridos con infección G y R (Figura 13).

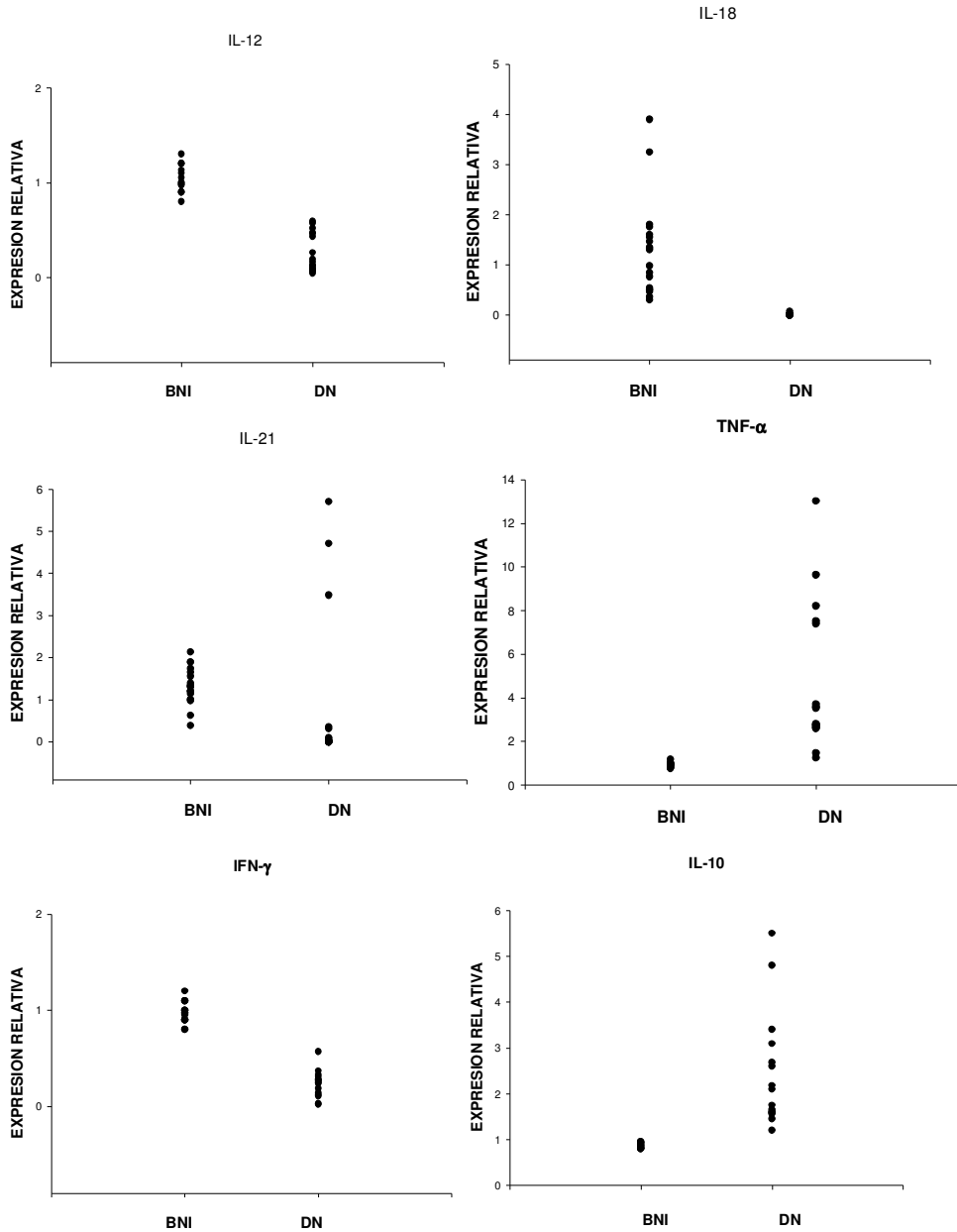


Figura 13. Niveles de expresión relativa de los genes de IL-12, IL-18, IL-21, IFN-γ, TNF-α, e IL-10 en niños bien nutridos con infección de tipo gastrointestinal y respiratoria (BNI) y en niños desnutridos con infección de tipo gastrointestinal y respiratoria (DN1, DN2 y DN3). Diferencias estadísticamente significativas IL-12: BNI vs DN  $P < 0.004$ ; IL-18: BNI vs DN  $P < 0.0008$ ; IL-21: BNI vs DN  $P < 0.001$ ; IFN-γ: BNI vs DN  $P < 0.008$ ; IL-10: BNI vs DN  $P < 0.004$ ; TNF-α: BNI vs DN  $P < 0.005$ .

## 7. DISCUSION

Es bien sabido que el individuo desnutrido es más susceptible a la invasión por agentes patógenos. Se ha demostrado que un estado nutricional deteriorado afecta casi todos los mecanismos de defensa inmunológica, lo que obliga a plantear el principio de que todo paciente desnutrido es un individuo inmunocomprometido, y viceversa, todo individuo con disminución de su inmunocompetencia se debe considerar potencialmente desnutrido (Barreto et al., 2000).

La desnutrición afecta al sistema inmunológico, particularmente a la inmunidad celular (Chandra, 1999; Nájera et al., 2001a; Nájera et al., 2001b; Nájera et al., 2004), lo que favorece que las infecciones sean más 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 la disminución en el abastecimiento de nutrientes. Este ajuste lleva a una reducción de los niveles funcionales de los órganos y células que participan en la respuesta inmunológica, favoreciendo el establecimiento de procesos infecciosos. Entre otros datos se sabe que la desnutrición altera la capacidad de los linfocitos T para responder apropiadamente a las citocinas (Malavé et al., 1998; Rodríguez et al., 2005).

En modelos animales, basándose en el perfil de citocinas que sintetizan, se han definido dos tipos funcionales de linfocitos T cooperadores CD4+, conocidos como Th1 y Th2 (Mosmann y Coffman, 1989). Estos dos tipos de sub-poblaciones celulares derivan de un precursor, denominado sub-población Th0, localizado en los nódulos linfáticos, que se diferencia en Th1 o Th2. Las citocinas producidas por estas sub-poblaciones de células T no sólo determinan sus funciones efectoras, sino que también participan en el desarrollo y expansión de las sub-poblaciones respectivas.

Las citocinas se producen en respuesta a microorganismos y otros antígenos que median y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias, su producción suele ser transitoria y limitada al lapso que dura el estímulo de un agente extraño. En numerosos casos ello se debe a que los correspondientes RNAm 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 y la producción de varias citocinas en pacientes con desnutrición (Mc Murray et al., 1998; Lofty et al., 1998; Dülger et al., 2002; Amesty et al., 2003; Rodríguez et al., 2005), pero hay sólo uno en el que se ha evaluado la expresión génica de citocinas en niños desnutridos, lo que es de gran importancia en el intento de conocer los mecanismos implicados en la inmunodeficiencia asociada con la desnutrición (González-Martínez et al., 2008).

En el presente estudio se evaluó la expresión génica de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-18 e IL-21, para determinar si la desnutrición afecta los niveles de expresión relativa de cada una de ellas y tener un panorama más amplio de los posibles mecanismos relacionados con las alteraciones inmunológicas observadas en niños con DCP.

Estudios realizados en humanos y en animales experimentalmente desnutridos han demostrado que existen alteraciones en su capacidad de producir citocinas. Particularmente con relación al TNF- $\alpha$ , un estudio realizado en cobayos desnutridos mostró que su producción está reducida (Dai y McMurray, 1998). Mientras que los niveles de TNF- $\alpha$  en el suero de niños desnutridos fueron significativamente más altos comparados con los bien nutridos (Giovambattista et al., 2000), en otro trabajo, también se encontró una elevación significativa de esta citocina en un grupo de niños desnutridos graves infectados (Amesty et al., 2002). Por el contrario, Berberoglu (2001) no encontró variación en las concentraciones de TNF- $\alpha$  en niños desnutridos en comparación con los bien nutridos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que para los niños DN de primer grado existe un aumento significativo en los niveles de expresión relativa

del gen de TNF- $\alpha$  con respecto al grupo de BNI, algo similar se observó cuando se compararon los grupos BNI contra los DN de segundo y tercer grado. Incremento en la concentración plasmática de TNF- $\alpha$  se ha reportado en pacientes con enfermedades autoinmunes, en particular, en los niños desnutridos este aumento podría estar relacionado con la pérdida de peso que se observa en ellos, ya que investigaciones referentes a TNF- $\alpha$  han demostrado que un aumento en su síntesis, puede contribuir a acelerar la pérdida de peso ya que provoca anorexia y caquexia (Tisdale, 2001; Dirks y Leeuwenburgh, 2006). Los datos de expresión del gen de TNF, que se muestran en este trabajo se correlacionan con los trabajos en que se observó una concentración alta de ésta citocina.

En el presente trabajo se apreció también, disminución en la expresión del gen de IFN- $\gamma$  en los niños desnutridos, y éste hecho podría relacionarse con los resultados obtenidos previamente por Rodríguez y colaboradores (2005) quienes mostraron reducción en la producción de IFN- $\gamma$  (respuesta Tipo 1) en niños DN, con respecto a los BNI. En relación con esto, se sabe que la IL-2 estimula la producción de IFN- $\gamma$  (Mengheri et al., 1992), por lo que la disminución en la expresión del gen de IL-2 (González-Martínez et al., 2008) y la baja producción de IL-2 (Rodríguez et al., 2005) observadas previamente en niños desnutridos podrían explicar lo observado con el IFN- $\gamma$ . Se ha demostrado que la disminución de la síntesis de IFN- $\gamma$  causa inmunosupresión, lo que provoca un incremento en la susceptibilidad a infecciones por bacterias o parásitos.

Por otra parte, se ha observado en niños DN incremento en el porcentaje de células CD4+ y CD8+ productoras de IL-4 (Rodríguez et al., 2005), e incremento en la expresión del gen de la misma citocina (González-Martínez et al., 2008). Lo que resulta interesante, ya que IL-4 es el principal inhibidor de la producción de IFN- $\gamma$  (Tang et al., 1993), y esto podría también contribuir a explicar la disminución en la producción y la expresión de IFN- $\gamma$ . En otro estudio, se observó que cuando las células T CD8+ son activadas en presencia de IL-4 pierden sus funciones citotóxicas, detienen la producción de IFN- $\gamma$  y desarrollan la capacidad para producir las citocinas T2: IL-4, IL-5 e IL-10 (Tanaka et al., 1993), estos

resultados coinciden con los de la presente investigación en donde se observó una disminución significativa de la expresión del gen de IFN- $\gamma$  y aumento en la expresión del gen de IL-10, ambos eventos ligados a una producción y expresión de IL-4 elevadas.

La IL-10 es un factor inhibidor de la síntesis de citocinas producidas por células Th2 e inhibe la síntesis especialmente de IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , es un potente inhibidor de la función monocito/macrófago y a su vez puede inhibir también la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8) en monocitos (Fiorentino et al., 1989; de Waal Malefyt et al., 1991; Taga y Tosato, 1992). El incremento en el número de células T CD4+ y CD8+ que producen IL-10 (Rodríguez y et al., 2005) y el incremento en la expresión del gen de IL-10 podrían influir en la disminución de la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-2 que se observa en niños desnutridos (González-Martínez et al., 2008). Estudios *in vitro* han demostrado que IL-10 inhibe la activación y proliferación de células T de sangre periférica humana (Yssel et al., 1992). Lo que se sabe de esta citocina, permite considerarla como un importante factor inmunosupresor, que estaría relacionado con el deterioro en la respuesta inmunológica observada en los niños desnutridos.

Adicionalmente, se ha observado que niveles altos de IL-10 inhiben la producción de IL-12 en células de la respuesta inmunológica innata y se considera que ésta es una estrategia utilizada por algunos patógenos para reprimir la respuesta inmunitaria del organismo hospedero (McGuirk y Mills, 2002), ya que IL-12 es esencial para el inicio de una secuencia de respuestas en la que intervienen macrófagos y linfocitos T que dan lugar a la erradicación de microorganismos intracelulares, además de que induce la diferenciación de las células T a células Th1. La producción de IL-12 se realiza cuando el IFN- $\gamma$  estimula a los macrófagos. Los datos del presente trabajo revelan una disminución en la expresión relativa del gen de IL-12 en niños DN en relación con los BNI, lo que podría explicarse considerando la disminución en la expresión de IFN- $\gamma$  y el incremento en la de IL-10 observados en estos niños en este trabajo.



Por separado la IL-12 y la IL-18, son capaces de inducir *in vitro* la producción de pequeñas cantidades de IFN- $\gamma$ , la misma que se dispara cuando ambas citocinas actúan de manera conjunta. Quienes producen ambas citocinas son células NK, células dendríticas, microgliales, macrófagos, células T y B (Andrés et al., 2006). Las funciones principales de IL-18 incluyen la inducción de la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . IL-18 comparte actividades biológicas con IL-12, promoviendo la producción de IFN- $\gamma$  en ratones y en seres humanos, además actúa como factor co-estimulante en la activación de células Th1 (Xu et al., 2007). Por lo que la disminución en la expresión de los genes de IL-12 y la disminución en la expresión de IL-18 que se presenta en este trabajo, podrían estar también relacionadas con la disminución de la expresión del gen de IFN- $\gamma$ .

Adicionalmente a IL-12 e IL-18, la IL-21 induce la expresión del gen de IFN- $\gamma$ , se han estudiado los efectos de IL-21 e IL-18 sobre la expresión del RNAm de IFN- $\gamma$  y se determinó que IL-21 e IL-18 por separado inducen una baja expresión del gen de IFN- $\gamma$ , pero una combinación de ambas citocinas conducen a la sobreexpresión del gen (Strengell et al., 2002). En niños desnutridos, la disminución en la expresión del gen de IL-21 observada en este trabajo parece estar relacionada también con la disminución en la expresión relativa del gen de IFN- $\gamma$ , debido a que algunos estudios han demostrado que la IL-21 estimula la expresión de los genes ligados a las respuestas Th1 por ejemplo el gen de IFN- $\gamma$  (Strengell et al., 2002; Sake et al., 2007). Por otro lado se demostró recientemente que IL-21 desempeña un papel dominante en la diferenciación de células Th1 (Strengell et al., 2002).

El incremento o disminución en la expresión de los genes de las citocinas evaluadas en el presente estudio podrían explicarse considerando que la interacción entre nutrición e inmunidad es un sistema complejo, en el que los alimentos en general y los nutrientes en particular, ejercen un papel importante en el desarrollo y preservación del sistema inmunológico, por ello cualquier desequilibrio nutricional afectará en alguna medida la competencia del sistema inmunológico, como se observa en los individuos desnutridos. Estudios en animales, han permitido comprobar que ciertas vitaminas y minerales poseen un

papel esencial en el mantenimiento de la función inmunológica. Los estados de desnutrición en humanos normalmente son síndromes complejos en los que se observan deficiencias de múltiples nutrientes. Las deficiencias de un solo micronutriente pueden aparecer en relación con el hierro, el zinc y la vitamina A.

Un estudio determinó los efectos de la deficiencia de zinc sobre los niveles de RNAm de IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , e IL-8. Los resultados demostraron que la deficiencia de zinc disminuyó los niveles de expresión de RNAm de IL-2 e IFN- $\gamma$ . Sin embargo, la deficiencia de zinc aumentó los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , y de IL-8. Estos datos demuestran que el zinc media negativamente la expresión del gen de IL-2 y de IFN- $\gamma$  en las células Th1 y positivamente al TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , e IL-8 (Bao et al., 2003).

Investigaciones realizadas en animales, han mostrado que la alteración en la regulación de IFN- $\gamma$  puede ser la afectación primaria en deficiencia de vitamina A. En modelos animales, la deficiencia de vitamina A determina un fuerte desbalance regulatorio de células TCD4+, con síntesis excesiva de citocinas tipo Th1 e insuficiente secreción por el fenotipo de células Th2 (Cantorna et., 1994; Cipitelli et al., 1996). Estudios en murinos con ésta misma deficiencia mostraron que la transcripción de IFN- $\gamma$  no se inhibe, y por lo tanto esto determina su alta producción (Carman y Hayes, 1991; Wiedermann et al., 1996); Asimismo, se ha señalado la expresión constitutiva del IFN- $\gamma$  en cultivos de células esplénicas y de ganglios linfáticos mesentéricos de ratones y ratas deficientes de vitamina A mientras que, en células esplénicas estimuladas con Concanavalina A, la producción de IFN- $\gamma$  disminuye (Bowman et al., 1990). Aunque los estudios acerca de la deficiencia de esta vitamina y la producción de citocinas son controversiales tanto en animales como en humanos (Bowman et al., 1990; Wieringa et al., 2004)

Las deficiencias de micronutrientes 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 (Meydani, 1990). La relación entre la dieta y la salud es un hecho que ha sido ampliamente demostrado; sin embargo, existe un interés

creciente en cuáles de los componentes de la dieta son biológicamente activos y cómo ellos ejercen su efecto funcional (García-Vallejo, 2004). Actualmente se realizan estudios donde se hace referencia a la nutrigenética, la cual hace un análisis prospectivo de las diferencias entre los nutrientes con respecto a la regulación de la expresión de genes. La nutrigenética ofrece la posibilidad de personalizar la nutrición de acuerdo con la constitución genética de los consumidores, teniendo en cuenta el conocimiento de las variantes genéticas que afectan al metabolismo de los nutrientes y a las dianas de los nutrientes (Brownie, 2006; Gómez, 2007). Esto es importante dado que los componentes de la dieta pueden alterar la expresión genómica directa o indirectamente. A nivel celular, los nutrientes pueden: 1) actuar como ligandos para la activación de factores de transcripción que favorezcan la síntesis de receptores; 2) ser metabolizados por rutas metabólicas primarias o secundarias, alterando de ese modo las concentraciones de substratos o intermediarios; o 3) influir positiva o negativamente sobre las rutas de señalización (Marti et al., 2005).

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). Se ha reconocido el término de 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 et al., 2002). Este término se ha asociado particularmente con algunas citocinas, 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).

El incremento en la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-10 y la disminución de IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18 e IL-21 observadas en éste estudio, indican que existe una alteración en el balance Th1/Th2, en el que se observa que las citocinas que participan en la respuesta de tipo celular son las que menos se expresan. Esta alteración podría estar provocando que el sistema inmunológico de los niños desnutridos sea incapaz de combatir las infecciones, ya que es precisamente el balance entre estas respuestas es el que finalmente conduce a la resolución de la infección.

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo muestran que la desnutrición se encuentra asociada a alteraciones relacionadas con la expresión génica de citocinas de respuesta tipo 1 y tipo 2, y esto permite concluir que:

1. Los niños desnutridos leves, moderados y graves presentan disminución significativa en la expresión relativa de los genes de la IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18 e IL-21 al compararlos con los niños bien nutridos infectados.
2. En cuanto a la expresión relativa del gen de TNF- $\alpha$  e IL-10 en niños desnutridos leves, moderados y graves presentan aumento al compararlo con los niños bien nutridos.
3. Al observar las diferencias de expresión relativa entre los diferentes grados de desnutrición DN1, DN2 y DN3, se observó diferencia significativa solo para TNF- $\alpha$  mientras que para las demás citocinas no hay diferencias significativas.
4. En las comparaciones de acuerdo al tipo de infección entre los pacientes DN y niños BNI para IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-18 e IL-21 con infección de tipo respiratoria (R) y con infección de tipo gastrointestinal (G), no se encontraron diferencias significativas.
5. Las alteraciones observadas en la expresión relativa de las citocinas estudiadas, permiten señalar que la respuesta celular en los niños desnutridos se encuentra alterada, debido a que en ellos se observa disminución en la expresión de genes de respuesta Tipo 1 e incremento en la expresión de genes de respuesta Tipo 2, lo que contribuye a explicar la deficiente respuesta inmunológica observada en los niños con desnutrición.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A, Lichtman A y Pober J. 2002. Inmunología celular y molecular .McGraw-Hill Interamericana de España.
- Aarvak T, Chabaud M, Thoen J, Miossec P y Natvig J. 2000. Changes in the Th1 or Th2 cytokine dominance in the synovium of rheumatoid arthritis (RA): a kinetic study of the Th subsets in one unusual RA patient. *Rheumatology (Oxford)*. 39: 513-522.
- Aggarwal B, Kohr W, Hass P, Moffat B, Spencer S, Henzel W, Bringman T, Nedwin G, Goeddel D y Harkins R. 1985. Human tumor necrosis factor: Production purification and characterization. *J Biol Chem*. 25: 2345–2354.
- Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. 2000. *Curr Opin Immunol*. 12: 59-63.
- Andrés R, Amaro J y Bascones A. 2006. Interleukin 18, a new factor in the pathogenesis of the periodontal diseases. *Avances en Periodoncia*. 18: 91-100.
- Amesty de Valbuena M, 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.
- Amesty de Valbuena, Castillo F, Vicente de Villarroel, Núñez J, Marcano H, Colmenares Y, Atencio R, Rivero M y Cayama N. 2002. Citocinas proinflamatorias y proteína c reactiva en niños desnutridos graves infectados y en un grupo control 2001. *Arch Ven Pueric Pediatr*. 65: 91-99.
- Anaya J. 2003. Descripción Molecular del TNF- $\alpha$ . *Reumatología*. 2: 112-120.
- Bao B, Prasad A, Beck F y Godmere M. Zinc modulates mRNA levels of cytokines. 2003 Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: 1095-1102.
- Barreto J, Santana S y Martínez C. 2000. Desnutrición e infecciones respiratorias. *A Med*. 9: 15-21.
- Barrie A y Plevy E. 2005. Review The interleukin-12 family of cytokines: Therapeutic targets for inflammatory disease mediation. *Clin. Applied Immunol. Rev*. 5: 225-240.
- Bazan JF, Timans JC, Kastelein RA. 1996. A newly defined interleukin-1? *Nature*. 379:591.
- Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol*. 40: 845-859.
- Bettelli E, Korn T y Kuchroo V. K. 2007. Th17: The third member of the effector T cell Trilogy. *Curr Opin Immunol*. 19:652-657.
- Berberoglu M. Evaluation of the correlation between serum tumor necrosis factor- $\alpha$  and relative body mass index (RBMI) in childhood. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2001: 14: 543-5477.

- Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon AM, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin AC, Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B y Superti-Furga G. 2004. A physical and functional map of the human TNF- $\alpha$  /INF- $\gamma$  B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol.* 6: 97-105.
- Bowman T, Goonewardene M, Pasatiempo A, Ross A y Taylor C. 1990. Vitamin A deficiency decreases natural killer cell activity and Interferon production in rats. *J Nutr.* 120: 1264-1273.
- Brownie S. 2006. Why are elderly individuals at risk of nutritional deficiency? *Int J Nurs Pract.* 12: 110-118.
- Cameron L, Taha R, y Tsicopoulos A. 1999. Airway epithelium expresses interleukin 18. *J Eur Respir* 14:553–9.
- Cantorna M, Nashold F y Hayes C. 1994. In vitamin A deficiency multiple mechanisms establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function. *J Immunol.* 152: 1515-1522.
- Carman J y Hayes C. 1991. Abnormal regulation of IFN- $\gamma$  secretion in vitamin A deficiency. *J Immunol.* 147: 1247-1252.
- Chandra R K. 1991. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr.* 53: 1087-1101.
- Chandra R K. 1999. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proc Nutr. Soc.* 58: 681-683.
- Cho M, Kim Y, Lee M y Kim S.G. 2000. The effect of cysteine on the altered expression of class  $\alpha$  and  $\mu$  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.
- Chtanova T y Mackay R. 2001. T Cell effector subsets: Extending the Th1/Th2 paradigm. *Adv Immunol.* 78: 233-266.
- Cipitelli M, Ye J, Viggiano V, Sica A, Ghosh P, Gulino A, Santoni A y Young H. 1996. Retinoic acid-induced transcriptional modulation of the human Interferon-gamma promoter. *J Biol Chem.* 271: 26783-26793.
- Collado V, Porras Rebeca, Cutuli M, Gómez E. 2008. The innate immune system I: its mechanisms. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2: 1-16.
- Collins S, Dent N, Binns P, Bahwere P, Sadler K y A Hallam. 2006. Management of severe acute malnutrition in children, *Lancet.* 368: 1992–2000.

- Cooper C y Bousesteao N. 2006. Characterization of STAT5B phosphorylation correlating with expression of cytokine-inducible SH2-containing protein (CIS). *Cell Sign.* 18: 851-860.
- Conti B, Park L, Calingasan Y, Kim Y, Kim H, Bae Y, Gibson G y Joh TH. 1999. Cultures of astrocytes and microglia express interleukin 18. *Brain Res Mol Brain Res.* 67:46–52.
- Cunningham-Rundles C y Ponda PP. 2005. Molecular defects in T- and B-cell primary immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol.* 5: 880-892.
- Dai G y McMurray D. 1998. Altered cytokine production and impaired antimycobacterial immunity in protein malnourished guinea pigs. *Infect Immun.* 66: 3562-3568.
- Darnell J, Kerr I y Stark G. 1994. JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to INF's and other extracellular signaling proteins. *Science.* 26: 1415–1421.
- de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H y de Vries JE. 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigenic-specific human T cell proliferation by diminishing the antigenic-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 4: 915-924.
- de Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo M, Spits H y de Vries J. 1992. Interleukin-10. *Curr Opin Immunol.* 4: 314-320.
- Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze M, Wesa A, Parmiani G y Anichini A. 2007. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res.* 16: 4677-85.
- Dinarello C. Interleukin-18. 1999. *Methods.* 19:123–32.
- Dirks A y Leeuwenburgh C. 2006. Tumor necrosis factor alpha signaling in skeletal muscle: effects of age and caloric restriction. *J Nutr Biochem.* 17: 501-508.
- Dülger 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.
- Dumoutier L, Louahed J y Renauld J. 2000. Cloning and characterization of IL-10-related T-cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol.* 164: 1814-1819.
- Eskdale J, Kube D, Tesch H y Gallagher G. 1997. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics.* 46: 120-128.
- Feldmann M y Maini R. 2001. Anti-TNF therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol.* 9: 163-196.



- Ferrari-Lacraz S, Chicheportiche R, Schneiter G, Molnarfi N, Villard J y Dayer JM. 2008. IL-21 promotes survival and maintains a naive phenotype in human CD4+ T lymphocytes. *Int Immunol*. 8:1009-1018.
- Filippi C y Von Herrath. 2008. IL-10 and the resolution of infections. *J Pathol*. 214: 224-230.
- Fiorentino D, Zlotni A, Vieira P, Mosmann T, Howard M, Moore K y O'Garra. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*. 146: 3444-51.
- Flores-Huerta S, Villalpando C y Fajardo-Gutiérrez A. 1995. Evaluación antropométrica del estado de nutrición de los niños. *Procedimientos, estandarización y significado*. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 47: 725.
- García-Vallejo F. 2004. La genómica nutricional: Un nuevo paradigma de la investigación de la nutrición humana. *Colomb Med*. 2004. 35: 150-160.
- Garnacho M, Ortiz L y Aldabó P. 2005. Polimorfismos genéticos en la sepsis. *Med Intensiva*. 29: 185-191.
- Giovambattista A, Spinedi E, Sanjurjo A, Chisari A, Rodrigo M y Pérez N. 2000. Circulating and mitogen-induced tumor necrosis factor (TNF) in malnourished children. *Medicina*. 60: 339-42.
- Gómez A. 2007. Nutrigenómica y nutrigenética. *Ámbito Farmacéutico*. *Nutrición*. *OFFARM*. 26: 78-85.
- 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-Martínez H, Rodríguez L, Nájera O, Cruz D, Miliar A, Domínguez A, Sánchez F, Graniel J y González C. 2008. Expression of Cytokine mRNA in Lymphocytes of Malnourished Children. *J Clin Immunol* 28:593–599.
- Grimble R. 1996. Interaction between nutrients, proinflammatory cytokines and inflammation. *Clin Sci*. 91: 121-30.
- Guerrero J. 2007. Introducción a la inmunología general. *Gastr Latinoam*. 18: 113-116.
- Harris D, Goodrich S, Gerth A, Peng S y Lund F. 2005. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. *J Immunol*. 174: 6781-6790.
- Hernán C. 2001. Malnutrición de micronutrientes. *Estrategias de prevención y control*. *Columb Med*. 2: 95-98.
- Herrera B, Torres R, Juárez C y Sada D. 2005. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Rev Inst Nal Enf Resp*. 18: 327-336.

- Hilkens C, Kalinski P, de Boer M y Kapsenberg M. 1997. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naïve T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood*. 90:1920-1926.
- Hironobu A, Chikara O, Satoru K, Sugamura, Naoto I, Shigeru T, y Kazuo. 2001. Cutting Edge: The Common gamma Chain Is an Indispensable Subunit of the IL-21 Receptor Complex. *J. Immunol.*167:1-5.
- Hoffman-Goetz L. 1986. Malnutrition and immunological function with special reference to cell-mediated immunity. *Yearb Phys Anthropol*. 29: 139-159.
- Horner A, Widhopf G, Burger J, Takabayashi K, Cinman N, Ronaghy A, Spiegelberg H y Raz E. 2001. Immunostimulatory DNA inhibits IL-4-dependent IgE synthesis by human B cells. *J Allergy Clin Immunol*. 108: 417-423.
- Hughes S y Kelly Y. 2006. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. *Parasite Immunol* 28: 577–588.
- Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O, Toivanen P y Punnonen J. 1999. Synovial fluid T cell from patients with rheumatoid arthritis are refractory to the T helper type 2 differentiation-inducing effects of interleukin-4. *Immunology*. 96: 58-64.
- Jankovic D, Liu Z y Gause W. 2001. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol*. 8: 450-457.
- 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.
- Khabar K y Young H. 2007. Post-Transcriptional Control of the Interferon System. *Biochimie*. 89: 761-769.
- Kim J, Brannan C, Copeland N, Jenkins N, Khan T y Moore K. 1992. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol*. 148: 3618-3623.
- Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T Suemoto Y, Okamoto I, Usui M, Ikeda M y Kurimoto M. 1997. IFN- $\gamma$ -inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J Immunol*. 158: 1541–50.
- Kotenko S. 2002. The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? *Cytokine Growth Factor Rev*.13: 223-240.
- Kuchroo V, Das M y Brown J. 1995. 67–7 and B7–2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*. 80:707–718.
- Lafaille J. 1998. The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*: 9: 139–151.

- Lanzavecchia A y Sallusto F. 2001. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol.* 13: 291-298.
- 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.
- Levings M, Sangregorio, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R y Roncarolo M. 2001. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human Type 1 T regulatory. *Cells J Immunol.* 166: 5530-5539.
- Li H, Gade P, Xiao W y Kalvakolanu D. 2007. The Interferon Signaling Network and Transcription Factor C/EBP- $\beta$ . *Cell Mol Immunol.* 4: 407-417.
- Lichtenauer-Kaligis E, de Boer T, Verreck F, van Voorden S, Hoeve M, van de Vosse E, Ersoy F, Tezcan I, van Dissel J, Sanal O y Ottenhoff T. 2003. Severe Mycobacterium bovis BCG infections in a large series of novel IL-12 receptor beta 1 deficient patients and evidence for the existence of partial IL-12 receptor beta 1 deficiency. *Eur J Immunol.* 33: 59-69.
- Locksley R, Killeen N y Lenardo M. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 4: 487-501.
- 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.
- MacDonald J N. 2008. Kwashiorkor and severe acute malnutrition in childhood. *Lancet.* 371: 1748.
- McMurray D, Mintzer C, Bartow A y Parr L. 1998. Dietary protein deficiency and Mycobacterium bovis BCG affect interleukin-2 activity in experimental pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 9: 2606-2611.
- Malavé I, Vethercourt M, Pirela M y Cordero R. 1998. 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.
- Mariko M, Hironobu A, Toshifumi H, Masaya H, Masahiro F y Masataka N. 2009. Transcriptional activation of the interleukin-21 gene and its receptor gene by human t-cell leukemia virus type 1 tax in human T-cells. *Journal bio chem* 38: 25501-25511.
- Marti A, Moreno-Aliaga J, Zulet A y Martínez A. 2005. Revisión Avances en nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigenética. *Nutr Hosp.* 3: 157-164.
- McGuirk 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.

- Meiorin S, Espada G y Rosé C. 2006. Enfermedades febriles periódicas en pediatría. Arch Argent Pediatr. 104: 30-38.
- Mengheri E, Nobili F, Crocchioni G y Lewis J. Protein starvation impairs the ability of activated lymphocytes to produce interferon-gamma. 1992. J Interferon Res. 12: 17-21.
- Meydani S. Dietary modulation of cytokine production and biologic functions. 1990. Nutr Rev. 48: 361-369.
- Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, Tanimoto T, Torigoe K, Fujii M, Ikeda M, Fukuda S y Kurimoto M. 1996. Interferon- $\gamma$ -inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. Eur J Immunol. 26:1647–1651.
- Mizutani H, Black R y Kupper T. 1991. Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1). J Clin Invest. 87: 1066–71.
- Moore K, deWaal Malefyt R, Coffman R y O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol. 19: 683-765.
- Mora R. 1999. Malnutrition: Organic and functional consequences. World J Surg. 23: 530-535.
- Mosmann T y Coffman R. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. 7: 145-173.
- Mosmann T y Sad S. 1996. The expanding universe of T- cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today. 17: 138–146.
- Mugerwa. W. 1971. The lymphoreticular system in Kwashiorkor. J Path. 105: 105-109.
- 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. Manual Moderno. Editores: Escobar E, Espinosa E, Moreira M.
- 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, 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, Cortés E, Toledo G y Ortiz R. 2007. Effector T lymphocytes in well-nourished and malnourished infected children. *Clin Exp Immunol.* 3: 501-506.
- Nathan C, Murray H, Wiebe M y Rubin BY. 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp Med.* 158:670-689.
- Nieto C. 2007. The effects of protein-energy malnutrition on the central nervous system in children. *Rev Neurol.* 2: 571-574.
- O' Shea J, Gadina M y Schreiber R. 2002. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell.* 109: 121-31.
- Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando Hernández S, Hernández-Avila M y Sepúlveda-Amor J. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Opal S y DePalo V. 2000. Anti-Inflammatory Cytokines. *Chest.* 117: 1162-1172.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan J y Kastelein A. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 13: 715-25.
- Oshimi K y Hoshino S. 1992. Function and molecular structure of IL-12. *Nippon Rinsho.* 50: 1840-4.
- Parrish-Novak J, Dillon R, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross A, Johnston J, Madden K, Xu W, West J, Schrader S, Burkhead S, Heipel M, Brandt C, Kuijper JL, Kramer J, Conklin D, Presnell S, Berry J, Shiota F, Bort S, Hambly K, Mudri S, Clegg C, Moore M, Grant F, Lofton-Day C, Gilbert T, Rayond F, Ching A, Yao L, Smith D, Webster P, Whitmore T, Maurer M, Kaushansky K, Holly D, y Foster D. 2000. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature.* 2:57-63.
- Pelletier D, Frongillo E, Schroeder G y Habitch P. 1996. Efectos de la malnutrición en la mortalidad de menores de 5 años en países en desarrollo. *Bol OPS.* 120: 425-432.
- Pfeffer K. 2003. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*14: 185-191.
- Pollard K, Hultman P y Kono D. 2005. Immunology and genetics of induced systemic autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 4: 282-288.
- Pradeep A, Hadge P, Chowdhry S, Patel S y Happy D. 2009. Exploring the role of Th1 cytokines: interleukin-17 and interleukin-18 in periodontal health and disease. *J Oral Sci.* 2:261-266.

- Prinz M y Hanisch UK. 1999. Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J Neurochem.* 72: 2215–8.
- Ramana C, Gil M, Schreiber R y Stark G. 2002. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol.* 23: 96-101.
- 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 y 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.
- Reed JC. 2002. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov.* 1:111-21.
- 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.
- García X y Kaski J. 2000. Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. *Rev Cubana Med.* 2: 120-40.
- Romagnani S. 2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol.* 85: 9-18.
- Sánchez A, Hernández T, Abreu P, de las Cagigas R, Tam H, Rebozo P, Noa P, Arias V, Fernández C, González C, Sigarroa G. 2002. Expresión génica de interleucina 1 en la deficiencia de proteínas y vitamina A. *ALAN.* 52: 35-42.
- Sánchez de la Rosa y Rodríguez H. 2001. Interleucina-12 VS: Enfermedades infecciosas. *Rev Cubana Med.* 40: 118-121.
- Sanchez-Ramirez B y Talamás-Rohana P. 2002. Importancia de las prostaglandinas en la amibiasis hepática. *Salud Pública Mex.* 44: 247-257.
- Sato M, Taniguchi T y Tanaka N. 2001. The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors- studies from gene knockout mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12: 133-142.
- Singh M. 2004. Role of micronutrients for physical growth and mental development. *Indian J Pediatr.* 1: 59-62.
- Smeltz R, Chen J, Ehrhardt R y Shevach E. 2002. Role of IFN- $\gamma$  in Th1 Differentiation: IFN- $\gamma$  Regulates IL-18R $\alpha$  Expression by Preventing the Negative Effects of IL-4 and by Inducing/Maintaining IL-12 Receptor  $\beta$ 2 Expression. *J Immunol.* 168: 6165-6172.
- Smyth M, Crowe N, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H y Godfrey D. 2002. NKT cells conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol.* 14: 165-171.

- Solorzano C, Kaibara, A, Hess P, Edwards D, Ksontini R, Abouhamze A, McDaniel S, Frazier J, Trujillo D, Kieft G, Seely J, Kohno T, Cosenza E, Clare-Salzler, MacKay S, Martin W, Moldawer L y Edwards K. 1998. Pharmacokinetics, immunogenicity, and efficacy of dimeric TNFR binding proteins in healthy and bacteremic baboon. *J Appl Physiol* 84: 1119-1130.
- Strengell M, Sareneva T, Foster D, Julkunen I, Matikainen S. 2002. IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response *J Immunol.* 7:3600-3605.
- Suto A, Kashiwakuma D, Kagami S, Hirose K, Watanabe N, Yokote K, Saito Y, Nakayama T, Grusby MJ, Iwamoto I, Nakajima H. 2008. Development characterization of IL-21-producing CD4+ T cells. *J Exp Med.* 6:1369-1379.
- Szlosarek P, Charles A y Balkwill F. 2006. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer.* 42: 745-750.
- Tang M, Kemp A y Varigos G. 1993. IL-4 and interferon-gamma production in children with atopic disease. *Clin Exp Immunol.*92: 120–124.
- Taga K y Tosato G. 1992. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol.* 148: 1143-1148.
- Tanaka T, Hu-Li J, Seder R, Fazekas de St Groth B y Paul W. 1993. Interleukin 4 suppresses interleukin 2 and interferon gamma production by naive T cells stimulated by accessory cell-dependent receptor engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 5914-8.
- Takeuchi M, Nishizaki Y, Sano O, Ohta T, Ikeda M y Kurimoto M. 1997. Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of interferon- $\gamma$ -inducing factor (interleukin 18) in mouse intestinal epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 289: 499–507.
- Taniguchi T. 1988. Regulation of cytokine gene expression. *Ann Rev Immunol.* 6: 439-454.
- Thomson A. 1994. *The Cytokine Handbook.* 2ª Edición. Academic Press. London.
- Tisdale M.J. 2001. Cancer anorexia and cachexia. *Nutrition.* 17: 438- 442.
- Tone M, Thompson SA, Tone Y, Fairchild PJ y Waldmann H. 1997. Regulation of IL-18 (IFN- $\gamma$ -Inducing Factor) Gene Expression. *J. Immunol.*159:6156-6163.
- Toshitatsu H y Akihiko Y. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 413-421.
- Tracey K y Cerami A. 1994. Tumor necrosis factor: Pleiotrophic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med.* 45: 491-503.
- Trinchieri G. 2007. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med.* 204: 239-43.



- Udagawa N, Horwood J y Elliott J. 1997. Interleukin-18 (interferon  $\gamma$ -inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte:macrophage colony stimulating factor and not via interferon- $\gamma$  to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med.*185:1005–12.
- UNICEF. Estado Mundial de la Infancia, 2005. La infancia amenazada. Nueva York: Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia. 10-30.
- Vásquez-Garibay E. 2003. Citocinas y desnutrición proteica energética en el niño. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 60: 5-8.
- Vásquez-Garibay E. M, Navarro-Lozano M. E, Romero-Velarde E y Vizmanos-Lamotte B. 1999. Hábitos de alimentación en niños con desnutrición proteico calórica primaria y secundaria. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 56: 543-549.
- Vélez M, Paris C y García F. 2007. Interleukin-17: characteristics, differentiation pathways, signaling and biological functions. *Iatreia rev fac med univ antioquia.* 20: 186-195.
- Wajant H, Grell M. y Scheurich P. 1999. TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10: 15-26.
- Wajant H, Pfizenmaier K y Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10: 45–65.
- Ware C. F. 2003. The TNF Superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 181-184.
- Watts T. 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of t cell responses. *Annu Rev Immunol* 23: 23-68.
- Wiedermann U, Enerbäck C, Hanson L, Kahu H y Dahlgren U. 1996. Vitamin A deficiency increases inflammatory responses. *J Immunol.* 44: 578-584.
- Wieringa F, Dijkhuizen M, West C, van der Ven-Jongekrijg J, Muhilal y van der Meer J. 2004. Reduced production of immunoregulatory cytokines in vitamin A-and zinc-deficient Indonesian infants. *Eur J Clin Nutr.* 58:1498-1504.
- Wu J, Ma J, Tat Fan S, Schlitt H y Tsui Tung-Yu. 2005. Bilirubin derived from heme degradation suppresses MHC class II expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*16: 890-896.
- Xu Q, Tin SK, Sivalingam SP, Thumboo J, Koh DR y Fong KY. 2007. Interleukin-18 promoter gene polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus: association with CC genotype at position -607. Ann Acad Med Singapore. 2: 91-95.
- Yadav D y Sarvetnick N. 2003. Cytokines and autoimmunity: redundancy defines their complex nature. *Curr Opin Immunol.*15: 697-703.
- Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S y Nakanishi K. 1998. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN- $\gamma$  production. *J Immunol.* 161: 3400–7.



- Yssel H, De Waal Malefyt R, Roncarolo M, Abrams J, Lahesmaa R, Spits H y de Vries JE. 1992. IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *J Immunol.* 149: 2378-2384.
- Zhong J, Deaciuc I, Burikhanov R y Villiers W. 2006. Lipopolysaccharide-induced liver apoptosis is increased in interleukin-10 knockout mice. *Biochim Biophys Acta.* 339: 1007-1014.

# Expression of Cytokine mRNA in Lymphocytes of Malnourished Children

Haydeé González-Martínez · Leonor Rodríguez ·  
Oralia Nájera · David Cruz · Angel Miliar ·  
Aarón Domínguez · Fausto Sánchez · Jaime Graniel ·  
María Cristina González-Torres

Received: 3 March 2008 / Accepted: 11 April 2008 / Published online: 22 May 2008  
© Springer Science + Business Media, LLC 2008

## Abstract

**Introduction** Protein–calorie malnutrition represents a significant worldwide health problem and is associated with an increased risk for infections. The purpose of this study was to evaluate possible changes in type 1/type 2 responses balance in malnourished children.

---

H. González-Martínez · L. Rodríguez ·  
M. C. González-Torres (✉)  
Departamento de Ciencias de la Salud,  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,  
Av. San Rafael Atlixco, No. 186. Col. Vicentina,  
C.P. 09340 México D.F., México  
e-mail: mcgt@xanum.uam.mx

O. Nájera  
Departamento de Atención a la Salud,  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,  
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco,  
México D.F., México

D. Cruz  
Departamento de Patología,  
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”,  
México D.F., México

A. Miliar  
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación,  
Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional,  
México D.F., México

A. Domínguez · F. Sánchez  
Departamento de Gastroenterología,  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición  
Salvador Zubirán,  
México D.F., México

J. Graniel  
Hospital Pediátrico Iztapalapa,  
Servicios de Salud Gobierno del Distrito Federal,  
México D.F., México

**Results** The data obtained in the present study showed that the expression levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin (IL)-4, and IL-10 were more highly, in contrast IL-2, gamma interferon, and IL-6 genes were expressed less in all groups of malnourished children compared with the well-nourished infected children. 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 malnourished children.

**Conclusion** In conclusion, the results suggest that alterations in the balance of type 1/type 2 immune responses exist in malnourished children, and this could be the reason that the immunological system of the malnourished children is incapable of eradicating infections.

**Keywords** Protein–calorie malnutrition · immunological responses type 1/type 2 · lymphocytes · cytokines

## Introduction

Protein–calorie malnutrition (PCM) is a serious public health problem in Mexico as well as in other countries [1]. Malnutrition has been identified as an important risk factor for predisposition to deadly infections [2]. A reiterative cycle of malnutrition and infection, with a subsequent worsening of the nutritional condition, is the main cause of morbidity and mortality in children in underdeveloped countries [3]. Previous reports have indicated that the impaired immune response observed in severely malnourished children may be related mainly to altered lymphocyte function rather than to decreased numbers of T cell subsets [4].

The characterization of the T cell response as either a type 1 response, associated with cell-mediated immunity, or type 2, associated with humoral immunity, is important

because it provides a basis for understanding how T cells contribute to resistance or susceptibility to different infections [5]. Type 1 response cells produce interleukin (IL)-2, gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and they mediate immunity to viral and bacterial pathogens. Type 2 cells produce IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, and IL-13 and are involved in allergic diseases and in defense against parasitic infections [6].

The generation and maintenance of these immunological responses are controlled by a network of small, nonstructural, intercellular regulatory proteins that mediate a multiplicity of immunologic as well as nonimmunologic biological functions [7]. These so-called cytokines and chemokines (referred here as cytokines) are induced by specific stimuli, such as several types of bacterial products. They are responsible for the generation, stimulation, and differentiation of multiple cell types as well as for controlling production of other cytokines [8].

A current method used to analyze cytokine production is to quantify their corresponding mRNA by real-time polymerase chain reaction (PCR). Cytokine mRNA quantification is widely used to investigate cytokine profiles, particularly in small samples where transcripts such as cytokine mRNAs are lowly expressed [9]. Currently, few studies exist that show that the PCM is related to changes in the expression of genes; some studies have been done in animals [10–12], and only one has been done with human lymphocytes [13].

The purpose of this study was to perform an accurate quantification of peripheral blood cytokine mRNA levels by real-time PCR methodology using the LightCycler. The TaqMan PCR protocol was used to allow measurement of various type 1 (IL-2, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ ) and type 2 (IL-4, IL-6, and IL-10) cytokine mRNAs in malnourished and well-nourished children. We used relative quantification to describe the changes in gene expression and to evaluate possible changes in type 1/type 2 responses balance in malnourished children.

## Materials and Methods

This study was assessed and approved by the Medical Ethics Committee of the General Direction of Medical Services of the Mexico City Government (Mexico). Heparinized peripheral blood samples were obtained in the Pediatric Hospital Iztapalapa, Mexico. Informed consent was obtained from the parents of each child participating in this study.

### Subjects

Four groups of children were studied:

- Group 1 *Well-nourished infected (WNI) children*, included three girls and eleven boys, hospitalized because of respiratory or gastrointestinal bacterial infection. Their ages ranged from 7 to 36 months, and all had adequate weight/height ratios according to age (Table I).
- Group 2 *First-degree malnourished infected (MN1) children*, included one girl and four boys, hospitalized because of respiratory or gastrointestinal bacterial infection. Their ages ranged from 7 to 27 months, and all had weight/height deficits >10% and <25% (Table I).
- Group 3 *Second-degree malnourished infected (MN2) children*, included one girl and two boys, hospitalized because of respiratory or gastrointestinal bacterial infection. Their ages ranged from 8 to 43 months, and all had weight/height deficits >25% and <40% (Table I).
- Group 4 *Third-degree malnourished infected (MN3) children*, included five girls and three boys, hospitalized because of respiratory or gastrointestinal bacterial infection. Their ages ranged from 6 to 60 months, and all had weight/height deficits >40% (Table I).

**Table I** Clinical Characteristics and Nutritional Status of Well-Nourished Infected Children (WNI), First-Degree Malnourished Children (MN1), Second-Degree Malnourished Children (MN2), and Third-Degree Malnourished Children (MN3)

Study group ( <i>n</i> )	Mean age in months (range)	Mean weight in kilograms (range)	Mean height in centimeters (range)	Mean weight deficit (%)	Type of infection ( <i>n</i> )
WNI (14)	20 (7–36)	11.7 (7.3–19)	80.9 (63–105)	<10	Respiratory (9) Gastrointestinal (5)
MN1 (5)	14.4 (7–27)	8.1 (6.5–10.6)	72 (63–90)	16.4	Respiratory (3) Gastrointestinal (2)
MN2 (3)	20.3 (8–43)	8.2 (5.7–12.5)	74.6 (68–90)	27.1	Respiratory (3) Gastrointestinal (0)
MN3 (8)	20.4 (6–60)	5.7 (3.8–10.2)	69 (55–103)	63	Respiratory (7) Gastrointestinal (1)

Bacterial infections in all cases were diagnosed rigorously on the basis of clinical data and laboratory routine tests. The children that were referred with clinical suspicion of tuberculosis, viral infection, allergies, or cardiac diseases were excluded from the study. The weight/height deficit was determined according to the established values for Mexican children [14].

Venous blood from all groups of children (approximately 1.5 ml) was separated by Linfograd density gradient centrifugation (Microlab, Mexico) for 20 min at 300×g. The mononuclear cells were removed and washed twice in phosphate-buffered saline solution.

**Total RNA Isolation and cDNA Synthesis**

The cell pellet was lyzed in a buffer containing guanidinium isothiocyanate, and total RNA was isolated by means of the RNeasy kit (Qiagen, MD, USA) following the manufacturer’s instructions. Isolated RNA was quantified using Genesys™ 10 Series (ThermoSpectronic), and 5-μg RNA was separated on a 1.0% agarose gel containing ethidium bromide in 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid buffer. Running buffer and gel contained 0.2 M formaldehyde. To prevent trace amount of DNA contamination, RNA samples were treated with amplification grade DNase I (Invitrogen) before reverse transcription. All RNA samples were stored at –80°C in RNA elution solution until further use.

We used 0.5 μg of RNA for reverse transcription with oligo-d(t) in 20-μl reaction volume using Superscript III reverse transcriptase (Life Technologies, Rockville, MD, USA), and the reactions were performed in Eppendorf Mastercycle thermocycler (Eppendorf). The amplified cDNA was quantified on a photometer at 260 nm.

**Real-Time PCR and Amplification Protocol**

Real-time PCR reactions were carried out using the Human Universal ProbeLibrary (Roche Diagnostics GmbH). Specific oligonucleotide primers were originally generated by using the online assay design software (ProbeFinder; <http://www.universal-probelibrary.com>), and the primer sequence for each gene is shown in Table II. The 20-μl reaction mixture contained 1× LightCycler TaqMan Master reaction mixture (Roche Diagnostics GmbH), 200 nM of each primer, 100 nM of Universal ProbeLibrary probe, 0.5 U Light-Cycler Uracil-DNA Glycosylase, and 2 μl of standard DNA in appropriate dilution. The amplification was performed in borosilicate glass capillaries (Roche Diagnostics GmbH).

Each sample was run in triplicate. Results were systematically normalized to expression levels of one reference gene.

**Statistical Analysis**

To compare the values of relative expression of MN children groups with those of WNI children, the statistical Mann–Whitney *U* test was used. The significance level was  $P \leq 0.05$ .

**Results**

Once expression results were standardized with respect to the reference gene ( $\beta$ -actin), the levels of relative expression for IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, and IL-10 of WNI, MN1, MN2, and MN3 children were compared using the nonparametric statistical Mann–Whitney *U* test. To collect the individual expression data, one WNI child was

**Table II** Detailed Primers and Conditions Used for Real-Time PCR Assays

Gene product	Primer name	Primer sequence	Annealing temp (°C)	ProbeFinder	Product size (bp)
TNF- $\alpha$	TNF- $\alpha$ -R	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA	60	#29	123
	TNF- $\alpha$ -F	CAGCCTCTTCTCCTTCTGAT			
IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ -R	TTTGGATGCTCTGGTCATCTT	60	#21	112
	IFN- $\gamma$ -F	GGCATTGGAAGAATTGGAAAG			
IL-2	IL-2-R	AAGTGAAAAGTTTTTGCTTTGAGC	60	#65	113
	IL-2-F	AAGTTTACATGCCCAAGAAGG			
IL-4	IL-4-R	GCCCTGCAGAAGGTTTCC	60	#16	72
	IL-4-F	CACCGAGTTGACCGTAACAG			
IL-6	IL-6-R	CTGCAGCCACTGGTTCTGT	60	#40	130
	IL-6-F	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCC			
IL-10	IL-10-R	GCAACCCAGGTAACCCTTAAA	60	#67	105
	IL-10-F	GATGCCTTCAGCAGAGTGAA			
$\beta$ -Actin	$\beta$ -Actin-R	TCTACAACGAGCTGCGAAT	60	#60	115
	$\beta$ -Actin-F	CAATTCCTCTCGGCCTCG			

compared with one MN child provided both had a similar type of infection and age.

The comparison of the relative expression levels of different genes showed that TNF- $\alpha$  (Fig. 1), IL-4 (Fig. 2), and IL-10 (Fig. 3) were more highly expressed in all groups of malnourished children compared with the well-nourished infected children.

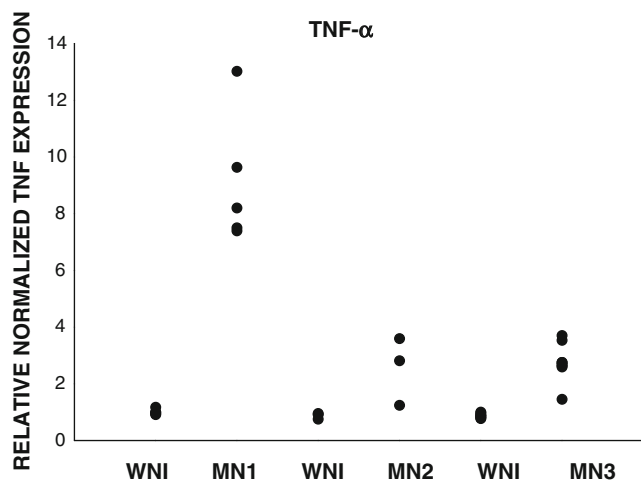
In contrast, IL-2 (Fig. 4), IFN- $\gamma$  (Fig. 5), and IL-6 (Fig. 6) genes were expressed less in all malnourished groups studied in comparison with WNI children.

Possible differences in relative expression were also evaluated between groups of malnourished children, and only for IL-10 and TNF- $\alpha$  genes was a higher relative expression observed in MN1 in comparison with MN2 and MN3 children.

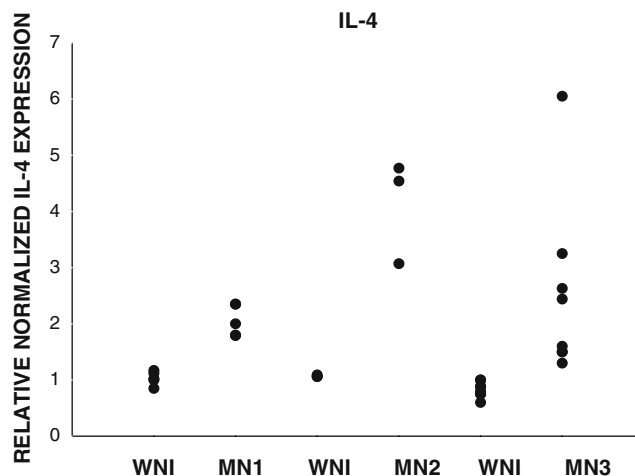
The relative expression levels of cytokines in WNI children with gastrointestinal infections were compared with those obtained for WNI children with respiratory infections, and the same comparison was made for MN children. No differences were detected in either case.

## Discussion

Different studies have demonstrated that malnutrition affects the immune system, particularly cellular immunity; this favors frequent infections that are more prolonged and serious in individuals with PCM [4, 15]. The high prevalence of malnutrition at a global level has been motivating the



**Fig. 1** Normalized relative evaluation of mRNA expression by real-time PCR for TNF- $\alpha$  in well-nourished infected children (WNI), first-degree malnourished children (MN1), second-degree malnourished children (MN2), and third-degree malnourished children (MN3). Determinations were made in triplicate, and the points in the graph represent their average. Significant differences were always observed between WNI and all MN groups ( $P < 0.004$  WNI vs. MN1;  $P < 0.05$  WNI vs. MN2;  $P < 0.0008$  WNI vs. MN3). Differences were observed in MN1 in comparison with MN2 ( $P < 0.05$ ) and MN3 ( $P < 0.0034$ ) children



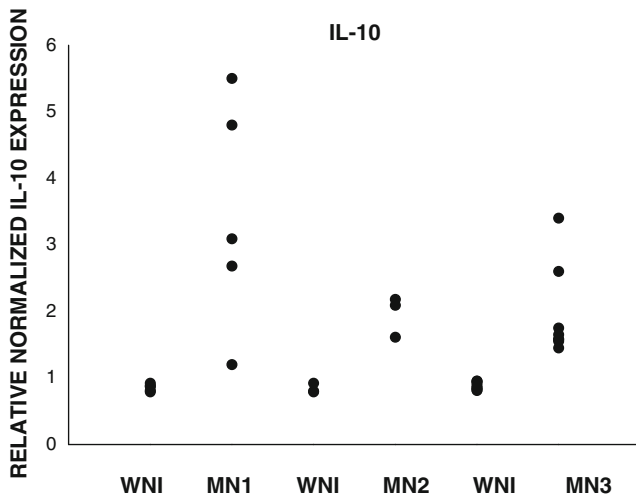
**Fig. 2** Normalized relative evaluation of mRNA expression by real-time PCR for IL-4 in well-nourished infected children (WNI), first-degree malnourished children (MN1), second-degree malnourished children (MN2), and third-degree malnourished children (MN3). Determinations were made in triplicate, and the points in the graph represent their average. Significant differences were always observed between WNI and all MN groups ( $P < 0.004$  WNI vs. MN1;  $P < 0.05$  WNI vs. MN2;  $P < 0.0063$  WNI vs. MN3)

investigators, for several decades, to study the alterations that occur in the undernourished as a result of the adjustment to a diminished supply of nutrients. This adjustment results in a reduction of the functional levels of the immune organs and cells, thus favoring the establishment of infection.

The generation of a protective T cell response against infectious agents is a complex process in which cytokines and co-stimulatory molecules provide signals that direct the development of adaptive immunity. Cytokines include a large group of glycoproteins that has the capacity to modulate the functional activity of individual cells, during both physiological and pathological conditions [16]. These polypeptides are synthesized in response to microorganisms and other antigens, and they mediate and regulate the immune and inflammatory reactions. The production of cytokines is a transitory process, and it is usually limited to the duration of the stimulus [17].

Diverse studies have been done in which the serum or plasmatic levels of certain cytokines have been evaluated [18–20], but no one has described the expression pattern of cytokine genes in malnutrition until now. This is why the study of the expression of genes related to the type 1/type 2 immunological responses is important.

Changes associated with nutritional factors have been associated with a diminished production of IL-2 in guinea pigs that were fed with low-protein diets [21]. Lofty et al. [18] also observed a significant decrease in the production of IL-2 in malnourished children. In addition, in experimental animals and in humans, it has been demonstrated that the production of several cytokines, including IL-2, is diminished in patients with PCM. Rodriguez et al. [22]



**Fig. 3** Normalized relative evaluation of mRNA expression by real-time PCR for IL-10 in well-nourished infected children (*WNI*), first-degree malnourished children (*MN1*), second-degree malnourished children (*MN2*), and third degree-malnourished children (*MN3*). Determinations were made in triplicate, and the *points* in the graph represent their average. Significant differences were always observed between *WNI* and all *MN* groups ( $P < 0.004$  *WNI* vs. *MN1*;  $P < 0.05$  *WNI* vs. *MN2*;  $P < 0.0008$  *WNI* vs. *MN3*). Differences were observed in *MN1* in comparison with *MN2* ( $P < 0.05$ ) and *MN3* ( $P < 0.0034$ ) children

showed diminished production of IL-2 in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells from the malnourished with respect to the well-nourished infected children.

An increase in susceptibility to infections, accompanied by diminished IFN- $\gamma$ , has been observed in mice deficient for the production of IL-2 [23]; in addition, it has been observed that the diminution of IL-2 synthesis can cause anergy, or failure to proliferate in the presence of an antigen, in CD8<sup>+</sup> T cells [24]. Diminished IL-2 synthesis also causes loss of the capacity of CD8<sup>+</sup> T cells to produce autocrine IL-2 after being stimulated [24]. These results in relation to the IL-2 production are coincidental with the gene expression data obtained in the present study, and both show clearly that IL-2 diminishes in undernourished organisms, and this fact may be related to their impaired immune response.

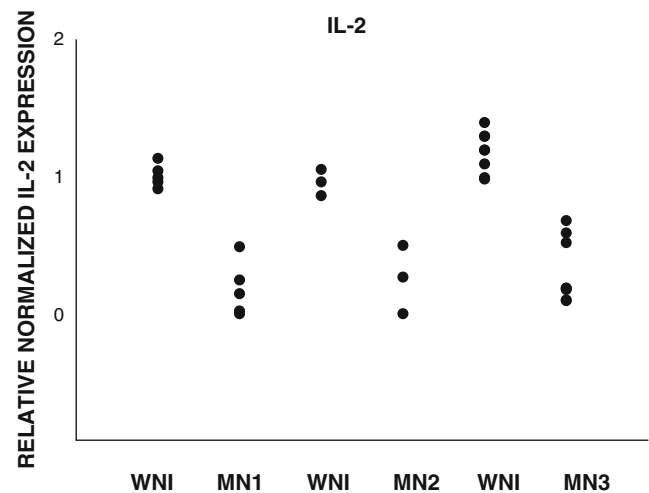
Mengheri et al. [25] observed a diminished production of IFN- $\gamma$  in lymphocytes from rats fed a diet lacking in protein, and Rodriguez et al. [22], in their study using a flow cytometry, also recently demonstrated a reduction in the production of IFN- $\gamma$  in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of malnourished children.

Reduction in IFN- $\gamma$  synthesis causes immunosuppression that is related to an increased susceptibility to bacterial or parasitic infections [26]. In addition, IL-2 stimulates the production of IFN- $\gamma$  [25]; therefore, the decreased expression of IL-2 observed in malnourished children in this study could be associated with the diminished expression of the IFN- $\gamma$  gene. IFN- $\gamma$  is an important factor that participates

in the activation process of macrophages, which are important cells during bacterial and viral infections. The reduction in IFN- $\gamma$  production could contribute to the decrease in the capacity of activation observed in these cells in undernourished subjects [22]. The decreased IFN- $\gamma$  gene expression observed in this study may contribute to explain the deterioration of the immunological cellular response observed in malnourished children.

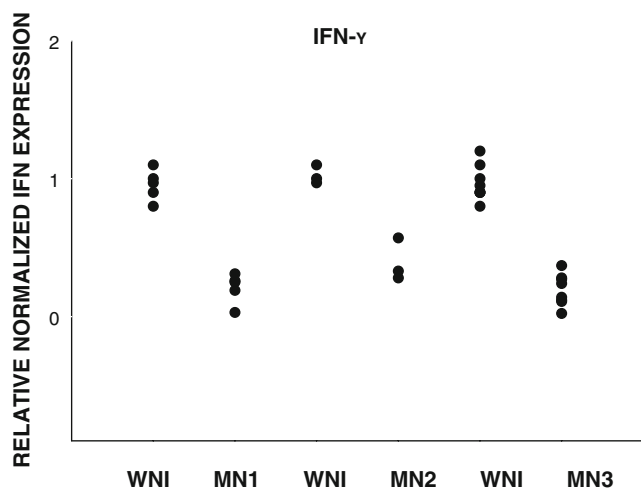
TNF- $\alpha$  induces anorexia and cachexia in humans and in animal models [27]; for this reason, the higher expression of TNF- $\alpha$  we observed in malnourished children may be related to an aggravation of their nutritional status. Currently, production of TNF- $\alpha$  in malnourished children has not been studied, and we are currently analyzing the production of this cytokine in lymphocytes of malnourished children by flow cytometry.

In terms of IL-4, the results of this research showed a significant increase in the expression of this gene in *MN* children in comparison with the *WNI* group. These results correlated with those obtained by Rodriguez et al. [22], who reported an increased production of IL-4 in lymphocytes of malnourished children. Some interesting data show that IL-4 inhibits the expression of CD25 antigen, a chain of the receptor for IL-2. Consequently, this event may affect the response of lymphocytes to IL-2 [28]. It has been observed that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were decreased in the presence of IL-4 [22]; in malnourished children, the higher production of IL-4 may explain the decreased proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells observed previously [22].



**Fig. 4** Normalized relative evaluation of mRNA expression by real-time PCR for IL-2 in well-nourished infected children (*WNI*), first-degree malnourished children (*MN1*), second-degree malnourished children (*MN2*), and third-degree malnourished children (*MN3*). Determinations were made in triplicate, and the *points* in the graph represent their average. Significant differences were always observed between *WNI* and all *MN* groups ( $P < 0.004$  *WNI* vs. *MN1*;  $P < 0.05$  *WNI* vs. *MN2*;  $P < 0.0008$  *WNI* vs. *MN3*)





**Fig. 5** Normalized relative evaluation of mRNA expression by real-time PCR for IFN- $\gamma$  in well-nourished infected children (*WNI*), first-degree malnourished children (*MN1*), second-degree malnourished children (*MN2*), and third-degree malnourished children (*MN3*). Determinations were made in triplicate, and the *points* in the graph represent their average. Significant differences were always observed between WNI and all MN groups ( $P < 0.004$  WNI vs. MN1;  $P < 0.05$  WNI vs. MN2;  $P < 0.0008$  WNI vs. MN3)

In terms of evaluating the production of IL-6, there are controversial reports. A study by Malavé et al. [29] showed a higher concentration of IL-6 in cultures of mononuclear cells obtained from peripheral blood of malnourished children. Later, Amesty et al. [19] and Dülger et al. [20] reported the same result. Nevertheless, Vethencourt et al. [30] found that malnourished and well-nourished children have the same levels of IL-6 production. In contrast, Doherty et al. [31] reported lower levels of this cytokine in vitro for malnourished children. This last result agrees with the data obtained in the present investigation, where a significant decrease in IL-6 gene expression was observed in malnourished children. It is important to indicate that the differences between the results reported by others concerning IL-6 production and those found in this study could be because of the type of malnutrition studied, as some studies used only children with first- or second-degree malnutrition.

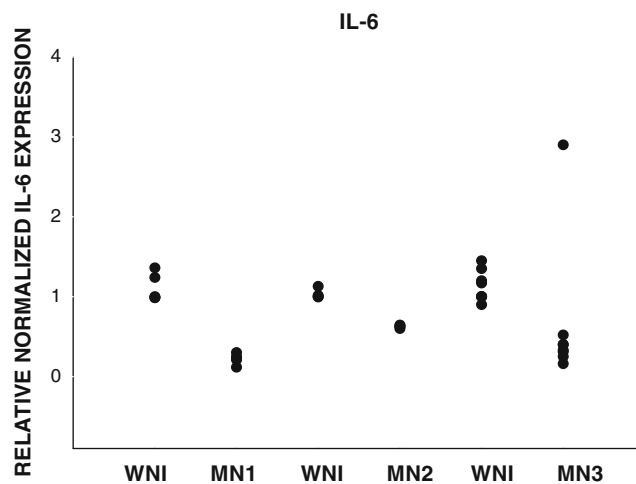
The inactivation of the IL-6 gene in knock-out mice does not cause any serious physiological abnormality, but these mice are not able to control infections of intracellular bacteria and, after acute phase inflammatory response, both serious tissue damage and a severe infection were observed; this suggests that IL-6 deficiency is related to a reduction of hematopoietic precursor cells [32].

The results of the present investigation showed a significant increase in the gene expression of IL-10 in MN children in comparison with the WNI group. Importantly, this finding may be related to the previously observed increase in the percentages of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells producing IL-10 in malnourished children [22]. The type 2 cytokine IL-10 is widely regarded as a suppressor factor for type 1 responses

[33], and the higher level of this cytokine observed in malnourished children may explain the diminution in their production of IL-2 and IFN- $\gamma$ . Previously, de Waal Malefyt et al. [34] reported that IL-10 has a direct effect on T CD4<sup>+</sup> cells, suppressing the secretion of IL-2, IFN- $\gamma$ , and other cytokines.

Although the mechanisms by which malnutrition increases the expression of TNF- $\alpha$ , IL-4, and IL-10 and decreases the expression of IL-2, IFN- $\gamma$ , and IL-6 are not known, this fact is clearly related to an imbalance in the type 1/type 2 immune response, and it could be related to the impaired immunological function observed in malnourished children. TNF and IL-10 expression differences observed between the groups of malnourished children required further studies. It is interesting to note that the results obtained in the present study are in agreement with those obtained previously by Rodríguez et al. [22], and both studies were done using Mexican children and showed a decreased level of both gene expression and production of IL-2 and IFN- $\gamma$  and an increase of both expression and production of IL-4 and IL-10. This means that levels of mRNA are related to similar levels of protein synthesis; that is to say low levels of transcription correlate with low levels of translation and higher levels of transcription correlate with higher levels of translation.

In conclusion, the changes observed in the relative expression of the genes studied could be closely related to the deficient immunological response that has been observed in malnourished children. The diminished expression of two genes related with the type 1 response (IL-2 and IFN- $\gamma$ ) may explain the impaired cellular response observed in malnourished children. The increase in the relative expression of two



**Fig. 6** Normalized relative evaluation of mRNA expression by real-time PCR for IL-6 in well-nourished infected children (*WNI*), first-degree malnourished children (*MN1*), second-degree malnourished children (*MN2*), and third-degree malnourished children (*MN3*). Determinations were made in triplicate, and the *points* in the graph represent their average. Significant differences were always observed between WNI and all MN groups ( $P < 0.004$  WNI vs. MN1;  $P < 0.05$  WNI vs. MN2;  $P < 0.0209$  WNI vs. MN3)

type 2 cytokines (IL-4 and IL-10), which both act as suppressor factors for the type 1 response, could increase the deficiencies in the immunological response in malnourished children. The results suggest that alterations in the balance of type 1/type 2 immune responses exist in malnourished children, and this could explain why the immunological system of the malnourished children is incapable of eradicating infections. The results obtained in the present study try to contribute to the understanding of the immunological alterations associated with malnutrition.

**Acknowledgments** This study was partially supported by PROMEP (grant UAM-I-CA-12), by CONACyT Mexico (grant 176371 for Haydeé González Martínez), and by Fondo de Formación de Doctores of CONACyT México (Haydeé González Martínez).

## References

- Fernández O, Rivera J, Shamah T, Villalpando-Hernández S. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006.
- Tupasi T, Velmonte M, Sanvictores M, Abraham L, De Leon L, Tan S, et al. Determinants of morbidity and mortality due to acute respiratory infections: implications for intervention. *J Infect Dis*. 1988;4:615–23.
- Pollán J. Nutrition and immunity. *Rev Esp Pediatr*. 2001;57:58–74.
- Nájera O, González C, Cortés E, Toledo G, Ortiz R. Effector lymphocyte in well-nourished and malnourished infected children. *Clin Exp Biol*. 2007;148:501–6.
- Hunter C, Reiner S. Cytokines and T cells in host defense. *Curr Opin Immunol*. 2000;12:413–8.
- Jankovic D, Zhugong L, Gause WC. Th1- and Th2 -cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol*. 2001;22:450–7.
- Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem*. 1990;59:783–836.
- Liles W, Van Voorhis C. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J Infect Dis*. 1995;172:1573–80.
- Kühne B, Oschmann P. Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. *Biotechniques*. 2002;33:1078–89.
- Cho M, Kim Y, Lee M, Kim S. The effect of cysteine on the altered expression of class a and m glutathione *S*-transferase genes in the rat liver during protein-calorie malnutrition. *Biochim Biophys. Acta* 2000;1502:235–46.
- Cho M, Kim Y, Lee M, Kim S. Prevention of c-Jun/activator protein-1 activation and microsomal epoxide hydrolase induction in the rat liver by cysteine during protein-calorie malnutrition. *Biochem Pharmacol*. 2002;61:15–24.
- Lee A, Kang K, Kim Y, Cho M, Lee M, Shim C, et al. Identification of genes enhanced by protein-calorie malnutrition by essential display protein-calorie malnutrition polymerase chain reaction (expression of fibrinogen beta chain). *Cell Biochem*. 2002;231:163–71.
- González C, González H, Rodríguez L, Cortés E, Nájera O, Hernández-Hernández F, et al. Differential gene expression in lymphocytes from malnourished children. *Cell Biol Int*. 2006;30:610–4.
- Ramos-Galván R. Somatometría pediátrica. *Arch Inv Méd*. 1976;6:5.
- Chandra R. 1990 McCollum Award Lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr*. 1991;53:1087–101.
- Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol*. 1991;113:981–6.
- Karulin A, Hesse M, Tary-Lehmann M, Lehmann P. Single-cytokine-producing CD4 memory cells predominate in type 1 and type 2 immunity. *J Immunol*. 2000;1164:1862–72.
- Lofty O, Selenh W, Barbari M. Study of some changes of cell-mediated immunity in protein energy malnutrition. *J Egypt Soc Parasitol*. 1998;28:413–28.
- Amesty V, Pereira N, García M, Núñez J, Cayama N, Villadiego N. Niveles séricos de citocinas proinflamatorias en niños con diferentes grados de desnutrición. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2003;60:14–21.
- Dülger H, Arik M, Ramazan M, Tarakcioglu H, Noyan M, Balahoroglu R. Pro-inflammatory cytokines in Turkish children with protein-energy malnutrition. *Mediators Inflamm*. 2002;11:363–5.
- McMurray D, Mintzer C, Bartow R, Parr R. Dietary protein deficiency and *Mycobacterium bovis* BCG affect interleukin-2 activity in experimental pulmonary tuberculosis. *Infect Immunol*. 1989;57:2606–11.
- Rodríguez L, González C, Flores L, Graniel J, Ortiz R. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12:502–7.
- Ameho C, Adjei A, Yamauchi K, Harrison E, Kulkarni A, Sato S, et al. Modulation of age-related changes in immune functions of protein-deficient senescence-accelerated mice by dietary nucleoside-nucleotide mixture supplementation. *Br J Nutr*. 1997;77:795–804.
- Malek T. T helper cell, IL-2 and the generation of cytotoxic T cell responses. *Trends Immunol*. 2002;23:465–7.
- Mengheri E, Nobili F, Crocchioni G, Lewis JA. Protein starvation impairs the ability of activated lymphocytes to produce interferon-gamma. *J Interferon Res*. 1992;12:17–21.
- Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol*. 2000;12:419–24.
- Tisdale M. Cancer, anorexia and cachexia. *Nutrition*. 2001;17:438–42.
- Martínez O, Gibbons R, Garavoy M, Aronson F. IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2-dependent proliferation of human T cells. *J Immunol*. 1990;44:2211–5.
- Malavé I, Vethercourt M, Chacón R, Quiñones D, Rebrij C, Bolívar G. 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*. 1998;42:266–73.
- Vethencourt M, Pirela M, Sousa P, Acuña M, Cordero R, Baute L. Correlacion entre prealbúmina, proteína C reactiva e interleuquina-6 en niños desnutridos con o sin infección clínica. *Arch Lat Nutr*. 1994;44:93–5.
- Doherty J, Golden M, Remick D, Griffin G. Production of interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in vitro is reduced in whole blood of severely malnourished children. *Clin Sci*. 1994;83:347–51.
- Kammüller M, Ryffel B. Extrapolation of experimental safety data to humans: the interleukin-6 case. *Clin Immunol Immunopathol*. 2000;83:15–7.
- Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol*. 1991;148:2154–8.
- de Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo M, Spits H, de Vries Jan E. Interleukin-10. *Curr Opin Immunol*. 1993;4:314–20.





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA


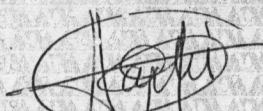
No. 00026

Matricula: 203180322

EVALUACION DE LA EXPRESION GENICA DE CITOCINAS RELACIONADAS CON EL BALANCE T1/T2 EN NIÑOS CON DESNUTRICION CALORICO PROTEICA

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 22 del mes de julio del año 2010 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. ORALIA NAJERA MEDINA
- DR. RUBEN DARIO DE JESUS MARTINEZ PEREZ
- DRA. LEONOR RODRIGUEZ CRUZ
- DR. DAVID CRUZ ROBLES

HAYDEE GONZALEZ MARTINEZ  
ALUMNA

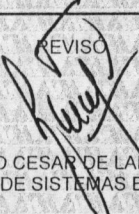
Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: HAYDEE GONZALEZ MARTINEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

REVISÓ

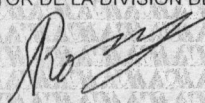


LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

**APROBADO**

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



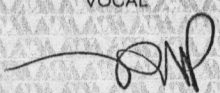
DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTA



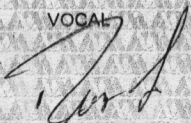
DRA. ORALIA NAJERA MEDINA

VOCAL



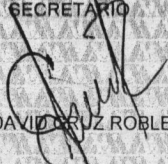
DR. RUBEN DARIO DE JESUS MARTINEZ PEREZ

VOCAL



DRA. LEONOR RODRIGUEZ CRUZ

SECRETARIO



DR. DAVID CRUZ ROBLES