

## Expresión génica de interleucina 1 en la deficiencia de proteínas y vitamina A

*Vivian Sánchez Alvarez, Manuel Hernández Triana, Mario Abreu Peñate, Ada de las Cagigas Reig, Miguel Tam Hurtado, José Rebozo Pérez, Miriam Noa Puig, José Arias Verdé, Rebeca Fernández Carriera, Soraya González Calderín, Antonio Sigarroa González*

Departamento de Bioquímica y Fisiología Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos-Cuba

**RESUMEN.** Tomando como referencia los niveles de ingestión de proteínas y vitamina A informados en los estudios de la población cubana durante la epidemia de neuropatía de 1993, se ejecutó un biomodelo en ratas, con el objetivo de evaluar la incidencia de estos niveles sobre algunos indicadores del estado nutricional y de la respuesta inmune. Para ello se ensayaron 4 dietas: control, deficiente en proteínas, deficiente en vitamina A y deficiente en proteínas y vitamina A. La Interleucina 1 (IL-1) se evaluó a partir de su expresión en las placas de Peyer y los resultados obtenidos se relacionaron con indicadores del estado nutricional como peso, ingesta, recambio proteico, proteínas plasmáticas y vitamina A, con indicadores inmunológicos (conteo celular y complemento hemolítico total) y con el estudio histológico realizado en timo, bazo e hígado. La deficiencia de proteínas disminuyó la expresión génica de IL-1, la cual se asoció con lesiones degenerativas y de atrofia en los órganos estudiados. La deficiencia de proteínas y vitamina A provocó una estimulación de la expresión génica de IL-1, asociada además con indicadores sensibles del estado inflamatorio, que pudiera ser el resultado de una movilización deficiente de retinol hacia los tejidos. Los resultados obtenidos en el biomodelo abren la posibilidad de utilización de las citocinas en la detección de afectaciones subclínicas del sistema inmune provocadas por deficiencias nutricionales.

**Palabras clave:** Citocinas, interleucina 1, malnutrición proteico-energética, hipovitaminosis A, inflamación.

**SUMMARY.** Gene expression of Interleukin 1 in vitamin A and protein deficiency. The influence of low levels of protein and vitamin A on indicators of the immune response was assayed in rats. The levels of protein and vitamin A intake of the Cuban population affected by epidemic neuropathy in 1993 was reproduced in 4 diets: control, protein deficiency (DP), vitamin A deficiency (DA), protein and vitamin A deficiency (DAP). The Peyer's patches evaluated the Interleukin 1 expression gene and was related with corporal weight, food intake, serum protein, vitamin A, immunology indicators and histology evaluation (spleen, thymus and liver). Protein deficiency generated a significant decrease of the expression gene of Interleukin 1. Atrophy signs in lymphoid tissues and morphologic changes in the liver were associated with the dietary protein utilization. Protein and vitamin A deficiency generated significant stimulation of the Interleukin 1 expression gene with increase of the level of the inflammatory state indicators as serum  $\alpha$  protein, total complement and neutrophils. This stimulation could be generated by a deficient retinol mobilization to tissues. These results support the hypothesis of the function of cytokines as mediators of subclinical symptoms of the immune system during the nutritional affectations.

**Keywords:** Cytokines, Interleukin 1, protein energetic malnutrition, vitamin A deficiency, inflammatory state.

### INTRODUCCION

La malnutrición por defecto es la causa más frecuente de inmunodeficiencias en el mundo actual. Dentro de las deficiencias nutricionales sobresalen la Malnutrición Proteico-Energética (MPE) por defecto y la hipovitaminosis A (1,2). La coincidencia de ambas, agudiza enfermedades crónicas transmisibles y no transmisibles (3).

La MPE es considerada la causa más frecuente de afectación del sistema inmune y la deficiencia de vitamina A se ha relacionado con procesos inflamatorios previos a enfermedades infecciosas. Ambas deficiencias afectan mayormente la inmunidad mediada por células, y causan

atrofia de los tejidos linfoides primarios y periféricos, fundamentalmente los regiones de linfocitos T. Los retinoides modulan la proliferación y diferenciación celular, de células epiteliales y el descubrimiento de sus receptores nucleares ha puesto en evidencia su papel inmunomodulador sobre células del sistema inmune, especializadas y más recientemente sobre células mononucleares, como típicos mensajeros intracelulares de los mecanismos de señales (4,5).

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 inmune y otras células especializadas en tejidos, a través de las cuales regulan y

activan la respuesta inmune aferente y eferente (6,7). Recientemente se ha reconocido el término malnutrición 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 (8). Este término se ha asociado particularmente con las citocinas proinflamatorias (Interleucina 1, Interleucina 6 y Factor de Necrosis Tumoral) (9,10), que por su actividad pleiotrópica y reguladora actúan de forma intensa y duradera ocasionando un desgaste severo al organismo, alterando el metabolismo y con ello, el estado nutricional (11). Los aspectos relacionados con la respuesta inflamatoria requieren de un buen control que garantice el proceso de homeostasis que permita la continuidad de las funciones vitales del huésped (12).

Estudios clínicos y modelos experimentales han descrito afectaciones en la síntesis y capacidad de respuesta de Interleucina 1 (IL-1) en la MPE (13-16). Muñoz y col. (17) describieron una disminución de la producción de Factor de Necrosis Tumoral (FNT) en niños marásmicos y Schattner y col. (18) observaron esta misma afectación en jóvenes con anorexia nerviosa.

Investigaciones recientes han mostrado que la deficiencia de vitamina A sólo incide negativamente en la liberación de citocinas tipo 1 (Interferón  $\gamma$ , Interleucina 2) a través de la inhibición de la actividad de la Protein Kinasa C (19).

A partir de 1989, la disponibilidad de alimentos y la situación alimentaria de Cuba generó afectaciones del estado nutricional de la población con relación a varios nutrientes, entre ellos proteínas y vitamina A. Los resultados de los estudios realizados durante la epidemia de neuropatía epidémica en 1993 reflejaron niveles de ingestión de estos nutrientes inferiores al 50% de las recomendaciones nutricionales vigentes en el país (20).

Fue objetivo de este trabajo, estudiar los niveles de expresión génica de Interleucina 1 y relacionarlos con indicadores del estado nutricional y de la respuesta inmune en un biomodelo diseñado con niveles de ingestión de proteínas y vitamina A semejantes a los encontrados en la población cubana durante la neuropatía epidémica.

## MATERIALES Y METODOS

Para la realización del biomodelo se diseñaron y prepararon las dietas tomando una concentración de proteínas en las dietas deficientes inferior a la recomendación de la AOAC (21) (3%) y en el caso de la vitamina A se seleccionaron como referencia los niveles de ingestión registrados en el estudio de casos y controles de neuropatía

epidémica en la Isla de la Juventud por Gay y col. (20), los cuales representan sólo la tercera parte de los niveles requeridos para este indicador. Las dietas fueron preparadas isocalóricas, de acuerdo a las recomendaciones de la AOAC (21) (Tabla 1).

TABLA 1  
Resultados de la composición centesimal  
y de vitamina A de las dietas experimentales

Composición	Dieta Control	Dieta DP	Dieta DA	Dieta DAP
Proteínas (%) (21)	17,03	3,23	16,85	3,31
Grasas (%) (21)	7,8	8,02	8,04	7,94
Humedad (%) (22)	11,4	12,4	11,59	11,55
Cenizas (%) (21)	4,48	3,07	4,32	3,64
Fibra dietética (%) (21)	6,2	6,9	5,7	6,0
Carbohidratos (%)*	53,07	66,38	53,5	67,56
Energía bruta (23) kcal/g	4,3	4,1	4,4	4,2
Energía metabolizable (kcal/g)	3,70	3,68	3,73	3,73
Vitamina A (UI/g) (24)	20,4	20,2	7,2	8,6

\* Los carbohidratos se calcularon por diferencia del resto de los componentes determinados según las recomendaciones vigentes

DIETA DP- Dieta deficiente en proteínas

DIETA DA- Dieta deficiente en vitamina A

DIETA DAP- Dieta deficiente en proteínas y vitamina A

El diseño del biomodelo se realizó de acuerdo a las indicaciones de la Universidad de las Naciones Unidas (UNU) para las investigaciones con animales de laboratorio. Se utilizaron ratas Sprague Dowley macho, en desarrollo, de un peso corporal inicial de  $241 \pm 11$  g obtenidas del Centro para Animales de Laboratorio (CENPALAB) de un mismo día de parición, procedentes de una colonia bien nutrida y bajo estricta supervisión veterinaria. Los animales fueron distribuidos en 7 grupos experimentales: Control (C), Deficiente en Proteínas (DP), Deficiente en Vitamina A (DA), Deficiente de Proteínas y Vitamina A (DAP), Alimentación Pareada de Deficiente en Proteínas (PP), Alimentación Pareada de Deficiente en Vitamina A (PA), Alimentación Pareada de Deficiente en Proteínas y Vitamina A (PAP).

Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas individuales en un ambiente controlado de temperatura (23-26 °C), con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y con una humedad relativa controlada entre 50-60%. Bajo estas condiciones fueron sometidas a un proceso de adaptación durante 1 mes antes de iniciar el biomodelo.

El peso de los animales fue controlado al inicio, 2 veces por semana y al inicio y final del balance de nitrógeno. Los grupos de Alimentación Pareada consumieron la dieta

utilizada para el grupo control, pero en las cantidades consumidas por los grupos tratados, teniendo en cuenta las posibles diferencias de ingestión en los grupos con dietas deficientes.

El agua se le suministró ad libitum y la dieta ingerida fue controlada y registrada diariamente durante 28 días. El último día de ensayo, las ratas fueron desangradas por vía femoral, después de 12 horas de ayuno, para la extracción de las muestras biológicas que se describen a continuación.

Para evaluar la expresión de Interleucina 1 $\beta$  a partir de linfocitos de placas de Peyer se extrajo el intestino de las ratas previamente anestesiadas en el momento del sacrificio según el método descrito por Mengheri y col. (25) y conservadas a -70°C hasta el momento de ser procesadas. Las muestras fueron procesadas según Chomozinski y Sacchi (26), con el objetivo de lograr la extracción del ARN. Posteriormente fueron leídas a 260 nm en Espectrofotómetro UNICAM para ajustar su concentración a 1  $\mu$ g/ $\mu$ L y sometidas a un proceso de reverso transcripción de acuerdo a la metodología descrita (27). La reverso transcriptasa utilizada fue obtenida del virus de la leucemia murina Moloney.

La amplificación de los fragmentos de ARNm transcritos se realizó en Minicycler (TM) (MJ Research) y se incubó a 96°C por 1 minuto (desnaturalización), 30 ciclos a 63°C por 1 minuto (hibridización) y 30 ciclos a 73°C por 1 minuto y 30 segundos (polimerización). Finalmente se colocaron a 4°C para su posterior evaluación y cuantificación. Como control interno se utilizó la amplificación de un fragmento de 702 pb del gen que codifica para la enzima Gliceroldehído 3' fosfato deshidrogenasa (GADPH) en ratas. La secuencia de su iniciador es 5'-GCC ATC AAC GAC CCC TTC AT-3'<sub>(S)</sub> y 5'-CGC CTG CTT CAC CAC CTT CT-3'<sub>(A)</sub> (28). La secuencia del iniciador para Interleucina 1 $\beta$  de rata es 5'-GAA GCT GTC GCA GCT ACC TAT GTC T-3'<sub>(S)</sub> y 5'-CTC TGC TTG AGA GGT GCT GAT GTA C-3'<sub>(A)</sub> (25). Para detectar posibles contaminaciones se utilizó como control negativo, una muestra sin ARN. Las muestras amplificadas fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en tampón Tris-Borato, pH=8. Las bandas de interés fueron visualizadas utilizando tinción con plata (Promega). En cada corrida se colocó un patrón de peso molecular (Promega) como referencia de las bandas visualizadas. Este patrón utilizado tiene un rango entre 1500 y 100 pares de bases. El análisis densitométrico de las bandas permitió una cuantificación relativa de la expresión génica de la citocina en estudio, a través del cálculo individual de la relación entre la banda relacionada correspondiente a la Interleucina 1 y su control interno (GADPH). Para lograr este objetivo la lectura de los geles se realizó en un sistema BIO-RAD GS-700 con el programa Imaging Molecular Analysis.

Muestras de sangre fueron utilizadas para realizar el estudio hematológico (29) que incluyó hemoglobina, hematocrito y conteo leucocítico total y diferencial. Los sueros se conservaron a -70°C y fueron utilizados para las determinaciones de: Complemento Hemolítico Total (CH50) por adaptación de la microtécnica del Manual de Laboratorio de Diagnóstico Inmunológico (30) y su automatización en el equipo SUMA pR-521; proteínas totales realizadas por modificación del método Biuret (31) que permitió también automatización en el SUMA pR-521 a través de un micrométodo previamente estandarizado; electroforesis de proteínas en acetato de celulosa (32); y vitamina A por cromatografía líquida de alta resolución según Thurham y col (33).

En el momento del sacrificio fueron extraídos el timo, el bazo y el hígado de cada rata y se pesaron para determinar la relación de cada órgano analizado con el peso corporal del animal (peso relativo). Para la evaluación microscópica se tomaron muestras de los tejidos a evaluar de todos los animales en estudio, las cuales fueron fijadas en formaldehído tamponado al 10%, incluidos en parafina, seccionados a 5  $\mu$ m y coloreadas con hematoxilina y eosina para luego ser observadas en un microscopio de luz Axiolab (Carl Zeiss).

Todos los indicadores son el resultado del procesamiento de las muestras biológicas por duplicado o triplicado.

El análisis estadístico se realizó a través del programa Tonystat diseñado en la Facultad de Biología, Universidad de la Habana (34). De ellos se obtuvieron medias y desviaciones estándar. Las diferencias encontradas se obtuvieron por la prueba de Kruskal-Wallis y las intergrupos a través de la prueba de Student-Newman-Keuls.

El indicador incremento de peso fue evaluado sometiendo los valores a una transformación previa, teniendo en cuenta que su comportamiento en algunos grupos era decreciente y por tanto sus valores negativos. Se correlacionó este indicador con los pesos iniciales y se comprobó que su distribución era normal y las varianzas de los grupos, homogénea. Con el objetivo de eliminar las posibles diferencias en el peso inicial en los tratamientos realizados se realizó un Análisis de Covarianza de clasificación simple que permitió trabajar con las medias ajustadas y una prueba de comparación múltiple de Duncan con el objetivo de detectar las diferencias intergrupos para este indicador.

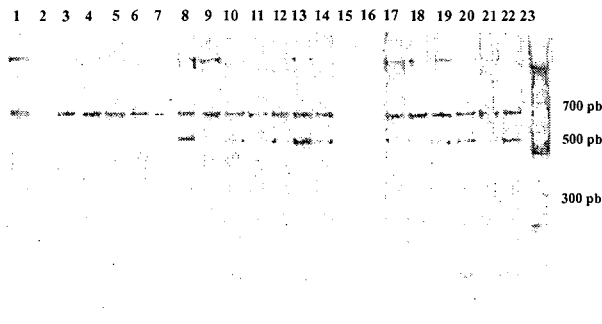
El comportamiento de los grupos en el estudio histológico se evaluó analizando los resultados por la prueba G para tablas de contingencia R x C y en los casos de tablas (2x2) fue utilizada una prueba exacta de Fisher para comprobar las diferencias obtenidas.

El nivel de significación utilizado fue del 95%, con excepción de los indicadores albúmina la fracción  $\alpha$  y vitamina A, en los cuales se obtuvo un nivel de significación del 99%.

## RESULTADOS

La electroforesis visualiza las bandas correspondientes a la expresión génica de GADPH (banda superior) y de la Interleucina 1 (banda inferior) (grupos Control, grupo DP y grupo PP) (Figura 1).

FIGURA 1  
Electroforesis en gel de poliacrilamida para fragmentos amplificados de Interleucina 1



Pocillo 1-7 Grupo DP  
Pocillo 8-14 Grupo PP  
Pocillo 15-16 Control negativo  
Pocillo 17-22 Grupo control  
Pocillo 23 Marcador de peso molecular

La expresión génica de Interleucina 1 se muestra mediante el cálculo de la relación de los resultados densitométricos obtenidos con relación a la banda del control interno (Tabla 2). Es importante destacar que el grupo DP mostró una disminución de su expresión y el grupo DAP por el contrario, la incrementó, siendo en ambos casos de forma significativa.

TABLA 2  
Resultados del análisis densitométrico de la expresión génica de interleucina 1 realizada por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa ( $X \pm DS$ )

Grupos (n=7)	Indice
Control (n=6)	0,77 $\pm$ 0,19b
DP	0,57 $\pm$ 0,08c
DA	0,80 $\pm$ 0,16 b
DAP	1,07 $\pm$ 0,06 a
PP	0,76 $\pm$ 0,14 b
PA	0,81 $\pm$ 0,10 b
PAP	0,78 $\pm$ 0,18 b

Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente; las letras se encuentran ordenadas de forma decreciente. Las diferencias encontradas son para  $p < 0,05$ .

Los niveles de ingestión de los grupos DP y DAP mostraron una disminución significativa, que se correspondió con sus respectivos de alimentación pareada. El grupo DA no mostró alteraciones en sus ingestas promedio (Tabla 3).

TABLA 3  
Niveles de ingestión diaria corporal de dieta e incremento de peso en ratas alimentadas durante 28 días con dietas deficientes en proteínas y vitamina A ( $X \pm DS$ )

Grupos (n=7)	Dieta ingerida (g)	Incremento de peso (g)
Control (n=6)	14,38 $\pm$ 0,88a	93,0 $\pm$ 14,5 a b
DP	11,67 $\pm$ 0,96b	-24,5 $\pm$ 4,38 c
DA	14,74 $\pm$ 0,24 a	102,1 $\pm$ 5,75 a
DAP	10,31 $\pm$ 1,33 c	-45,3 $\pm$ 7,45 f
PP	11,79 $\pm$ 1,13 b	48,9 $\pm$ 7,71 c
PA	14,72 $\pm$ 0,25 a	92,9 $\pm$ 11,09 b
PAP	9,86 $\pm$ 1,80 c	39,2 $\pm$ 4,55 d

Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente; las letras se encuentran ordenadas de forma decreciente. Las diferencias encontradas son para  $p < 0,05$ .

En el caso de los grupos DP y DAP existió una relación entre la disminución de la ingestión y el indicador incremento de peso, lo cual fue más evidente en el grupo DAP. Los grupos de alimentación pareada PP y PAP con una ingestión similar a los grupos tratados no mostraron la disminución de peso manifiesta en los grupos DP y DAP, pero su incremento de peso no fue comparable con el grupo control. El grupo DA mostró un comportamiento del peso corporal comparable con el grupo control y con su grupo de alimentación pareada, por lo que la dieta deficiente en vitamina A en los niveles ensayados no provocó afectaciones en el peso corporal. Estos resultados aparecen en la Tabla 3.

Los tejidos evaluados no mostraron macroalteraciones cuando se evaluaron sus pesos relativos, con excepción de los bazo en el grupo DAP, que mostraron diferencias significativas con relación al grupo control y a su grupo de alimentación pareada (PAP). Sin embargo, los resultados de la evaluación microscópica realizada en estos tejidos indican lesiones degenerativas de tipo ligera en hígado, fundamentalmente metamorfosis grasa en los grupos DP y DAP. Es de interés señalar además que en el caso de los órganos linfoides evaluados se observaron señales de atrofia cortical en el bazo y pérdida de células linfoides en bazo y timo, mayormente en el grupo DAP. Las alteraciones microscópicas detectadas en estos tejidos no indicaron afectaciones severas en ninguno de los grupos evaluados.

TABLA 4  
Indicadores bioquímicos relacionados con el metabolismo y niveles de vitamina A sérica en ratas con dietas deficientes en proteínas y vitamina A ( $X \pm DS$ )

Grupos	Proteínas totales (g/L)	Albumina (%)	$\alpha$ (%)	Vitamina A ( $\mu\text{g/mL}$ )
Control	69,26 $\pm$ 5,46 a n=5	52,22 $\pm$ 2,83 a n=5	22,56 $\pm$ 0,60 c n=5	11,4 $\pm$ 0,67b n=5
DP	56,86 $\pm$ 2,41b n=5	46,88 $\pm$ 1,32 b n=5	24,04 $\pm$ 1,73 b n=5	11,6 $\pm$ 0,64 b n=5
DA	66,11 $\pm$ 4,50 b n=7	55,80 $\pm$ 2,99 a n=5	26,16 $\pm$ 2,90 a n=5	13,1 $\pm$ 0,50 a n=5
DAP	58,74 $\pm$ 6,98 b n=5	47,22 $\pm$ 2,52 b n=5	25,54 $\pm$ 1,23 a n=5	8,8 $\pm$ 0,94 c n=4
PP	65,0 $\pm$ 5,15 b n=5	51,64 $\pm$ 5,74 a n=7	23,37 $\pm$ 3,51 c n=7	11,6 $\pm$ 1,6 b n=7
PA	63,22 $\pm$ 6,51b n=6	53,9 $\pm$ 3,81 a n=7	22,17 $\pm$ 3,96 c n=7	11,9 $\pm$ 0,97 b n=6
PAP	75,85 $\pm$ 8,41a n=6	54,36 $\pm$ 1,40 a n=7	22,73 $\pm$ 1,22 c n=7	10,9 $\pm$ 1,44 b n=6

Las letras se encuentran ordenadas de forma decreciente; letras diferentes en la misma columna difieren significativamente. Los indicadores proteínas totales, albúmina, fracción proteica  $\alpha$  y vitamina A se evaluaron para  $p < 0,01$ .

Las proteínas totales manifestaron una disminución significativa en los grupos DP y DAP con relación al grupo control y sólo en el caso del grupo DAP significativamente diferente a su grupo de alimentación pareada, lo que pudiera indicar que las proteínas séricas totales se afectan por la combinación de ambas deficiencias (Tabla 4). La albúmina resultó ser un indicador más sensible en el caso de los grupos tratados DP y DAP, pues mostró diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) al compararse con el grupo control y con los de alimentación pareada respectivamente. La fracción  $\alpha$  de las globulinas séricas mostró un incremento significativo en los grupos DP, DA y DAP con relación al control y a sus grupos de alimentación pareada; las fracciones  $\beta$  y  $\gamma$  no mostraron alteraciones en el modelo realizado. Los resultados obtenidos en las proteínas totales, la albúmina y la fracción  $\alpha$  se obtuvieron con un nivel de significación de 99%.

El grupo DA manifestó un incremento significativo de los niveles de vitamina A sérica, a pesar de estar expuesto a una dieta con deficiencia moderada de esta vitamina por 28 días. Sin embargo el grupo DAP que estuvo expuesto a ambas deficiencias disminuyó sus niveles circulantes de vitamina A.

La Tabla 5 contiene los resultados de indicadores relacionados con la respuesta inmune en los diferentes grupos de ensayo.

TABLA 5  
Indicadores inmunológicos evaluados en ratas alimentadas con dietas deficientes en proteínas y vitamina A ( $X \pm DS$ )

	Leucocitos ( $10^9/L$ )	Linfocitos (%)	PMN (%)	CH50 (U)
Control	6,560 $\pm$ 1,45 a n=5	0,788 $\pm$ 0,04 a n=5	0,178 $\pm$ 0,03 d n=5	17,8 $\pm$ 0,98 c n=5
DP	4,080 $\pm$ 1,07 d n=5	0,62 $\pm$ 0,03 c n=5	0,33 $\pm$ 0,02 c n=5	16,9 $\pm$ 0,73c n=4
DA	4,550 $\pm$ 0,37 d n=6	0,60 $\pm$ 0,03 c n=6	0,378 $\pm$ 0,02 b n=6	21,6 $\pm$ 1,73b n=5
DAP	3,040 $\pm$ 0,68 e n=5	0,514 $\pm$ 0,03 d n=5	0,458 $\pm$ 0,03 a n=5	23,7 $\pm$ 0,75a n=4
PP	5,400 $\pm$ 0,77 c n=6	0,758 $\pm$ 0,04 b n=6	0,202 $\pm$ 0,03 d n=6	19,7 $\pm$ 1,68c n=5
PA	5,633 $\pm$ 0,42 b n=6	0,737 $\pm$ 0,04 b n=6	0,225 $\pm$ 0,05 d n=6	19,8 $\pm$ 1,76c n=6
PAP	5,457 $\pm$ 0,73 c n=7	0,737 $\pm$ 0,04 b n=7	0,236 $\pm$ 0,03 d n=7	19,2 $\pm$ 2,60 c n=6

CH50 Complemento Hemolítico Total; PMN- Leucocitos Polimorfonucleares. Las letras se encuentran ordenadas de forma decreciente; letras diferentes en la misma columna difieren significativamente. Las diferencias encontradas son para  $p < 0,05$ .

El conteo total de leucocitos disminuyó significativamente en los tres grupos tratados, tanto con relación al control como con los grupos pareados, aunque sólo se encuentran en el rango patológico para ratas, los valores encontrados en el grupo DAP. Los grupos de alimentación pareada mostraron diferencias con el grupo control. En el caso del conteo diferencial se observó linfopenia y neutrofilia con variaciones significativas con el grupo control y con los de alimentación pareada, en los tres grupos tratados. Los valores del conteo de linfocitos en los grupos DP y DAP y los neutrófilos en el grupo DAP se encontraron fuera del rango normal para ratas con este tiempo de desarrollo. Los valores de hemoglobina y hematocrito no mostraron afectaciones significativas.

Los grupos DA y DAP mostraron un incremento significativo del CH50 con relación al control y a sus grupos de alimentación pareada, aspecto que puede relacionarse con otros indicadores de la inflamación expuestos anteriormente como los leucocitos polimorfonucleares y la fracción  $\alpha$  de las proteínas plasmáticas. Es válido destacar que el incremento del CH50 es mayor de forma significativa en el grupo DAP que en el grupo DP.

## DISCUSION

La deficiencia de proteínas en los niveles ensayados (grupo DP), provocó una disminución de la expresión génica de IL-1. La afectación de las citocinas y de la IL-1 en

particular frente a cambios en el suministro de macro y micronutrientes se ha descrito previamente (13-16).

Las placas de Peyer, como órganos linfoides periféricos son responsables de la respuesta inmune inicial gastrointestinal y se ha comprobado en biomodelos que la IL-1 juega un papel fundamental en el proceso de diferenciación de células intestinales (25), por lo que los resultados obtenidos en este grupo comprueban que la mucosa intestinal responde de forma sensible a las deficiencias de nutrientes, y de proteínas en particular.

Los resultados obtenidos con la IL-1 en el grupo DP se relacionan en primer lugar con una disminución significativa del peso corporal que a su vez se corresponde con una ingestión deficiente que repercute en indicadores del metabolismo y recambio proteico, así como, en las afectaciones encontradas de forma significativa en hígado, que indican el inicio de un proceso degenerativo típico de malnutrición proteico energética.

Se ha descrito la existencia de una relación entre malnutrición proteica y la inflamación que puede conducir a enfermedades crónicas a través de anorexia y catabolismo generados como consecuencia de la activación de indicadores de la inflamación (35), aspecto que no llega a ocurrir en el grupo DP.

Por otra parte, la deficiencia de vitamina A no provocó afectaciones en la expresión génica de IL-1, pero sin embargo, al combinarse ambas deficiencias en el grupo DAP se produjo una estimulación significativa de la expresión de IL-1 en las placas de Peyer.

La respuesta inflamatoria es el resultado de mecanismos de señales que son capaces de activar células y mediadores distribuidos ampliamente por el organismo (12). La IL-1 y otras citocinas proinflamatorias estimulan centros del hipotálamo y generan la activación de la respuesta inmune. Estos cambios requieren de proteínas, lípidos y micronutrientes en tejidos periféricos, que a su vez son la fuente necesaria para lograr el buen funcionamiento del sistema inmune y la recuperación de los tejidos como consecuencia de la acción de moléculas oxidantes (12,36). Para ello el organismo dispone de una reserva de aminoácidos libres que son los precursores para la síntesis de proteínas en el hígado, dentro de las cuales se encuentran las de transporte como la albúmina, apolipoproteínas, prealbúmina, proteínas de unión al retinol, muchas de las cuales son consideradas como proteínas de fase aguda y reparadoras de tejidos (37).

En el grupo DAP muestra el efecto negativo del consumo de dietas deficientes en proteínas sobre la ingestión de alimentos y su eficiencia de utilización en términos de crecimiento corporal, que si bien es cierto no se manifiesta de forma macroscópica en los tejidos evaluados, si se observa en señales ligeras de atrofia de timo y de bazo y en señales degenerativas del hígado como la metamorfosis grasa, que

se plantea puede tener como causa a la insuficiente movilización de triglicéridos hacia los tejidos por disminución en la síntesis de apolipoproteína B<sup>1</sup>. Estos aspectos pudieran relacionarse además con niveles disminuidos de proteínas séricas y de albúmina en particular, como se observa en el grupo DAP.

En condiciones fisiológicas, el hígado es responsable de sintetizar proteínas plasmáticas en concentraciones normales, pero en la respuesta inflamatoria su perfil anabólico se modifica para priorizar la síntesis de fase aguda (12), sin afectar los niveles de proteínas como hemoglobina que adquiere prioridad de acuerdo con sus funciones en el organismo (1), aspecto que se refleja en el grupo DAP, en el cual no mostró afectaciones significativas de la hemoglobina, pero si un incremento de la fracción  $\alpha$ , dentro de la cual se encuentran la mayor parte de las proteínas de fase aguda de la inflamación.

Los cambios en los niveles plasmáticos de proteínas de fase aguda se deben a modificaciones en la transcripción génica y se encuentran mediados por promotores que se unen a factores nucleares activados por citocinas. Estudios in vitro con citocinas proinflamatorias plantean que a su vez, las citocinas liberadas regulan, estimulan y redistribuyen el metabolismo proteico. En células de hepatoma, la IL-1 y el FNT  $\alpha$  inducen la disminución de albúmina sérica y el incremento de la síntesis de proteínas de fase aguda (38).

La vitamina A y los compuestos con actividad de retinol requieren de la presencia de proteínas transportadoras para poder llevar a cabo sus funciones en el organismo (39). Estas proteínas forman parte de una superfamilia, encargadas de la movilización y transporte de metabolitos relacionados con la vitamina A, a través de receptores celulares (40). Niveles bajos de vitamina A provocan desajustes en la síntesis hepática de proteína de unión al retinol, por lo que una ingestión deficiente puede provocar una disminución de su síntesis que impide su movilización hacia los tejidos (41).

Los valores de vitamina A al finalizar el ensayo muestran un incremento significativo en el grupo DA, que pudiera ser la consecuencia de su movilización hepática. Sin embargo, el grupo DAP mostró una reducción significativa relacionada quizás con la deficiencia proteica, que impide su movilización hacia los tejidos. Ello podría ser la causa de una carencia de vitamina A y compuestos relacionados en la periferia y con ello de su acción antioxidante, que pudiera provocar la estimulación de indicadores de la inflamación. El incremento de la expresión génica de IL-1 puede relacionarse con otros indicadores como el complemento que constituye uno de los mecanismos iniciales estimulados en la fase aguda y con la neutrofilia observada en este grupo que manifiesta una activación de los mecanismos inespecíficos de la respuesta inmune en el hospedero.

La leucopenia y linfopenia en el grupo DAP se

encontraron fuera del rango normal para ratas con este tiempo de desarrollo, lo que pudiera relacionarse con la atrofia observada en órganos linfoides primarios y periféricos, así como con una movilización deficiente de vitamina A hacia los tejidos.

El concepto de inmunoestimulación comprende una cadena de eventos muy bien integrados, que provocan entre otros, la respuesta de fase aguda frente a estímulos bien establecidos (42). Las citocinas proinflamatorias y la Interleucina 1 en particular, dirigen todos los cambios metabólicos que caracterizan el proceso inflamatorio. Modelos experimentales en ratas, a las cuales se les ha administrado IL-1 o TNF  $\alpha$  reproducen la neutrofilia (43).

Los resultados obtenidos en la expresión génica de Interleucina 1 en el grupo DAP, con una estimulación significativa en relación con la neutrofilia, con los valores incrementados de CH50 y con el incremento de la fracción  $\alpha$  de las proteínas séricas, que pudiera ser provocado por el efecto activador de la Interleucina 1, sugieren una posible activación de la inflamación a través de un desajuste entre proteínas y vitamina A en los niveles moderados ensayados, que inciden en la movilización de vitamina A hacia los tejidos. Esto provoca una afectación en tejidos periféricos que pudiera inducir la activación de indicadores relacionados con la inflamación y por lo tanto el incremento del catabolismo a expensas de la movilización de proteínas estructurales como las del músculo esquelético, con una mayor utilización del nitrógeno endógeno y una mayor recirculación de fuentes de nitrógeno como la urea.

Esta posible estimulación inflamatoria ha sido reconocida como infección "inaparente", ante la ausencia evidente de procesos infecciosos y con la elevación de uno o más indicadores de la inflamación como el conteo de leucocitos y proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva, en poblaciones de Guatemala con afectaciones en el crecimiento en el estudio de Solomons y col. (44).

Los modelos experimentales en los estudios nutricionales muestran enormes ventajas al permitir el control de una serie de factores como ambiente, tipo de dieta y caracterización exhaustiva de los efectos provocados según el modelo diseñado, pero sus resultados no pueden extrapolarse totalmente al humano, debido a las reconocidas diferencias interespecies. Aunque las deficiencias ensayadas se encuentran dentro de niveles moderados y fueron probadas durante un período corto, estos resultados obligan a profundizar en los mecanismos fisiológicos involucrados, para poder dirigir medidas para la prevención de enfermedades crónicas transmisibles o no, y con ello incrementar la calidad de vida.

Los resultados ofrecen la posibilidad de profundizar y definir los mecanismos involucrados con la deficiencia de ambos nutrientes y la expresión de citocinas, con el fin entre

otros de utilizarlas como posibles marcadores para la detección de afectaciones subclínicas del sistema inmune provocadas por deficiencias nutricionales.

### AGRADECIMIENTOS

A los técnicos Caridad Arocha, Ma. de los Angeles Sánchez, Elsa Alonso y Yeimi Mora, del Dpto. Bioquímica y Fisiología del Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos que participaron en la marcha experimental de este trabajo. Al Lic. Alejandro Silva por su revisión crítica del trabajo y por sus sabios consejos.

### REFERENCIAS

1. Waterloo JC. Malnutrición Proteico-Energética. Edit. Washington D.C.OPS:E.Arnold;1996 Cap. 1:1-10.
2. Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* 1997;66(2):460S-63S.
3. Santos JI. Nutrition, infection and immunocompetence. *Infect Dis Clin North* 1994;8:243-67.
4. Bollag W & Holdener EE. Retinoids in cancer prevention and therapy. *Ann Oncol* 1992;3(7):513-26.
5. Vahlquist A. Role of Retinoids in normal and diseased skin. En: *Vitamin A in Health and disease*. Edit R.Blomhoff, Ed.Marcel Dekker Inc, New York. Basel. Hong Kong. 1994: 365-424.
6. Roitt IM, Brostoff J & Male DK. Inmunología. 3a Ed. Ed. L.Gamlin. Edit. Científico Técnica. 1993 Cap. 1, pp 1-12.
7. Meydani SN. Dietary modulation of cytokine production and biologic function. *Nutr Rev* 1990;48:361-69.
8. Grimble RF. Nutritional antioxidants and the modulation of inflammation: theory and practice. *New Horiz* 1994;2:175-85.
9. Beisel WR. Herman Award Lecture, 1995 : Infection-induced malnutrition-from cholera to cytokines. *Am J Clin Nutr* 1995;62:813-9.
10. Moldawer LL & Copeland EM. Proinflammatory cytokines, nutritional support and the cachexia syndrome: Interactions and therapeutic options. *Cancer* 1997;79:1828-39.
11. Grimble RF. Interaction between nutrients, pro-inflammatory cytokines and inflammation. *Clin Sci* 1996;91:121-30.
12. Steel DM & Whitehead AS. The mayor acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994; 23(2):81-7.
13. Bhaskaram P & Swakumar B. Interleukin 1 in malnutrition. *Arch Dis Child* 1986;61 (2):182-85.
14. Movat HZ. Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1: Role in acute inflammation and microvascular injury. *J Lab Clin* 1987;110:668-73.
15. Sullivan JS, Kilpatrick L & Costarino AT. Correlation of plasma cytokine elevations with mortality rate in children with sepsis. *J Pediatr* 1992;120:510-5.
16. Dinarello CA & Wolf SM. The role of interleukin 1 in disease. *N Engl J Med* 1993;328: 106-15.

17. Muñoz C, Arévalo M, López M & Shlesinger L. Impaired interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor production in protein-calorie malnutrition. *Nutr Res* 1986;14:347-52.
18. Schattner A, Steinbock M, Tepper R, Schonfeld A, Vaisman N & Hahn T. Tumor Necrosis Factor production and cell-mediated immunity in anorexia nervosa. *Clin Exp Immunol* 1990;79:62-6.
19. Frankeuburg S, Wang X & Milner Y. Vitamin A inhibits cytokines produced by type 1 lymphocytes in vitro. *Cell Immunol* 1998;185(1):75-81.
20. Gay J, Porrata C, Hernández M, Clúa AM, Argüelles JM, Cabrera A & Silva LC. Dietary factors in epidemic neuropathy on the Isle of Youth, Cuba. *Bull PAHO* 1995; 29(1):25-36.
21. AOAC. *Methods of the Association of Official Analytical Chemist*, 15 Ed. Ed. Kenneth Helrich. Edit Association of Official Analytical Chemist, Virginia, U.S.A. 92303,1990:777.
22. NC 86-04/ 1989: Productos farináceos. Cereales y sus productos: Determinación del contenido de humedad.
23. Canolty NL & Koong LJ. Evaluating protein quality by estimating energy deposition coefficients. *J Nutr* 1978;108:1555-8.
24. Pino D & García R. Método de cromatografía en fase reversa por HPLC para la determinación de vitamina A en pienso. *Revista CENIC (Supl)*, 1995;45-56.
25. Mengheri E, Ciapponi L, Vignolini F & Nobili F. Cytokine gene expression in intestine of rat during the postnatal development period increased IL-1 expression at weaning. *Life Sci*. 1996;59(15):1227-36.
26. Chomozynski P & Sacci N. Single-step method of RNA Isolation by AGPC. Extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-59.
27. Maniatis (Eds). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. Sambrook. Fritsch. Maniatis 2ª Ed. Tomo III, Cap. 7 1989;7.1-7-87
28. Cui L. Induction of nitric oxide synthase in rat intestine by Interleukin 1 $\alpha$  may explain diarrhea associated with zinc deficiency. *J Nutr* 1997;127:1729-36.
29. International Committee for Standardization in Haematology: Recommendation measurement of serum iron in human blood. *Br J Haematol*.1978;38:291.
30. Harbeck RJ & Giclas PC. *Diagnostic Immunology, Laboratory Manual*, Raven Press, 1991:21-27.
31. Gornall AG, Bardawill CS & David MM. *J Biol Chem* 1949;177:751-3.
32. Zukas PA. *Proteinograma electroforético*. Edit. Colmegna. Ed. PA Zukas, Buenos Aires, Argentina 1973:13-27.
33. Thurham DI, Smith E & Flora PS. Concurrent Liquid-Chromatographic Assay of Retinol,  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotene,  $\alpha$ -Carotene, Lycopene and  $\beta$ -Cryptoxanthin in plasma with Tocopherol Acetate as Internal Standard. *Clin Chem* 1988;34:377-81.
34. Sigarroa A. *Manual de Clases Prácticas de Biometría y Diseño Experimental*. Programa del Sistema Estadístico TONYSTAT. Ed. Pueblo y Educación, 1987 pp 154 .
35. Cederholm T, Wretling B, Hellström K, Anderson B, Engström L, Brismar K, Scheymus A, Forslind J & Palmblad J. Enhanced generation on interleukin 1  $\beta$  and 6 may contribute to the cachexia of chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1997;65:876-82.
36. Beisel WR. *Nutritional Biochemistry and Metabolism*. 2a. Ed. Edit. M.C. Linder. Edit. Appleton & Lange, 1991 Chap.17, pp 506-42.
37. Kurpad AV , Soares MJ, Sikhar RV , Reeds PJ & Fjeld CR. A study of acute phase and transport protein synthesis in undernourished men using simulated infection and uniformly  $^{15}\text{N}$  labelled spirulina platensis. Co-ordinated research programme in application of stable isotope tracer methods to studies of aminoacid, protein and energy metabolism in malnourished populations of developing countries. Report of the First Research co.ordination meeting, IAEA, Boston, U.S.A. 1993:9-19.
38. Koj A. Initiation of acute response and synthesis of cytokines. *Biochem Biophys Acta* 1996;1317(2):84-94.
39. Blomhoff HK & Smeland EB. Overview of Vitamin A Metabolism and Function. In: *Vitamin A in Health and disease*. Edit R.Blomhoff, Ed.Marcel Dekker Inc, New York, 1994:1-35.
40. Sivaprasadarao A & Findlay JBC. The Retinol-Binding Protein Superfamily En: *Vitamin A in Health and Disease*. Ed. R. Blomhoff. Maecel Dekker Inc., New York. Basel. Hong Kong, 1994: 87-118.
41. Haas DW, Raffanti S, Chytil F, Lakey D & Alls S Impaired hepatic synthesis in AIDS patients with low vitamin A levels. *J Infect Dis* 1995;172(4):1167-8.
42. Klasing KC & Johnstone BJ. Monokines in growth and development. *Foult Sci* 1991; 70:1781-9.
43. Fischer E, Marano MA & Barber AE. Comparison between effects of Il-1 alpha administration and sublethal endotoxemia in primates. *Am J Physiol* 1991;261:442-52.
44. Solomons NW, Mazariegos M, Vettorazzi C, Valdez C, Grazioso C, Romero-Abal ME & B Caballero. Growth faltering, protein metabolism and immunostimulation: new speculations on the nature of the relationship with notes from observations and analysis in Guatemala. Co-ordinated research programme in application of stable isotope tracer methods to studies of aminoacid, protein and energy metabolism in malnourished populations of developing countries. Report of the Firsrt Research co.ordination meeting, IAEA, Boston, U.S.A. 1993,115-26.

Recibido: 12-12-2000

Aceptado: 05-12-2001