
Valores séricos de citocinas en niños con desórdenes por deficiencia de vitamina A.

Jorymar Y. Leal¹, Haydée V. Castejón¹, Tania Romero², Pablo Ortega¹, Gisela Gómez³, Daisy Amaya¹ y Jesús Estévez⁴.

¹Laboratorio de Investigación en Malnutrición Infantil y Retardo Mental, Hospital de Especialidades Pediátricas de Maracaibo, Instituto de Investigaciones Biológicas, ²Postgrado de Inmunología, ³Sistema Regional de Salud, ⁴Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Deficiencia de vitamina A, citología de impresión conjuntival, citocinas, pre-escolares.

Resumen. Los desórdenes por deficiencia de vitamina A (DDVA) se manifiestan por trastornos de la diferenciación celular, alteraciones del sistema inmunológico y aumento de la tasa de morbi-mortalidad infantil debido a infecciones respiratorias y gastrointestinales. Con el objeto de conocer las concentraciones séricas de las citocinas en niños con DDVA, se estudiaron 138 niños marginales de Maracaibo (F=72; M=66; 4-7 años), con estado nutricional adecuado, determinado por clínica y antropometría. Para detectar niños con DDVA se aplicó la técnica de Citología de Impresión Conjuntival (CIC) según ICEPO, CIC normal = control y CIC anormal = DDVA. Las concentraciones séricas de las citocinas IL-10, IL-4 e IFN- γ (pg/mL) se analizaron por el método ELISA, y la IL-2 (U/mL), por el método EAISA. Para encontrar diferencia entre los valores obtenidos se aplicó la prueba *t de Student* ($p < 0,05$). Ningún niño presentó xeroftalmia. Por la técnica de CIC, 67 niños (48,60%) presentaban anormalidad, indicativa de deficiencia funcional de vitamina A. La prevalencia de DDVA fue más alta en niños 5-6 años (64,18%), sexo femenino (51,39%), y raza indígena (60,40%), sin significancia estadística. En los niños con DDVA, la única citocina que mostró valores séricos bajos ($p < 0,03$) fue la IL-10 comparada con el grupo control ($4,41 \pm 1,27$ pg/mL vs $6,03 \pm 3,90$ pg/mL): El resto de las citocinas no mostró diferencia estadística con respecto al control. La coexistencia de DDVA y valores séricos bajos de IL-10 en los niños, podría explicar la alteración de la respuesta inflamatoria a nivel de los epitelios respiratorio e intestinal.

Serum values of cytokines in children with vitamin A deficiency disorders.

Invest Clin 2004; 45(3): 243 - 256

Key words: Vitamin A deficiency, conjunctival impression cytology, cytokines, pre-school children.

Abstract. Vitamin A Deficiency Disorders (VADD) have been associated with alterations of cellular differentiation, regulatory functions of the immune system and increased children morbidity and mortality rates due to acute respiratory and intestinal infections. The aim of the present study was to determine serum concentrations of Th1–Th2 cytokines in VADD children. The sample consisted of 138 children (F=72; M=66; 4–7y old) living in slums in Maracaibo, Venezuela, with an adequate nutrition assessed by clinics and anthropometry. Vitamin A status was assessed by the Conjunctival Impression Cytology (CIC) technique following the ICEPO methodology, which determines Normal CIC = control or Abnormal CIC = VADD. The cytokines IL-10, IL-4 and IFN- γ (pg/mL) were analyzed by the ELISA method; and IL-2 (U/mL) by the EAISA method. The Student's t test was applied to detect differences between values ($p < 0.05$). No one child presented clinical evidence of VADD; 71 children (51.40%) exhibited normal CIC (control), whereas 67 children (48.60%) presented abnormal CIC indicative of sub-clinical manifestation of VADD. The prevalence was higher, although non significant, in females, 5-6 y old children and amerindians (51.39%, 64.18% and 60.40%, respectively). A diminished serum concentration of IL-10 was detected in VADD children, in comparison with the control group (4.41 ± 1.27 pg/mL vs. 6.03 ± 3.90 pg/mL) ($p < 0.03$). The rest of studied cytokines were not significantly different with respect to control. The IL-10 diminution in VADD children would be related to the alteration of the inflammatory response at the level of respiratory and intestinal epithelia affected by infections.

Recibido: 28-10-2003 Aceptado: 10-03-2004

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de vitamina A es uno de los principales problemas de salud pública en muchos países en desarrollo (1-4). El Grupo Consultor Internacional de la Vitamina A (IVACG), en el Acuerdo de Anecy (5) para la Apreciación y el Control de la deficiencia de vitamina A, recomendó abandonar el término de Deficiencia de vitamina A subclínica y usar el término "Desórdenes por Deficiencia de Vitamina A"

(DDVA) para referirse a todas las alteraciones fisiológicas causadas por un estado de vitamina A deficitario. Tales alteraciones pueden ser manifestaciones subclínicas como diferenciación celular alterada (6,7), depresión de la respuesta inmunitaria (8-10), movilización férrica deficiente (11) y manifestaciones clínicas tales como el aumento de la morbilidad y mortalidad debido a enfermedades infecciosas (12-17), retardo del crecimiento, anemia y xeroftalmía (5, 11, 18).

Se ha estimado que a nivel mundial, 140 millones de niños en edad pre-escolar están afectados por deficiencia de vitamina A (5). En Latinoamérica, la prevalencia de DDVA severa no está bien documentada; sin embargo, las manifestaciones subclínicas son prevalentes (19-22). En niños con DDVA, aún los adecuadamente nutridos, existe un 20-30% de mayor riesgo de presentar infecciones severas que pueden conducir a la muerte, probablemente porque esta condición limita la capacidad de respuesta del sistema inmunitario (9, 12, 13, 16, 23, 24).

Los mecanismos de las respuestas inmunitarias, innatas y específicas, forman un sistema integrado de defensa del individuo en el que existe una cooperación funcional de numerosas células y moléculas (25-27). Las respuestas inmunitarias específicas están mediadas por linfocitos, de los cuales se conocen dos clases diferentes: los linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral, y los linfocitos T, responsables de la inmunidad celular. Existen además dos subclases de linfocitos T: los colaboradores (*T helper*, Th) CD4+, y los supresores TCD8+. En muridos y humanos, los clones de linfocitos T CD4+ pueden ser clasificados en subgrupos Th1, Th2 y Th0, dependiendo del patrón de secreción de citocinas. Las células TCD4+ Th1 secretan Interleucina 2 (IL-2), Interferón gamma (IFN- γ), Factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), Interleucina 15 (IL-15), y Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), las cuales predominan en la inmunidad celular. Las células TCD4+ Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, Factor transformante del crecimiento (TGF- β), y GM-CSF, las cuales participan en la inmunidad humoral. Las células TCD4+ Th0, secretan citocinas comunes con las células Th1 y Th2, incluyendo IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-3, TNF- α , GM-CSF, M-CSF y quimiocinas. Los linfocitos T CD8+ producen citocinas

que también son secretadas por los fenotipos Th1 y Th2 (25-27).

Las citocinas controlan el sistema inmune, regulando la activación, proliferación y diferenciación de varios tipos de células; y regulando la secreción de anticuerpos y de otras citocinas (25-27). El resultado de la respuesta inmune depende del número relativo de células Th1 y Th2, y de sus productos. En respuesta a patógenos intracelulares, existe un aumento de citocinas secretadas por las células Th1; mientras que, en respuestas alérgicas y ante helmintos, es superior a la cantidad de citocinas secretadas por las células Th2. Diversos estudios han revelado la existencia de una regulación cruzada entre las células Th1 y Th2 (25-27). El IFN- γ , secretado por las células Th1, inhibe la proliferación de las células Th2. Por otro lado, la IL-10, secretada por las células Th2, inhibe la secreción de IL-2 e IFN- γ , por parte de las células Th1 (25-27).

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 (28-34). Sin embargo, en humanos, no existen suficientes estudios que permitan establecer la repercusión del DDVA sobre el sistema inmunológico. Aukrust y col. (35), en un estudio realizado en humanos con inmunodeficiencia congénita y además con deficiencia de vitamina A, señalaron que la suplementación con vitamina A promovía el incremento de las concentraciones de las citocinas anti-inflamatorias. Filteau y col. (36), relacionaron citocinas con deficiencia de vitamina A, y establecieron que en los niños con esta condición no se altera la producción de INF- γ . En Maracaibo se ha reportado alta prevalencia de DDVA (37, 38), por lo que la presente investigación se realizó en niños entre 4 y 7 años de edad, eutróficos, procedentes de barrios marginales de

Maracaibo-Venezuela, con el objeto de establecer si existe alteración de las concentraciones séricas de las citocinas IFN- γ , IL-2, IL-10 e IL-4, en niños con DDVA.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente estudio transversal, descriptivo, se seleccionó en forma aleatoria un grupo de 163 niños pre-escolares, que asistían al Centro Pre-escolar "Rómulo Gallegos I" ubicado en un barrio en situación de pobreza crítica, en el Noroeste de Maracaibo-Venezuela, durante el período Mayo-Junio de 2002. El estudio fue previamente aprobado por el Consejo Técnico del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, y el Comité de Ética del Laboratorio de Investigación en Malnutrición Infantil del referido Instituto. Los padres o representantes legales de los niños dieron su consentimiento verbal y escrito para la inclusión del niño en el proyecto de investigación.

La condición socio-económica de la población estudiada fue estimada utilizando el Método de Graffar, adaptado para Venezuela por Méndez Castellano y Méndez (39). Los niños fueron sujetos a examen clínico por un grupo de profesionales de la salud. En la evaluación nutricional antropométrica, se establecieron las variables Peso, Talla y Edad, y la combinación de éstos. Se analizó el puntaje Z de los indicadores Peso//Edad (P//E), Talla//Edad (T//E) y Peso//Talla (P//T), utilizando el programa estadístico Epi-Info, versión 6.04 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, U.S.A. OMS, 1994), tomando como base el patrón de referencia internacional del Centro Nacional de Estadística en Salud de USA (NCHS/OMS), válido para estudios en Latinoamérica. Valores de ZPE, ZTE y ZPT entre 2 y -2 Desviaciones Estándar (DE) fueron considerados indicativos de

nutrición adecuada, es decir eutróficos y valores < -2 DE se consideraron indicativos de desnutrición (40).

A cada niños se le tomó una muestra de sangre (5mL), por punción venosa antecubital, en ayunas, entre las 8:00-9:00 am, la cual fue vertida en un tubo sin anticoagulante. La muestra fue sometida a centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos, con el objeto de obtener el suero, el cual se repartió en alícuotas en tubos plásticos (Eppendorf). Una de estas alícuotas una fue utilizada para analizar de inmediato la proteína C reactiva, y el resto almacenada a -70°C para determinar las citocinas. Las muestras hemolizadas fueron descartadas.

La proteína C reactiva fue analizada en suero, mediante la prueba semicuantitativa de aglutinación en placa (Wiener lab.), con el fin de descartar aquellos niños que presentaran una respuesta positiva, indicativa de estado inflamatorio en su fase aguda.

Completada la evaluación del grupo total de niños, se seleccionaron 138 pre-escolares, con los siguientes criterios de inclusión: entre 4 y 6 años, de ambos sexos (F= 72, M= 66) y todas las razas, considerados nutricionalmente eutróficos (ZPE, ZTE y ZPT entre 2 y -2 DE), en ausencia de patología infecciosa aguda o crónica o proceso inflamatorio activo, confirmado por examen clínico y por la respuesta negativa de la proteína C reactiva en suero.

Para la evaluación del estado funcional de la vitamina A, se aplicó la técnica de Citología de Impresión Conjuntival (CIC), de acuerdo al Manual de Instrucciones del The International Center for Epidemiologic and Preventive Ophthalmology (ICEPO) (41), ya estandarizada en el Laboratorio de Investigación en Malnutrición Infantil (38). Los criterios de clasificación de esta prueba, realizada por estudio microscópico de la impresión conjuntival, se basan en la presencia de células caliciformes y manchas de mucina y en la integridad del tejido epite-

lial. Estos criterios permiten clasificar la CIC en Normal y Anormal. La normalidad se establece al observar abundantes células caliciformes (más de cinco por campo con objetivo de magnificación de 10X) y manchas de mucina, ambas positivas a la coloración de ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS), e hileras continuas o en masa, de células epiteliales pequeñas. Este estadio se correlaciona con valores séricos normales de vitamina A, por lo que indica un estado nutricional normal de este micronutriente. La anormalidad la determina la presencia de muy pocas células caliciformes (menos de 5 por campo) y manchas de mucina o ausencia de éstas; células epiteliales con marcado aumento de tamaño, disgregadas y queratinizadas. Estos cambios son indicativos de deficiencia funcional de vitamina A, evidentes aún en áreas donde la conjuntiva, desde el punto de vista clínico, luce normal.

Los resultados de la citología de impresión conjuntival permitió clasificar esta población infantil en dos grandes grupos: Grupo Control: Constituido por 71 niños con CIC normal (51,40%) indicativo de un estado funcional normal de vitamina A y, Grupo Estudio: Constituido por 67 niños con CIC anormal (48,60%) indicativo de un estado funcional anormal de vitamina A.

Para el análisis de las citocinas, las muestras de suero, conservadas a -70°C hasta el momento de su análisis, fueron transportadas al Laboratorio Regional de Referencia Viroológica del Instituto de Investigaciones Clínicas de la Facultad de Medicina de La Universidad del Zulia. Para la determinación de IL-10, IL-4 e IFN- γ , se aplicó el método de Inmunoanálisis Enzimático (ELISA) de doble anticuerpo, utilizándose kits de la casa comercial BioSource Europe SA. La determinación de la IL-2, se realizó de acuerdo a una variante del método ELISA de doble anticuerpo de sensibilidad amplificada (EAISA), utilizándose el kit de la casa comercial BioSource Europe SA. Las

concentraciones séricas de las citocinas se calcularon en el rango lineal de la curva de los estándares. Los valores obtenidos de IL-10, IL-4 e IFN- γ (pg/mL), y de IL-2 (U/mL), fueron expresados como Media \pm Desviación Estándar ($X \pm DE$). Para comparar las medias de los grupos: suficientes en vitamina A y con DDVA, se utilizó la prueba *t de Student* para muestras independientes, con la ayuda del paquete de análisis estadístico SAS/STAT (Versión 6.12, SAS Institute INC, Cary, NC., 1996). Se consideró como índice de significancia estadística, los valores de probabilidad menores de 0,05.

RESULTADOS

La presente investigación se realizó en 138 niños eutróficos, con Puntajes Z (ZPE, ZTE y ZPT) de los indicadores antropométricos Peso//Edad (P//E), Talla//Edad (T//E) y Peso//Talla (P//T) ubicados en el rango de $+2$ Desviaciones Estándar (DE) a -2 DE, rangos que indican estado nutricional adecuado. No se observaron signos clínicos que sugirieran xeroftalmía. La Tabla I presenta las características generales de los 138 niños pre-escolares estudiados ($F=72$ y $M=66$). Nótese que el 94,20 % de los niños se ubicaron en los estratos socio-económicos de pobreza (Estratos IV y V). La desviación estándar de los promedios de los puntajes Z de los indicadores antropométricos fueron menores de 1,20; lo cual indica homogeneidad y confiabilidad de la muestra (38).

En la Tabla II, se muestran las características de la población estudiada según el estado funcional de la vitamina A. Se observa que la prevalencia de CIC anormal fue más alta en el grupo etario de 5-6 años, el sexo femenino, y la raza indígena aunque, no se encontró diferencia estadística significativa. Asimismo se observa que los promedios de puntaje Z de los indicadores P//E, T//E y P//T de los niños con DDVA

TABLA I
 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN INFANTIL ESTUDIADA (n= 138)

VARIABLES	n	%	$\bar{X} \pm DE$
Edad (años)			
< 5	35	25,40	
5-6	77	55,80	
> 6	26	18,80	
Sexo			
Femenino	72	52,17	
Masculino	66	47,83	
Raza			
Blanca	64	46,38	
Indígena	48	34,78	
Mestiza	24	17,39	
SI	2	1,45	
Estrato socio-económico			
III	4	2,90	
IV	56	40,60	
V	74	53,60	
SI	4	2,90	
Variables antropométricas			
Peso (Kg)			18,32 \pm 2,68
Talla (cm)			108,08 \pm 5,09
Indicadores			
Promedio de puntaje Z			
ZP//E			-0,34 \pm 0,99
ZT//E			-0,74 \pm 0,79
ZP//T			0,19 \pm 0,94

n= número de sujetos. %= proporción de sujetos. \bar{X} =Promedio. DE = Desviación Estándar. SI: Sin información. ZP//E= Puntaje Z de Peso//Edad. ZT//E= Puntaje Z de Talla//Edad. ZP//T= Puntaje Z de Peso//Talla.

estuvieron en el rango de la normalidad nutricional.

La Tabla III muestra los valores séricos de las citocinas IL-10, IL-4, IFN- γ e IL-2 en los pre-escolares eutróficos según el estado funcional de la vitamina A, detectado por CIC. Obsérvese que el número de niños analizados para cada citocina fue diferente, siendo 64 niños (31, control; 33, DDVA) para IL-4 e IL-10, y 137 niños (71, control; 66, DDVA) para IFN- γ e IL-2. Esta diferencia se produjo porque un kit de IL-4 y uno de IL-10 presentaron problemas al momento de la determinación de las citocinas, perdiéndose los sueros que se habían aplicado a estas placas. Así mismo, el suero de un

niño fue descartado por provenir de sangre hemolizada, por lo que para IFN- γ e IL-2 sólo fueron analizadas 137 muestras. En el grupo de niños con DDVA, la concentración sérica promedio de IL-10 fue menor que en el control, diferencia que fue estadísticamente significativa ($p < 0,03$). El resto de las citocinas no mostró diferencia estadística entre los niños con suficiencia y deficiencia de vitamina A. Es llamativo que en el caso del IFN- γ , la desviación estándar fue muy alta; se estudiaron los datos y se eliminaron dos datos atípicos y, sin embargo, la diferencia entre los grupos no fue significativa (DDVA vs control; $7,83 \pm 5,36$ vs $7,39 \pm 4,82$, respectivamente).

TABLA II
 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN INFANTIL ESTUDIADA SEGÚN EL ESTADO FUNCIONAL DE LA VITAMINA A, DETERMINADO POR CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN CONJUNTIVAL

Variables	Estado funcional de la vitamina A (n= 138)			
	Suficiente CIC normal n= 71 (51,40%)		Deficiente CIC anormal n= 67 (48,60%)	
	n	%	n	%
Edad (años)				
< 5 (n= 35)	20	28,17	15	22,39
5-6 (n= 77)	34	47,89	43	64,18
> 6 (n= 26)	17	23,94	9	13,43
Sexo				
Femenino (n= 72)	35	48,61	37	51,39
Masculino (n= 66)	36	54,55	30	45,45
Raza				
Blanca (n= 64)	36	56,30	28	43,80
Indígena (n= 48)	19	39,60	29	60,40
Mestiza (n= 24)	16	66,70	8	33,30
SI (n= 2)	0	0,00	2	100,00
Estrato socio-económico				
III (n= 4)	3	4,23	1	1,49
IV (n= 54)	34	47,89	22	32,84
V (n= 72)	32	45,07	42	62,69
SI (n= 4)	2	2,81	2	2,98
Variables antropométricas				
		$\bar{X} \pm DE$		$\bar{X} \pm DE$
Peso (Kg)		18,24 \pm 2,60		18,41 \pm 2,78
Talla (cms)		107,71 \pm 4,81		108,47 \pm 5,38
Indicadores				
Promedio de puntaje Z				
ZP//E		-0,44 \pm 1,00		-0,32 \pm 0,96
ZT//E		-0,88 \pm 0,74		-0,65 \pm 0,800,13
ZP//T		0,17 \pm 0,97		\pm 0,91

CIC= Citología de impresión conjuntival. n= número de sujetos. (%) = proporción de sujetos. SI: Sin información. \bar{X} =Promedio. DE = Desviación Estándar. ZP//E= Puntaje Z de Peso//Edad. ZT//E= Puntaje Z de Talla//Edad. ZP//T= Puntaje Z de Peso//Talla.

La Tabla IV muestra las características de la población estudiada para IL-10, según el estado funcional de la vitamina A. Nótese en los niños con CIC anormal que los promedios de IL-10 sérica no mostraron diferencia estadísticamente significativa según grupo étnico, sexo y raza.

DISCUSIÓN

La vitamina A es conocida como reguladora de la diferenciación celular, responsable de los cambios en los epitelios de rápida división. La determinación del estado de la vitamina A puede reflejar cambios en

TABLA III
CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LAS CITOCINAS FENOTIPOS TH1-TH2 ESTUDIADAS
SEGÚN EL ESTADO FUNCIONAL DE LA VITAMINA A EN UNA POBLACIÓN PRE-ESCOLAR
EUTRÓFICA DE MARACAIBO

Citocinas	Estado funcional de la vitamina A			
	Suficiente CIC normal		Deficiente CIC anormal	
	n	$\bar{X} \pm DE$	n	$\bar{X} \pm DE$
IL-10 (pg/mL)	31	6,03 \pm 3,90	33	4,41 \pm 1,27*
IL-4 (pg/mL)	31	3,42 \pm 1,92	33	3,64 \pm 1,66
INF- γ (pg/mL)	71	9,05 \pm 8,93	66	7,39 \pm 4,82
IL-2 (U/mL)	71	0,29 \pm 0,30	66	0,29 \pm 0,31

CIC= Citología de impresión conjuntival. n= número de sujetos. \bar{X} = Promedio. DE= Desviación Estándar. pg/mL= picogramos/mililitro. U/mL= Unidades/mililitro. *Diferencia significativa entre el grupo con suficiencia de vitamina A y el grupo con deficiencia de vitamina A ($p < 0,03$).

estos sistemas celulares (42). En el presente estudio se determinó el estado funcional de la vitamina A por la técnica de citología de impresión conjuntival (CIC). Los resultados obtenidos mostraron que 67 niños (48,60%) presentaron CIC anormal, indicativa de DDVA. Estudios previos han demostrado que la CIC es una técnica de elevada sensibilidad y especificidad, por lo que se correlaciona con la deficiencia temprana de vitamina A (42). Por ello, este indicador fisiológico es capaz de detectar disturbios funcionales leves y/o moderados de DDVA (42).

Desde el punto de vista de salud pública, existe un problema de DDVA, determinado por CIC, cuando la prevalencia de citología anormal es mayor o igual al 20% (42). En este estudio, esta prevalencia límite fue sobrepasada ampliamente, indicando que existe un problema severo de salud pública en esta región y la necesidad de aplicación de programas de intervención nutricional.

La prevalencia de DDVA detectada por CIC en los niños objeto de este estudio (48,60%) fue mayor a la reportada por Castejón y col. (38) en niños procedentes de

otros barrios del estado Zulia (35,46%); y a la reportada por Páez y col. (43) en niños de Valencia (10,5%).

Esta mayor prevalencia de DDVA encontrada en la presente investigación, con respecto a los resultados de otros investigadores en otras regiones de Venezuela, sugiere que podría encontrarse una gran variedad en la biodisponibilidad de alimentos ricos en vitamina A en las diferentes regiones de Venezuela, en sus niveles de pobreza y en su cultura nutricional; más aún considerando que la población estudiada estuvo constituida por un alto porcentaje de indígenas provenientes de la Península Goajira (con características altamente desértica), y de mestizos.

Por otra parte, estudios moleculares, inmunológicos y epidemiológicos realizados tanto en humanos como en animales, han proporcionado evidencias acerca de la importancia de los retinoides (derivados biológicos activos de la vitamina A) en la modulación de los mecanismos específicos e inespecíficos del sistema inmunitario, involucrados en la defensa del hospedero contra procesos infecciosos y de otra índole (1, 8, 16). Asimismo, se ha señalado que los reti-

TABLA IV
 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN INFANTIL ESTUDIADA PARA IL-10,
 SEGÚN EL ESTADO FUNCIONAL DE LA VITAMINA A, DETERMINADO POR CITOLOGÍA
 DE IMPRESIÓN CONJUNTIVAL

Variables	Estado funcional de la vitamina A (n= 64)				
	Suficiente CIC normal n= 31 (48,40%)		Deficiente CIC anormal n= 33 (51,60%)		
IL-10	X ± DE 6,03 ± 3,90		X ± DE 4,41 ± 1,27*		
	n	%	n	%	IL-10 X ± DE
Edad (años)					
< 5 (n= 15)	7	22,58	8	24,24	4,49 ± 1,49
5-6 (n= 37)	17	54,84	20	60,61	4,40 ± 1,36
> 6 (n= 12)	7	22,58	5	15,15	4,31 ± 0,42
Sexo					
Femenino (n= 34)	16	47,06	18	52,94	4,13 ± 1,00
Masculino (n= 30)	15	50,00	15	50,00	4,75 ± 1,50
Raza					
Blanca (n= 38)	20	52,63	18	47,37	4,35 ± 1,32
Indígena (n= 19)	7	36,84	12	63,16	4,49 ± 1,39
Mestiza (n= 5)	4	80,00	1	20,00	3,95
SI (n= 2)	0	0,00	2	100,00	4,68 ± 0,11
Variables antropométricas	\bar{X} ± DE		\bar{X} ± DE		
Peso (Kg)	18,74 ± 2,97		19,19 ± 3,35		
Talla (cm)	108,51 ± 4,99		109,58 ± 6,25		
Indicadores					
Promedio de puntaje Z					
ZP//E	-0,26 ± 1,27		-0,01 ± 1,08		
ZT//E	-0,83 ± 0,73		-0,36 ± 0,79		
ZP//T	0,33 ± 1,23		0,33 ± 1,05		

CIC= Citología de impresión conjuntival. n= número de sujetos. (%) = proporción de sujetos. \bar{X} = Promedio. DE = Desviación Estándar. SI: Sin información. ZP//E= Puntaje Z de Peso//Edad. ZT//E= Puntaje Z de Talla//Edad. ZP//T= Puntaje Z de Peso//Talla.

noides pueden regular la expresión de los genes de las citocinas (44-46). La mayoría de los estudios sobre deficiencia de vitamina A y citocinas han sido realizados en muridos. Algunas de estas investigaciones señalan que los casos de deficiencia de vitamina A se han caracterizado por síntesis excesiva de citocinas tipo Th1 (IFN- γ e IL-2) e insuficiente secreción por el fenotipo de cé-

lulas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) (32, 33). Sin embargo, en este estudio no se observó diferencias en la cuantificación de las citocinas Th1 y Th2 estudiadas, con excepción de la IL-10.

La IL-10, es una citocina de 18 kD, anti-inflamatoria e inmunorreguladora, capaz de inhibir los clones de células Th1 y suprimir la producción de citocinas pro-in-

flamatorias (TNF- α , IL-1, quimiocinas e IL-2) (25-27, 47). En la presente investigación en los pre-escolares con DDVA la IL-10 mostró valores significativamente más bajos, en comparación con el grupo control. Estos resultados observados en niños, coinciden con los de Aukrusts y col. (35) quienes señalan en un grupo de adultos inmunosuprimidos la asociación de deficiencia de vitamina A con valores séricos bajos de IL-10. Sin embargo, estudios previos realizados en ratones con deficiencia de vitamina A han mostrado una baja producción de IL-10 (30).

La coexistencia en niños pre-escolares de DDVA y bajos niveles séricos de IL-10 podría explicar la mayor prevalencia de enfermedades infecciosas broncopulmonares y diarréicas en los niños con esta condición, probablemente porque ambos trastornos se han asociado con alteraciones de los epitelios. La deficiencia de vitamina A induce cambios morfológicos como hiperplasia de las células basales y disminución de las células mucosas, disminución de la actividad de las disacaridasas, transpeptidasas y fosfatasa alcalina, y reducción del tamaño de las vellosidades intestinales (48). Asimismo, la deficiencia de IL-10 puede también afectar la respuesta inmune a nivel de las mucosas (49-52). En humanos, Colavita y col. (49) han demostrado que niveles séricos bajos de IL-10 conducen a una respuesta inflamatoria broncopulmonar más intensa en los sujetos asmáticos. Schreiber y col. (50) demostraron en estudios *in vitro* realizados con células monocíticas sanguíneas e intestinales de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, que la IL-10 cumple un papel importante en el mantenimiento normal de la inmunoregulación intestinal. Berg y col. (51) demostraron que en ratones infectados con *Helicobacter felis*, eliminando el gen de IL-10 (IL-10^{-/-}), desarrollaron gastritis hiperplásica severa, con características pre-neoplásicas, asociada con in-

cremento en la producción de TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ e IL-1 α . Además, estudios recientes realizados por Zingarelli y col. (52) han mostrado que los ratones (IL-10^{-/-}) son significativamente más vulnerables a morir debido a lesión isquémica y trastornos de la perfusión del intestino delgado.

Así la coexistencia de DDVA y valores séricos bajos de IL-10 en los niños, generaría un mayor riesgo de desarrollar procesos inflamatorios de diferente índole y a nivel de cualquier sistema. Sin embargo, son necesarios otros estudios en humanos *in vivo* e *in vitro* y de tipo longitudinal, para demostrar los efectos a largo plazo, no sólo del DDVA, sino de los valores séricos bajos de IL-10 como molécula inmunoreguladora; y quizás, la alteración de otras interleucinas; así como, apreciar los cambios en la respuesta inmunológica humoral y celular. Además, sería conveniente realizar estudios de suplementación con vitamina A, ya que investigaciones recientes realizadas en humanos por Aukrust y col. (35), y en ratones por Cui y col. (53), han demostrado que la administración de altas dosis de ácido retinóico es capaz de mejorar el estado de deficiencia de vitamina A y de favorecer la producción de IL-10, lo cual facilitaría la respuesta anti-inflamatoria a nivel de los epitelios.

En este estudio no se encontró diferencia significativa entre los valores séricos de IL-4, IL-2 e IFN- γ en los niños con DDVA y el grupo control. Con respecto a la IL-4, este hallazgo es similar al reportado en células de ratones con deficiencia de vitamina A, con respecto a su control (30). La interleucina-4 (IL-4), es una citocina de 20 kD; producida por las células Th0 y Th2. Es un factor de crecimiento y diferenciación para las células Th2. Entre sus principales funciones destaca la producción de Inmunoglobulina E (IgE) por las células B, mediadora fundamental de las reacciones de hipersensibilidad inmediata y en la defensa frente a

infecciones por artrópodos e infestaciones provocadas por helmintos (25-27).

Con respecto a la IL-2, la concentración sérica de ésta no se alteró en los niños con DDVA. Este resultado es similar al observado por Carman y Hayes (30) quienes analizaron la secreción de IL-2 en células de ratones con deficiencia de vitamina A; mientras que, Wiederman y col. (54) demostraron que en cultivos de células monocíticas de ratas con deficiencia de vitamina A estimuladas con Concanavalina A, mostraron incremento de la producción de IL-2. La interleucina -2 (IL-2) es una proteína de entre 14-17 kD, producida por las células TCD4+ y TCD8+ (25-27). Aunque en la literatura no se encontraron reportes de asociación entre DDVA-IL2 en humanos, nuestros resultados concuerdan con las observaciones de Carman y Hayes en ratones (30).

Otra citocina analizada en este estudio fue el Interferón- γ ; la cual es una glucoproteína de entre 21-24 kD, producido por las células Th1 y TCD8+ activadas y por las células asesinas naturales. El IFN- γ es un potente activador de los fagocitos mononucleares, favorece la diferenciación de las células TCD4+ vírgenes en la subpoblación de células Th1 e inhibe la proliferación de las células Th2 (25-27). Investigaciones recientes realizadas en animales, por diversos autores, han mostrado que la alteración en la regulación del IFN- γ puede ser la afectación primaria en deficiencia de vitamina A (30-34, 54). Estudios en muridos con ésta deficiencia mostraron que, en ausencia de vitamina A, la transcripción del IFN- γ no puede ser inhibida, determinando su alta producción (30, 32). Asimismo, se ha señalado la expresión constitutiva del IFN- γ en cultivos de células esplénicas y de ganglios linfáticos mesentéricos de ratones (31, 32) y ratas deficientes de vitamina A (12, 54); mientras que, en células esplénicas estimuladas con Concanavalina A, la producción de IFN- γ disminuye (29). Estudios en humanos

realizados por Filteau y col. (36), han mostrado que contrario a lo señalado en investigaciones en modelos experimentales de roedores deficientes de vitamina A, los niños con DDVA no presentan alteración en la regulación de la producción de IFN- γ . Igual resultado fue encontrado en el presente estudio en el cual las concentraciones séricas de IFN- γ en los niños con DDVA no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control.

En conclusión, como se ha evidenciado en esta investigación, el DDVA en pre-escolares coexiste con niveles séricos bajos de IL-10; mientras que, las concentraciones séricas de IL-4, IFN- e IL-2 no se muestran alteradas. Para completar este estudio, sería conveniente determinar la concentración de retinol sérico y de las mismas citocinas en una población de niños de la misma y de otras regiones no sólo del Estado Zulia, sino de Venezuela, con el fin de confirmar la prevalencia de DDVA en las diferentes regiones y su correlación con las diferentes citocinas, lo cual aportaría mayores datos sobre la deficiencia de vitamina A y el modelo inmunoregulatorio en el cual participan proteínas inductoras de la respuesta inmune específica e inespecífica.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia. Nuestro reconocimiento al personal del Laboratorio Regional de Referencia Viroológica del Instituto de Investigaciones Clínicas de la Facultad de Medicina de La Universidad del Zulia, en especial al Lic. Ricardo Atención, por su valiosa colaboración; al personal del Laboratorio Clínico del Hospital de Especialidades Pediátricas de Maracaibo por su colaboración en la realización de algunos los análisis a los niños. Al personal del Instituto Hematológico de Occidente en

especial a la MgSc Milagros Montiel por su colaboración en el procesamiento y análisis de la proteína C reactiva. Nuestro agradecimiento especial al personal docente, padres y representantes de los niños del Centro Pre-escolar "Rómulo Gallegos I" por su receptividad para el estudio de los niños quienes son en esta investigación, el objeto y la finalidad para un estado de salud más favorable. Un reconocimiento especial al Laboratorio VIVAX y a la Fundación CALOX de Venezuela por su valioso apoyo en el suministro de algunos medicamentos.

REFERENCIAS

1. Coskun T. Blinding and immunocompromising malnutrition: Vitamin A deficiency. *IPAJ Int Child Health* 1998; 9: 1-17. <http://www.ipor-france.net>
2. Alnwick D. Candidate noninfectious disease conditions. *Bull WHO*. 1998; 76: 55S-60S.
3. De Onis M, Fronguillo EA, Blössner M. ¿Está disminuyendo la malnutrición? Análisis de la evolución del nivel de malnutrición infantil desde 1980. *Bull WHO* 2000; 78: 1222-1233.
4. West KP, Jr. Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age. *J Nutr* 2002; 132: 2857S-2866S.
5. Sommer A, Davidson FR. Assessment and control of vitamin A deficiency: The Annecy Accords. *J Nutr* 2002; 132: 2845S-2851S.
6. Mc Cullough FS, Northrop-Clewes CA, Thurnham DI. The effect of vitamin A on epithelial integrity. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 289-293.
7. Wiedermann U, Hanson LÅ, Bremell T, Kahu H, Dahlgren UI. Increased translocation of *Escherichia coli* and development of arthritis in vitamin A-deficient rats. *Infect Immun* 1995; 63: 3062-3068.
8. Beisel W. Single nutrients and immunity. *Am J Clin Nutr* 1982; 35:417-467.
9. Arredondo-García JL, Guerra-Infante FM, Santos-Argumedo L. Concentraciones de inmunoglobulinas séricas en niños con deficiencia de vitamina A. *Gaceta Médica de México* 1990; 126:375-383.
10. Chandra RK. 1990 McCollum Award Lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:1087-1101.
11. Strube YN, Beard JL, Ross AC. Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *J Nutr* 2002; 132: 3607-3615.
12. Wiedermann U, Enerbäck CL, Hanson LÅ, Kahu H, Dahlgren UI. Vitamin A deficiency increases inflammatory responses. *Scand J Immunol* 1996; 44: 578-584.
13. Filteau SM. Vitamin A and the acute-phase response. *Nutrition* 1999; 15: 326-328.
14. Semba RD, Muhilal, West KP Jr, Natadisastra G, Eisenger W, Lan Y, Sommer A. Hyporetinolemia and acute phase proteins in children with and without xerophthalmia. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 146-153.
15. Semba RD. Vitamin A as "anti-infective" therapy, 1920-1940. *J Nutr* 1999; 129: 783-791.
16. Stephensen CB. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu. Rev. Nutr* 2001; 21: 167-192.
17. De Onis M. Medición del estado nutricional en relación con la mortalidad. *Bull WHO* 2000; 78: 1271-1274.
18. Palafox NA, Gamble MV, Dancheck B, Ricks MO, Briand K, Semba RD. Vitamin A deficiency, iron deficiency and anemia among preschool children in the Republic of the Marshall Islands. *Nutrition* 2003; 19: 405-408.
19. Matins MC, Santos LMP, Assis AMO. Vitamin A deficiency and anemia in pre-school children from sergipe, Northeast Brazil (Abstract). Report of the XXI International Vitamin A Consultative Group meeting "Improving the vitamin A status of populations", 2003. Marraeck, Morocco. p 61.
20. Fernández TF, Diniz A, Cabral P, Oliveira R, Lola M, Silva S, Kolsteren P. Hipovitaminose A em pré-escolares de creches públicas da cidade do Recife, Nordeste do Brasil: indicadores bioquímico

- e dietético (Resumen). Memorias del XIII Congreso Latinoamericano de Nutrición, 2003. Acapulco, México. p 48.
21. Benavente LE, Contreras SE, Delgado KR, Schwelthelm B. Control of subclinical vitamin A deficiency (VAD) in the Huallaga Valley of Perú (Abstract). Report of the XXI International Vitamin A Consultative Group meeting "Improving the vitamin A status of populations", 2003. Marraeck, Morocco. p 77.
 22. Solano L, Meertens L, Peña E, Arguello F. Deficiencia de micronutrientes. Situación actual. Anal Venez Nutr 1998; 11: 48-54.
 23. Semba RD, Bulterys M, Munyeshuli V, Gatsinzi T, Saah A, Chao A, Dushimimana A. Vitamin A deficiency and T-cell subpopulations in children with meningococcal disease. J Trop Pediatr 1996; 42: 287-290.
 24. Semba RD, Muhilal, Ward BJ, Griffin DE, Scott AL, Natadisastra G, West KP Jr, Sommer A. Abnormal T-cell subset proportions in vitamin A-deficient children. Lancet 1993; 341: 5-8.
 25. Abbas A, Lichtman A, Pober J. Inmunología celular y molecular. 2da. Edic. Ed. McGraw-Hill/ Interamericana de España; 1999 p 1-552.
 26. Janeway Ch, Travers P, Walport M, Capra J. Immunobiology. 4ta. Edic. Londres. Elsevier Science; 1999, P 1-635.
 27. Oppenheim J, Ruscetti F. Citocinas. En: Stites D, Terr A, Parslow T. Inmunología básica y clínica. México. Ed. El Manual Moderno; 2000, p 165-192.
 28. Carman JA, Smith SM, Hayes CE. Characterization of a helper T lymphocyte defect in vitamin A-deficient mice. J Immunol 1989; 142: 388-393.
 29. Bowman TA, Goonewardene M, Pasatiempo AMG, Ross AC, Taylor CE. Vitamin A deficiency decreases natural killer cell activity and Interferon production in rats. J Nutr 1990; 120: 1264-1273.
 30. Carman JA, Hayes CE. Abnormal regulation of IFN- γ secretion in vitamin A deficiency. J Immunol 1991; 147: 1247-1252.
 31. Carman JA, Pond L, Nashold F, Wassom DL, Hayes CE. Immunity to *Trichinella spiralis* infection in vitamin A-deficient mice. J Exp Med 1992; 175: 111-120.
 32. Cantorna MT, Nashold FE, Hayes CE. In vitamin A deficiency multiple mechanisms establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function. J Immunol 1994; 152: 1515-1522.
 33. Cantorna MT, Nashold FE, Hayes CE. Vitamin A deficiency results in a priming environment conducive for Th1 cell development. Eur J Immunol 1995; 25: 1673-1679.
 34. Cipitelli M, Ye J, Viggiano V, Sica A, Ghosh P, Gulino A, Santoni A, Young HA. Retinoic acid-induced transcriptional modulation of the human Interferon- γ promoter. J Biol Chem 1996; 271: 26783-26793.
 35. Aukrust P, Müller F, Ueland T, Svardal AM, Berge RK, Frøland SS. Decreased vitamin A levels in common variable immunodeficiency: vitamin A supplementation *in vivo* enhances immunoglobulin production and down regulates inflammatory response. Eur J Clin Invest 2000; 30: 252-259.
 36. Filteau SM, Raynes JG, Simmank K, Wagstaff LA. Vitamin A status does not influence neopterin production during illness or health in South African children. Br J Nutr 1998; 80: 75-79.
 37. Amaya-Castellanos D, Vilorio-Castejón H, Ortega P, Gómez G, Urrieta JR, Lobo P, Estévez J. Deficiencia de vitamina A y estado nutricional antropométrico en niños marginales urbanos y rurales en el Estado Zulia, Venezuela. Invest Clin 2002; 43: 89-105.
 38. Castejón HV, Ortega P, Díaz ME, Amaya D, Gómez G, Ramos M, Alvarado MV, Urrieta JR. Prevalencia de deficiencia subclínica de vitamina A y desnutrición infantil en niños marginales de Maracaibo-Venezuela. Arch Latinoam Nutr 2001; 51: 25-32.
 39. Méndez Castellano H, de Méndez MC. Estratificación social y biología humana. Arch Venez Puericult y Ped 1986; 49: 93-104.
 40. Waterlow JC. Evaluación del Estado Nutricional en la Comunidad en Malnutrición

- proteico energética OPS. 1996; Publicación N° 555: 260-280:
41. Wittpenn JR, West KP Jr., Keenum D, Farazdaghi M, Humphrey J, Howard GR, Sommer A, Natadisastra G, Santos E, Gadomski A, Kjolhede C. Training manual assessment of vitamin A status by impression cytology. ICEPO, Dana Center for Preventive Ophthalmology 1988;1-25.
 42. Congdon NG, West KP Jr. Physiologic indicatives of vitamin A status. *J Nutr* 2002; 132: 2889S- 2894S.
 43. Páez MC, Solano L, Del Real S. Indicadores de riesgo para la deficiencia de vitamina A en menores de 15 años de una comunidad marginal de Valencia, Venezuela. *Arch Latinoam Nutr.* 2002; 52: 12-19.
 44. Blomhoff R. Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr Rev* 1994; 52:13S-23S.
 45. Van Pelt AM, van den Brink CE, de Rooij DG, van der Saag PT. Changes in retinoic acid receptor messenger ribonucleic acid levels in the vitamin A-deficient rat testis after administration of retinoids. *Endocrinology* 1992; 131: 344-350.
 46. Harada H, Miki R, Masushige S, Kato S. Gene expression of retinoic acid receptors, retinoid -X receptors, and cellular retinobinding protein I in bone it's regulation by vitamin A. *Endocrinology* 1995; 136: 5329-5335.
 47. Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin 10. *Immunol today.* 1992; 13: 198-200.
 48. Uni Z, Zaiger G, Reifen R. Vitamin A deficiency induces morphometric changes and decreased functionality in chicken small intestine. *Br J Nutr* 1998; 80: 401-407.
 49. Colavita AM, Hastie AT, Musani AI, Pascual RM, Reinach AJ, Lustine HT, Galati SA, Zangrilli JG, Fish JE, Peters SP. Kinetics of IL-10 production after segmental antigen challenge of atopic asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:880-886.
 50. Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 108:1434-1444.
 51. Berg DJ, Lynch NA, Lynch RG, Lauricella DM. Rapid development of severe hyperplastic gastritis with gastric epithelial dedifferentiation in *Helicobacter felis* -infected IL-10^{-/-} mice. *Am J Pathol* 1998; 152: 1377-1386.
 52. Zingarelli B, Yang Z, Hake PW, Denenberg A, Wong HR. Absence of endogenous interleukin 10 enhances early stress response during post-ischaemic injury in mice intestine. *Gut* 2001; 48: 610-622.
 53. Cui D, Moldoveanu Z, Stephensen CB. High-level dietary vitamin A enhances T-helper type 2 cytokine production and secretory immunoglobulin A response to Influenza A virus infection in BALB/c mice. *J Nutr* 2000; 130: 1132-1139.
 54. Wiedermann U, Hanson L, Kahu H, Dahlgren. Aberrant T-cell function *in vitro* and impaired T-cell dependent antibody response *in vivo* in vitamin A deficient rats. *Immunology* 1993; 80: 581-586.