

Efecto de la recuperación nutricia sobre la concentración de Interleucina-2 en niños con desnutrición grave

Edgar Vásquez-Garibay, Katja Stein, Concepción Méndez-Estrada, Elías Pérez-Becerra, Enrique Romero-Velarde, Isabel Ibarra Gutiérrez, Miguel Ángel Ortiz Ortega, Trinidad García Iglesias

Instituto de Nutrición Humana & Laboratorio de Inmunología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara; Unidad de Estudios de Nutrición Infantil, Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan I. Menchaca"; Unidad de Patología Clínica AC, Guadalajara, Jalisco, México

RESUMEN. El niño con desnutrición grave tiene una disfunción de la respuesta inmune que puede aumentar de manera significativa la morbilidad y la mortalidad por infecciones. Por ello, el objetivo del presente estudio fue demostrar el efecto del apoyo nutricional intensivo en la concentración en suero y celular de IL-2 y sub-poblaciones de células CD4⁺, y CD8⁺ T en niños con desnutrición proteínico-energética grave. En un ensayo clínico se incluyeron 10 niños con desnutrición primaria grave, menores de 48 meses de edad, quienes recibieron una fórmula sin lactosa por alimentación enteral continua por dos semanas y dos semanas más *ad libitum*. Se obtuvieron la concentración sérica y celular de IL-2 y las sub-poblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en los casos y en un grupo control (n = 13). Con la prueba t de student pareada se compararon los valores inicial vs. final de los sujetos y se utilizó la prueba U-Mann-Whitney para la comparación con el grupo control. Se rechazó la hipótesis nula con una p < 0,05. Se observó un incremento notable inicial vs. final en el porcentaje de expresión celular de IL-2 (p < 0,001) y en la concentración sérica de esta citocina (p = 0,001). Por tanto, cuatro semanas de apoyo nutricional intensivo fueron suficientes para mostrar un incremento significativo en la producción de IL-2, independientemente de los nutrientes involucrados, aunque aparentemente este incremento dependió de la gravedad de la DPE.

Palabras clave: Niños, desnutrición, recuperación nutricia, IL-2.

SUMMARY. Effect of the nutritional recovery on the concentration of Interleukin-2 in severely malnourished children.

The severely malnourished child has dysfunction of the immune response that may increase the risk of morbidity or mortality due to infectious diseases, therefore, the purpose of this study was to demonstrate the effect of intensive nutritional support on the cellular and serum concentration of IL-2 and CD4⁺, as well as CD8⁺ T cells in children with severe protein energy malnutrition. A clinical assay was carried out in a tertiary care hospital. 10 severely malnourished children < 48 months of age who received formula without lactose via enteral feeding for two weeks and *ad libitum* for an additional two weeks were included. Cellular and serum concentrations of IL-2 and the subpopulation of CD4⁺ and CD8⁺ were obtained. A control group (n = 13) was included. A paired student t test for initial-final determinations and the Mann-Whitney Test for comparison with control group were used, and null hypothesis was rejected with a p value < 0,05. There was a noteworthy increase in the comparison between the initial vs. final percentage of the cellular expression of IL-2 (p < 0,001) and in the serum concentration of IL-2 (p = 0,001). Therefore, four weeks of nutritional recovery significantly restored the production of IL-2, independently of the nutrients involved in the process, although, the rate of restoration seems to depend on the severity of the children primary PEM.

Key words: Children, malnutrition, nutritional recovery, IL-2.

INTRODUCCION

La etapa lactante se caracteriza por un crecimiento muy acelerado, gran demanda de nutrientes y una mayor susceptibilidad a la Desnutrición Proteínico-Energética (DPE) primaria grave, enfermedad endémica que padecen aún millones de seres humanos en países subdesarrollados (1, 2). La DPE grave afecta la inmunidad celular, la producción de anticuerpos, la secreción de IgA y la producción de citocinas (3). También se ha observado depleción marcada de linfocitos CD4⁺ (4), afectación en la producción de linfocitos, la fagocitosis, la actividad microbicida y la producción de Interleucina-2 (IL-2) (2, 5). La IL-2, es un factor de crecimiento producido por estimulación antigénica de los

linfocitos T y es producida por las sub-poblaciones de CD4⁺ T y en menor medida de CD8⁺. La IL-2 es responsable de la proliferación de células antígeno-específicas y de su mecanismo autócrino. También puede funcionar como un factor de crecimiento parácrino, estimulando las células T adyacentes mientras que promueve la producción y diferenciación de otras células inmunológicas, particularmente la función citolítica de las células asesinas (6).

Por tanto, el propósito de esta comunicación es reportar el efecto de cuatro semanas de apoyo nutricional intensivo sobre la producción celular de IL-2, su concentración sérica y la proliferación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ T en niños con DPE primaria grave.

SUJETOS Y METODOS

Se llevó a cabo un ensayo clínico no aleatorizado, de casos consecutivos, donde se incluyeron solo niños que habían sido recién nacidos de término, con peso al nacer > 2500 g, de seis a 48 meses de edad, con DPE primaria grave. Cuando los niños presentaron los índices peso/edad y peso/longitud abajo de - 3 DE de la mediana de referencia (7, 8), o cuando presentaban edema o el cuadro clínico de kwashiorkor o marasmo-kwashiorkor independientemente del déficit peso/edad o peso/longitud fueron incluidos en el estudio. La DPE se definió como primaria cuando la causa de la desnutrición fue una inadecuada e insuficiente ingestión de nutrimentos asociada o no a infecciones repetidas de vías respiratorias superiores o episodios diarreicos frecuentes.

El ensayo clínico se realizó una vez que las condiciones iniciales de gravedad se habían estabilizado y los niños se encontraban libres de infección, diarrea o cualquier enfermedad que pudiera alterar la recuperación nutricional. Los sujetos fueron alimentados con una fórmula láctea de inicio sin lactosa (Nestlé®) con la adición de miel de maíz para incrementar la densidad energética a ~ 0,8 kcal/mL. Al inicio se incluyeron 16 sujetos. Tres fueron excluidos por las siguientes razones: mucoviscidosis, diagnosticada dos semanas después del ingreso, otro por deterioro de su desnutrición y uno más por fallecimiento. Tres fueron excluidos por dificultades técnicas de laboratorio. Con el propósito de comparar los indicadores de respuesta inmune con un grupo testigo, se incluyeron 13 niños no desnutridos, sanos de 12 a 48 meses de edad que acudieron de manera espontánea a la consulta externa del mismo hospital por entidades no infecciosas o enfermedades crónicas que pudieran influir los resultados.

Variables dependientes

Leucocitos cel/ μ L, linfocitos (%), células T CD4⁺ y CD8⁺ (%), proporción CD4⁺/CD8⁺, porcentaje de expresión intracelular de IL-2 y concentración sérica de IL-2 (pg/mL).

Variables independientes e intervinientes

La fórmula láctea de inicio sin lactosa; (Nestlé®), edad (meses); sexo (M/F), el período de recuperación nutricional, tipo de desnutrición, con edema, peso/edad y peso/longitud > - 3 DE (kwashiorkor); con edema, peso/edad y peso/longitud < - 3 DE (marasmo-kwashiorkor) y sin edema, peso/edad, y peso/longitud < - 3 DE (marasmo).

Administración de la fórmula

La fórmula fue colocada en una bolsa de alimentación de 500 mL (Pisa®) e introducida mediante un tubo de alimentación nasogástrica (D-731 o 732, Desvar de Mexico, S.A.) y dada al niño con bomba de infusión continua (Braun®).

Después del 5° día se incrementó la cantidad de fórmula para suministrar alrededor de 200 kcal/kg/d de energía y 4 g/kg/d de proteínas. Al inicio de la tercera semana, fueron alimentados *ad libitum* con biberón y los niños mayores de 12 meses iniciaron con alimentación complementaria en papilla (cereal, y/o verduras mezcladas con la misma fórmula). Antes y después de cada alimentación el biberón con fórmula y el recipiente con la alimentación complementaria fueron pesados en una balanza analítica (Ohaus®). Cada día se calculó la ingestión total de fórmula, alimentación complementaria, energía y proteínas.

La cantidad de fórmula administrada aseguró la cantidad de agua, energía, proteínas y otros nutrimentos durante las dos semanas de alimentación enteral por lo que no se suministraron otros alimentos. Esto se debió a que en este periodo incluso en lactantes mayores de 12 meses de edad con DPE primaria grave tienen un índice peso/edad muy bajo y prácticamente todos rechazan los alimentos por hiporexia extrema o porque la alimentación por vía oral es muy pobre. Desde el primer día todos los niños recibieron una dosis oral de vitaminas (1 mL) (vitamina A 5000 UI, vitamina D 1000 UI, vitamina C 50 mg, tiamina 1 mg, riboflavina 0,8 mg, niacina 6 mg) y ácido fólico (0,5 mg). A partir del sexto día se agregó hierro elemental a dosis de 3 mg/kg. Después, dependiendo del nuevo peso, se ajustó la ingestión de energía y proteínas a 200/Kcal/d y 4 g/kg/d respectivamente.

Mediciones antropométricas

Al inicio del estudio y después cada semana se llevaron a cabo las siguientes mediciones por dos observadores entrenados y calificados (EVG, KS): Todos los niños fueron pesados y medidos con el mismo procedimiento. Peso: los sujetos fueron pesados sin ropa en una báscula calibrada (Bame model 440, México, con mínimo de 5 g). La longitud de cada sujeto se obtuvo mediante un infantómetro con una lectura cercana a 0,1 cm como se ha descrito (9). Se calcularon los índices peso/edad, longitud/edad y peso/longitud y se expresaron en puntuaciones Z.

Procesamiento de muestras

Las muestras de sangre fueron obtenidas a las 07:00 am por veno-puntura ante-cubital y colectadas en el siguiente orden: Primero, antes del inicio de la intervención, después a las cuatro semanas (dos semanas de alimentación enteral y dos semanas de alimentación *ad libitum*). Se incluyó un grupo control en las condiciones previamente descritas. Se obtuvo sangre periférica para obtener células mono-nucleares a través de gradiente de separación Lymphoprep con una densidad de 1,007 (Nycomed™) y lavadas dos veces con una solución salina buffer de fosfatos (PBS) e inmediatamente después se realizó el cultivo de células. En cada experimento las células mono-nucleares de los sujetos de estudio se compararon con un control.

Citometría de flujo

Para evaluar la expresión de las sub-poblaciones CD4⁺ y CD8⁺, se tomaron 100 µL de sangre total heparinizada y se adicionaron 5µL de anticuerpos monoclonales conjugados con fluoro-cromos: Isotiocianato de fluoresceína (FITC) para el anticuerpo CD3⁺ y fico-eritrina (PE) para CD4⁺. Como control se utilizaron isotipos tipo IgG1 conjugados con los fluoro-cromos previamente descritos, se incubaron durante 20 min. y posteriormente se utilizó un Kit buffer de lisis inmuno-prep (anticuerpos y buffer todos de Beckman- Coulter TM). Los resultados se evaluaron por citometría de flujo en un equipo Beckman Coulter EPIX-XL-5 y descritos como porcentaje de expresión.

Cultivo celular y estimulación

Para evaluar la expresión de la IL-2 en células T se realizaron cultivos de células mono-nucleares purificadas con el gradiente previamente descrito. Se sometieron a cultivo durante seis horas en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SIGMA TM), antibiótico 10 U/mL penicillina, 10 µg/mL estreptomina (GIBCO TM), y estimulada con PMA (SIGMA TM) 50 ng/mL, Ionomicina (SIGMA TM) 1 µg, y se adicionaron 250 µg/mL de Ionophoro A (SIGMATM) 23187. A las células estimuladas se adicionaron 5 µL de anticuerpo CD3⁺ conjugada con FITC; posterior a dos lavados se agregó solución buffer de permeabilización que contiene saponina al 0.1% y se incubó por 5 min. Posteriormente, se adicionaron 5 µL de anticuerpo anti IL-2 con fluoro-cromo de PE; las células se lavaron y fijaron con formaldehído al 0.05% y los resultados fueron obtenidos por citometría de flujo en un citómetro (Beckman Coulter EPIX-XL-5).

ELISA

La concentración sérica de IL-2 se cuantificó mediante Kit de Elisa de alta sensibilidad de (R&DTM) y se tomó la lectura en un lector de ELISA; los resultados fueron expresados en pg/mL.

Análisis estadístico

Se obtuvieron estadísticas descriptivas y se utilizó la prueba t de Student pareada para la comparación inicial vs. final de los sujetos estudiados y la prueba no-paramétrica Mann Whitney U-Test para la comparación de los sujetos vs. Grupo control en los dos estadios (inicial y final) del ensayo clínico considerando la dispersión de las varianzas. Se utilizaron los programas Excel, Epi-Info 2000, versión 1,0 y SPSS-10 para Windows para la captura, procesamiento y análisis de datos. Se rechazó la hipótesis nula con una $p \leq 0,05$.

Consideraciones éticas

El protocolo para el ensayo clínico fue enviado y aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan I. Menchaca". Los padres o personas legalmente responsables fueron informados del protocolo de estudio y una vez seleccionados fueron admitidos en la sala metabólica de la Unidad de Estudios de Nutrición Infantil. Los niños quedaron a cargo de personal especializado las 24 horas del día.

RESULTADOS

Cuatro sujetos presentaron marasmo, tres marasmokwashiorkor y tres kwashiorkor sin observar diferencias en las concentraciones de IL-2 y sub-poblaciones de linfocitos entre los tres tipos de desnutrición, probablemente por el pequeño número de sujetos en cada grupo. La Tabla 1 muestra las características físicas de los sujetos y controles y los índices antropométricos. La edad promedio fue de $20,9 \pm 9,8$ y $25,7 \pm 12,1$ meses de edad en los sujetos y grupo control respectivamente. La comparación de los valores iniciales de expresión de IL-2 (%) y concentración sérica de IL-2 (pg/mL), mostraron que fueron significativamente menores en los sujetos vs. controles ($p = 0,013$), Tabla 2. En la comparación de los valores finales la concentración sérica de IL-2 (pg/mL) permaneció más baja en los sujetos vs. controles ($p = 0,013$), Tabla 3. El cambio más relevante fue el incremento significativo inicial vs. final de IL-2 (%) y suero IL-2 (pg/mL), Tabla 4.

TABLA 1
Características físicas de los sujetos. Promedio \pm DE *

Indicador	Casos (n = 10)		Controles (n = 13)	
Edad (meses)	20,9	9,8	25,7	12,1
Peso (g)				
Al inicio	6441	1230	12006	3460
Cuatro semanas	9039	1704		
Longitud (cm)				
Al inicio	71,2	4,4	83,9	11,3
Cuatro semanas	72,8	4,2		
Peso / Edad (Z)				
Al inicio	- 3,87	0,77	- 0,31	1,12
Cuatro semanas	- 1,86	0,88		
Longitud / edad (Z)				
Al inicio	- 3,18	1,12	- 0,60	0,86
Cuatro semanas	- 2,89	1,07		
Peso / longitud (Z)				
Al inicio	- 2,81	0,83	0,14	1,18
Cuatro semanas	- 0,25	0,95		

* Promedio \pm Desviación estándar

TABLA 2

Sub-poblaciones de linfocitos e IL-2. Comparación inicial:
Promedio \pm EEM *

Indicador	Casos (n = 10)		Controles (n = 13)	
Leucocitos (cel/ μ L)	11970	1670	8938	874
Linfocitos (%)	45,6	5,1	49,4	3,1
CD4+ (%)	42,3	2,7	44,5	4,1
CD8+ (%)	23,4	1,7	25,8	2,8
CD4/CD8	1,89	0,18	2,15	0,49
IL-2 (cel/ μ L)	558 ‡	109	1132	174
IL-2 (%)	12,1 †	2,5	25,0	1,9
IL-2 Sérica (pg/mL)	26,4 **	10,4	109,5	6,7

* Promedio \pm Error estándar del promedio

Casos vs. controles, ‡ p = 0,013; † p = 0,002; ** p < 0,001

TABLA 3

Sub-poblaciones de linfocitos e IL-2. Comparación final:
Promedio \pm EEM *

Indicador	Casos (n = 10)		Controles (n = 13)	
Leucocitos (cel/ μ L)	10880	1251	8938	874
Linfocitos (%)	49,1	3,0	49,4	3,1
CD4+ (%)	37,6	2,4	44,5	4,1
CD8+ (%)	25,5	2,4	25,8	2,8
CD4/CD8	1,67	0,29	2,15	0,49
IL-2 (cel/ μ L)	1079	146	1132	174
IL-2 (%)	23,0	3,9	25,0	1,9
IL-2 Sérica (pg/mL)	79,0 ‡	21,8	109,5	6,7

* Promedio \pm Error estándar del promedio; ‡ Casos vs. Controles, p = 0,013;

TABLA 4

Sub-poblaciones de linfocitos e IL-2. Comparación Inicial
vs. Final. Promedio \pm EEM *
Casos (n = 10)

Indicador	Inicial		Final		P
Leucocitos (cel/ μ L)	11970	1670	10880	1251	0,524
Linfocitos (%)	45,6	5,1	49,1	3,0	0,377
CD4+ (%)	42,3	2,7	37,6	2,4	0,178
CD8+ (%)	23,4	1,7	25,5	2,4	0,325
CD4 / CD8	1,89	0,18	1,67	0,29	0,054
IL-2 (%)	12,1	2,5	23,0	3,9	0,000
IL-2 (cel/ μ L)	558	108	1080	146	0,000
IL-2 (sérica ng/mL)	26,4	10,4	79	21,8	0,001

* Error estándar del promedio

DISCUSION

Después del periodo de recuperación nutricia la concentración sérica de IL-2 (pg/mL) en el grupo de casos permaneció persistentemente más baja que en los controles. Sin embargo, la elevación significativa de los valores de expresión de IL-2 (%) y la concentración sérica de IL-2 (pg/mL) al finalizar las cuatro semanas de recuperación nutricia sugieren que una adecuada recuperación nutricia tiene una influencia decisiva en este proceso pro-inflamatorio de respuesta inmune en lactantes y preescolares con DPE grave, independientemente de reconocer cuál o cuáles son los nutrimentos que más influyen en esta mejoría. Asimismo, se observó una proporción mayor, casi significativa (p = 0,054) de linfocitos T CD4⁺ sobre CD8⁺. Es sabido que estos niños con desnutrición grave están sometidos a la estimulación de múltiples antígenos lo cual activa la secreción de IL-2, y en consecuencia propicia la expansión clonal y la diferenciación celular con acción efectora de las células CD4⁺ sobre macrófagos y linfocitos B, células encargadas de la inmunidad innata y humoral (6).

Se ha observado que bajo condiciones normales de nutrición algunos nutrimentos específicos pueden afectar la concentración de citocinas en seres humanos (10, 11). Lofty et al (12) estudiaron 40 niños, de cinco a 20 meses de edad con DPE grave y 20 niños sanos con buen estado nutricional. Encontraron que las células mono-nucleares de pacientes con DPE produjeron menos IL-1 e IL-2 aunque el número total de linfocitos en estos pacientes era significativamente más elevada que en los niños sanos, indicando que el daño en niños con DPE grave es más numérico que funcional. Asimismo, se ha observado que la suplementación con Vitamina E (presente en la fórmula utilizada), tanto en roedores como en adultos sanos, aumenta la proliferación de linfocitos inducidos por mitógenos, la producción de IL-2 y la proporción y la proliferación de células T CD4⁺/CD8⁺ (13-16). Por otra parte, la disminución de la respuesta inmune mediada por células y el incremento en la frecuencia de infección en sujetos deficientes de zinc podría ligarse al efecto del Zinc en la producción de citocinas, especialmente IL-2 (17). Los niños que reciben suplementación con Zinc tienen un número significativamente mayor de células CD4⁺CD3⁺ en sangre periférica y una mejoría en la inmunidad mediada por células T (18). El Zinc contenido en la fórmula utilizada fue de 0,75 mg/100 kcal.

La evaluación de marcadores de respuesta inmune durante el proceso de recuperación nutricia en niños con DPE primaria grave nos permite entender cómo ciertos métodos de manejo dietético, o bien el uso de alimentos o nutrimentos específicos pueden influir significativamente en la respuesta inmune de una manera directa o indirecta. Esta evaluación nos permitiría identificar cuáles marcadores podrían ser utilizados como

indicadores de recuperación de la DPE primaria grave durante el periodo de apoyo nutricional intensivo. Sin embargo, el reto principal implica reconocer que las adecuaciones nutrimentales o el uso de ciertos alimentos probablemente modifiquen más de un aspecto de la respuesta inmune (19), por lo cual sería necesario controlar el papel que cada nutriente desempeña en los mecanismos de respuesta inmune sin desconocer los efectos potenciales de interacción entre los distintos nutrientes. Desde luego que el estudio de cada nutriente por separado sería prácticamente imposible en humanos y éticamente inadmisibles.

En conclusión, el presente estudio demostró la hipótesis alterna de que un periodo de cuatro semanas de apoyo nutricional intensivo y adecuado con dos semanas de alimentación enteral continua y dos semanas de alimentación *ad libitum*, con el uso de una fórmula láctea de inicio sin lactosa diseñada para lactantes, fue capaz de restaurar la capacidad de expresión celular y mejorar significativamente la concentración sérica de IL-2. No obstante, después del periodo de estudio (cuatro semanas) la concentración sérica de IL-2 fue aún significativamente menor que en los controles de la misma edad. Por tanto, es probable que: a) Se requiera más tiempo para que un niño con DPE primaria grave restaure totalmente la respuesta inmune, especialmente aquella donde participen mediadores como la IL-2; b) Que sea necesario utilizar suplementos con uno o más nutrientes específicos que tengan una influencia directa sobre la producción de IL-2; y c) Que la velocidad de restauración total de la respuesta inmune dependa de la gravedad de la desnutrición del niño.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen sinceramente la dedicación y la asistencia mostrada por las enfermeras de la sala metabólica María Martha Ruelas Buenrostro y Angélica Manzo Deniz, y el excelente apoyo técnico de la Srta. Zaira Isabel Olguín Maciel.

REFERENCIAS

1. Fomon SJ and Nelson SE. Size and growth. En: Fomon SJ. Ed. Nutrition of Normal infants. St Louis, USA: Mosby Year Book, Inc. 1993: pp. 36-83.
2. UNICEF. Estado mundial de la infancia. Ed C. Bellamy. Ginebra., 1998
3. Chandra RK. Protein-energy malnutrition and immunological response. J Nutr. 1992; 52: 462-67.
4. Pizzini RP, Kumari S, Kulkarni AD, Rudolph FB and Van Buren CT. Dietary nucleotides reverse malnutrition and starvation-induced immunosuppression. Arch Surg. 1990; 12: 86-90.
5. Vásquez-Garibay E, Campollo O, Romero VE, Méndez EMC, García IMT, Alvizo MJE et al. Effect of renutrition on natural and cell-mediated immune response in infants with severe malnutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2002; 34: 296-301.
6. Abbas AK and Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5th Edition. Philadelphia, PA, USA: Saunders, 2003: pp. 165, 243-247, 264-266.
7. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana. NOM-031-SSA2-1999, para la atención a la salud del niño. Diario Oficial de la Federación, 22 de septiembre de 2000: pp. 1-42.
8. World Health Organization. Measuring change in nutritional status. Guidelines for assessing the nutritional impact of supplementary feeding programmes for vulnerable groups. Geneva, 1996.
9. Fomon SJ. Nutritional disorders of children. Rockville, Maryland: US Department of Health, Education and Welfare, Bureau of Community Services. 1977: pp. 1-66.
10. Mire-Sluis AR, Gaines-Das R and Thorpe R. Immunoassays for detecting cytokines: what are they really measuring? J Immunol Methods 1995; 186: 157-160
11. Beisel WR (1995). Herman Award Lecture, 1995: infection-induced malnutrition—from cholera to cytokines. Am J Clin Nutr. 1995; 62: 813-9.
12. Lotfy OA, Saleh WA and Barbari M. A study of some changes of cell-mediated immunity in protein energy malnutrition. J Egypt Soc Parasitol. 1998; 28: 413-28.
13. Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, Leka LS, Siber G, Loszewski R et al. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. J Am Med Assoc. 1997; 277: 1380-1386.
14. Lee CY and Man-Fan WJ (1997): Vitamin E supplementation improves cell mediated immunity and oxidative stress of Asian men and women. J Nutr. 1997; 130: 2932-37.
15. Moriguchi S and Itoh T. Vitamin E enhances T cell differentiation through increased epithelial cell function in rat thymus. Nutr Res. 1997; 17: 873-883
16. Sakai S and Moriguchi S. Long-term feeding of high vitamin E diet improves the decreased mitogen response on the rat splenic lymphocytes with aging. J Nutr Sci Vitaminol. 1997; 43: 113-122.
17. Winttergerst ES, Maggini S, Horning DA. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. Ann Nutr Metab. 2006; 50(2): 85-94.
18. Sasawal S, Jalla S, Mazumder S, Sinha A, Black RE and Bhan MK. Zinc supplementation on cell-mediated immunity and lymphocyte subsets in preschool children. Indian Pediatr. 1997; 34: 589-597.
19. Field CJ, Thomson CA, Van Aerde JE, Parrott A, Euler A, Lien E and Clandinin MT. Lower proportion of CD45R0+ cells and deficient interleukin-10 production by formula-fed infants, compared with human-fed, is corrected with supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2000; 31: 291-99.

Recibido: 05-03-2008

Aceptado: 14-06-2008