Respuesta inmune celular como indicador biológico de deficiencia de zinc: en pacientes con fenilketonuria

Marianela Arévalo N.¹; Valeska Simón Z.²; Marcia Cortés G.¹; Verónica Cornejo E.³; Liana Schlesinger F.⁴

Cell-mediated immune response as a biological indicator of zinc deficiency: phenylketonuria as a study model

Contradictory information exists in relation to zinc nutritional status in phenylketonuria. The objective of this study was to confirm that there is indirect evidence of zinc deficiency in patients with phenylketonuria as measured by the effect of zinc supplementation on cell-mediated immune response. Delayed cutaneous hypersensitivity reaction and lymphoproliferative response to phytohemagglutinin was determined in eight phenylketonuric children under specific nutritional management (low phenylalanine diet) before and after zinc acetate supplementation. Two of eight patients had a positive cutaneous response at admission and six became positive after zinc supplementation. This difference was statistically significant ($p < 0.05$ Mac Nemar test). Lymphoproliferative response to PHA was also significantly increased at the end of zinc supplementation, from a stimulation index at PHA 5µg/culture 52.4 (11-246) to 315 (263-376) (mean, 1 SD range, $p < 0.05$ T-par). The improvement of cell mediated immune response after zinc supplementation, suggests that zinc deficiency is present in phenylketonuric patients treated with low phenylalanine diets.

(Key words: cell-mediated immune response, zinc nutritional status, phenylketonuria, phenylalanine.)

La fenilketonuria (PKU) es una enfermedad metabólica que se caracteriza por ausencia de actividad de la enzima fenilalaninohidroxilasa, que determina una incapacidad de transformar fenilalanina en tirosina. Cuando el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes no se realiza precozmente se produce daño cerebral severo^{1,2}. Se ha demostrado que dietas pobres en fenilalanina son el tratamiento adecuado para los sujetos con PKU³. El contenido de proteínas y minerales traza en este tipo de dietas no satisfacen los requerimientos nutricionales de estos pacientes, lo que

se traduce en una desnutrición secundaria, que se acompaña de deficiencia de minerales como zinc y hierro, entre otros⁴. En la fenilketonuria existen datos contradictorios en cuanto a nutrición de zinc. Algunos estudios demuestran niveles de zinc plasmático disminuidos en estos pacientes⁵, en cambio otros muestran niveles normales de este mineral traza⁶. Los criterios usados en la actualidad para hacer el diagnóstico de deficiencia de zinc han sido básicamente las mediciones de zinc en pelo y plasma y la respuesta biológica frente a la administración de este mineral traza. El zinc desempeña un rol fundamental sobre la respuesta inmune, su deficiencia determina atrofia del tejido linfoide, negativización de las reacciones cutáneas de hipersensibilidad retardada, disminución de la capacidad proliferativa de linfocitos frente a mitógenos y antígenos, alteración de la quimiotaxis de polimorfonucleares y monocitos⁷. Los efectos de la deficiencia de zinc han sido estudiados especialmente en acrodermatitis enteropática, enfermedad congénita en que existe un defecto de la absorción de zinc. Esta afección se acompaña de inmunodeficiencia, la

1. Tecnólogo Médico. Unidad de Inmunología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile.
2. Técnico Químico Laboratorista. Unidad de Inmunología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile.
3. Nutricionista. Unidad de Genética y Enfermedades Metabólicas. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile.
4. Médico, Unidad de Inmunología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile.

que se corrige con la administración de este mineral traza^{8,9}. También se ha observado deficiencia de zinc en pacientes que reciben hiperalimentación parenteral prolongada, en el paciente anciano y en sujetos con inmunodeficiencia común variable^{10,11}.

El objetivo del presente estudio fue confirmar si existe evidencia indirecta de déficit de zinc en pacientes con PKU, evaluando el efecto que ejerce la suplementación de zinc sobre la respuesta inmune celular.

Material y Método

Se evaluó la respuesta inmune celular en ocho niños fenilketonúricos antes y después de tres meses de suplementación con acetato de zinc, en dosis de 0,5 mg/kg/día administrado entre las comidas. El grupo en estudio estaba constituido por ocho pacientes fenilketonúricos, cinco hombres, cuyas edades fluctuaban entre 2 y 18 años. Todos los pacientes eran controlados en la policlínica de enfermedades metabólicas del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile (INTA), donde se les indicó una dieta pobre en fenilalanina. Esta consistía en leche de vaca en polvo diluida (Purita®) que proporcionaba 0,7 a 1 g de proteína/kg/día y un aporte calórico de 90 a 140 calorías/kg/día, para lo cual los niños recibieron suplementos de maltosa dextrina hasta 20% del total de calorías. Todos los pacientes recibieron permanentemente suplementos de hierro, calcio y vitaminas. Se evaluó el estado nutricional determinando peso y talla (mediciones efectuadas por una enfermera universitaria) al ingreso y después de tres meses de suplementación con zinc. Los resultados se analizaron empleando el porcentaje de adecuación peso para edad (P/E) y talla para edad (T/E) utilizando las tablas del NCHS. Se midieron los niveles de fenilalanina por el método de Guthrie¹² antes y después de finalizada la suplementación con zinc.

La respuesta inmune celular se evaluó mediante prueba cutánea de sensibilidad retardada, respuesta linfoproliferativa a fitohemaglutinina y determinación de subpoblaciones linfocitarias. La prueba de hipersensibilidad retardada se realizó mediante el Multitest CMI de Rhodia Meriux¹³, que contiene un conjunto de 7 antígenos (proteus, tricofitón, candida, tétanos, difteria, estreptococo y tuberculina) y un control de glicerina; se consideró como respuesta positiva la presencia una induración > 2 mm a tres o más de los antígenos empleados, 48 h después de su aplicación. La capacidad de respuesta proliferativa de los linfocitos frente a fitohemaglutinina (PHA) se realizó previa separación de leucocitos por gradiente de Ficoll Hypaque. Los linfocitos se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de PHA a 37°C en ambiente húmedo, 95% de aire y 5% de CO₂. Como control se realizaron cultivos sin estimular en las mismas condiciones antes señaladas y todos los cultivos se efectuaron en triplicado. La capacidad proliferativa se determinó midiendo la incorporación de timidina tritiada a DNA celular y los resultados se expresaron como índice de estimulación, que es la razón entre cuentas por minuto (cpm)

en cultivos estimulados con PHA y cpm en cultivos sin estimular¹⁴. Las subpoblaciones de linfocitos T se cuantificaron incubando 0,5-10⁶ linfocitos en medio RPMI 1640 suplementado con 1% de albúmina, en presencia de anticuerpos monoclonales DAKO-T3 para linfocitos T totales, DAKO-T4 para linfocitos ayudadores y DAKO-T8 para linfocitos T supresores/citotóxicos (Dako Corporation) por un período de 60 min a 4°C; después de tres lavados el complejo se incubó con un anticuerpo conjugado con fluoresceína (Kallestad) durante 40 min a 4°C y se determinó el número de linfocitos marcados con fluoresceína contando un total de 200 células^{15,16}.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico SAS (Institute Inc, Cary, NC). Se emplearon pruebas pareadas de t y ensayo de Mac Nemar.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos y la incorporación de los pacientes al mismo se realizó con consentimiento informado de los padres.

Resultados

Las relaciones P/E y T/E y la fenilalanina sérica se mantuvieron constantes entre el inicio y el término de la suplementación con zinc (tabla 1).

Antes de la suplementación de la dieta con zinc, sólo dos pacientes mostraban respuestas positivas de hipersensibilidad cutánea retardada, número que aumentó a ocho después de recibir zinc ($p < 0,05$).

Se observó un claro aumento de la respuesta linfoproliferativa a PHA al término de la suplementación con zinc (tabla 2), estadísticamente significativo en las concentraciones de 2,5; 5 y 10 µg de PHA por cultivo. El número de linfocitos T totales, T ayudadores y T supresores/citotóxicos no presentó variaciones durante el estudio, manteniéndose sus valores dentro del margen normal para la edad en todos los pacientes evaluados.

Comentario

Este estudio sugiere que los pacientes con PKU presentan déficit de zinc, por el aumento de la respuesta linfoproliferativa frente a PHA y la positividad de las reacciones cutáneas de hipersensibilidad retardada, después de suministrar zinc.

Existe escasa información sobre la respuesta inmune celular en pacientes con PKU. El único trabajo publicado muestra que no existe altera-

Tabla 1

Características clínicas y de laboratorio de los pacientes fenilquetonúricos

Paciente	Sexo	Edad (años)	Antes de zinc			Después de zinc		
			Fenilalanina* (mg %)	P/E	T/E**	Fenilalanina (mg %)	P/E	T/E
1	M	3	28	91,9	99,3	18-20	91,8	96,2
2	F	6	>20	98,0	94,3	14-16	98,1	93,7
3	M	14	> 20	71,3	90,1	> 20	70,1	89,5
4	M	6	12-14	78,7	92,8	> 22	74,2	91,6
5	F	2	2-4	70,1	90,0	2-4	88,6	92,8
6	M	3	10-12	78,1	90,4	18-20	80,4	91,2
7	M	18	> 20	61,7	87,0	> 20	64,8	87,0
8	F	13	8-10	79,4	91,0	8-10	82,7	90,6

* Valores aceptables de fenilalanina sérica en niños con fenilketonuria según edad:

< 10 mg% para menores de 10 años, entre 15 y 20 mg% de 10 a 25 años.

** P/E y T/E calculado por el porcentaje de adecuación al percentil 50 de las tablas NCHS.

Tabla 2

Respuesta linfoproliferativa a fitohema glutinina en pacientes fenilketonúricos

	Concentración de PHA (μ g)/cultivo					
	0,62	1,25	2,5	5,0	10	20
Pre-zinc*	28,4 (6,2-131)	42,8 (8-226)	41,2 (7-240)	52,4 (11-246)	34,8 (7-174)	19,6 (4,2-92)
Post-zinc	138 (91-209)	261 (193-353)	328 (283-380)	315 (263-376)	213 (145-312)	96 (54-169)
p**	ns	ns	< 0,05	< 0,05	< 0,05	ns

* Resultados expresados como índice de estimulación. Las cifras corresponden al promedio geométrico, entre paréntesis el margen de una desviación estándar.

** Prueba de t-pareado.

ción de la respuesta cutánea de hipersensibilidad retardada, del número de linfocitos T y de la capacidad proliferativa de linfocitos frente a PHA¹⁷. Sin embargo, los investigadores no realizaron una curva dosis-respuesta e incluso no señalan la concentración de mitógeno utilizado¹⁷. En nuestro estudio realizamos una curva dosis-respuesta frente a PHA en cada paciente, antes y después de la suplementación con zinc. La respuesta obtenida a continuación del suministro del mineral fue similar a la observada en 12 sujetos controles adultos eutróficos sanos, cuyo índice de estimulación, expresado como promedio geométrico y margen del 1 DE fue 149 (98-228).

Otro hecho interesante es que, después de la suplementación con zinc, en 75% de los niños

se hizo positiva su respuesta cutánea de hipersensibilidad retardada. Cabe señalar que los pacientes no recibieron vacunas, ni sufrieron enfermedades intercurrentes durante el período en que se realizó el estudio. Se utilizó la prueba múltiple con siete antígenos diferentes, con el objeto de obviar el efecto reforzador que pudiera determinar el uso aislado del PPD. Sin embargo, se ha señalado que no existirían evidencias definitivas de que la repetición de una prueba cutánea provoque positivización de la reacción cutánea de hipersensibilidad retardada¹⁸.

Estos hallazgos sugieren que los pacientes fenilketonúricos presentan deficiencia de zinc. En nuestro estudio no fue posible medir la con-

centración de zinc en suero, sin embargo ésta no es un indicador que permita definir el estado nutricional de zinc, ya que infecciones leves o procesos inflamatorios determinan hipocinemia en ausencia de deficiencia real de ese elemento. Por otra parte, cuando la deficiencia existe, aumenta el catabolismo celular, lo que causa liberación de este elemento desde los tejidos al plasma, enmascarando la carencia. La medición de zinc en el cabello no es un método confiable para evaluar el estado nutricional de este mineral traza, puesto que factores como el crecimiento del pelo y el uso de ciertos champúes pueden afectar su medición¹⁹. Un buen indicador del estado nutricional de zinc, es la respuesta biológica secundaria a su administración, método utilizado en este estudio. Nuestros resultados son concordantes con los obtenidos en un estudio de suplementación de zinc en lactantes con desnutrición calórico proteica, en que se describió que la concentración de zinc en plasma y en los leucocitos polimorfonucleares no se modificó substancialmente durante la rehabilitación nutricional con leche fortificada con zinc²⁰. Este mineral traza determinó importantes efectos biológicos que se expresaron como transformación positiva de las reacciones cutáneas, aumento de la respuesta linfoproliferativa frente a PHA, aumento en la concentración de la IgA secretora e incremento significativo de la talla²⁰. La alteración de la respuesta inmune celular en PKU no sería producida por disminución en el número de los linfocitos T, sino por cambios en la función de estas células. La presencia de zinc es fundamental para que se produzca replicación del DNA frente a estimulación con mitógenos, puesto que enzimas tales como DNA polimerasa y transcriptasa reversa utilizan este mineral como cofactor^{21, 22}. Quelantes del zinc inhiben la actividad de estas enzimas y a la inversa la suplementación con este mineral traza revierte esta inhibición²². La estimulación de la respuesta inmunitaria celular podría atribuirse a la influencia de la suplementación de zinc, puesto que el número de linfocitos T, el estado nutricional y los niveles de fenilalanina se mantuvieron sin variación durante todo el período de suplementación. Los resultados de este estudio sugieren que la respuesta inmune celular podría ser un indicador biológico importante para evaluar la presencia de déficit de zinc en los pacientes fenilketonúricos.

Resumen

Existe información contradictoria en relación al estado nutricional de zinc en pacientes con fenilketonuria. El objetivo de este estudio fue confirmar la existencia de manifestaciones indirectas de déficit de zinc, a través del efecto que ejerce la suplementación de este mineral sobre la respuesta inmune celular. Se determinó la reacción cutánea de hipersensibilidad retardada y la capacidad linfoproliferativa frente a fitohemaglutinina antes y después de suplementación con acetato de zinc, en ocho pacientes fenilketonúricos. Dos de ocho pacientes presentaron reacción cutánea positiva antes de la suplementación, aumentando a seis el número de sujetos con respuesta positiva después de la ingesta de zinc ($p < 0,05$ prueba de Mac Nemar). La capacidad linfoproliferativa aumentó al término de la suplementación con zinc ($p < 0,05$ test de t pareado). Estos resultados sugieren que existe un déficit de nutrición de zinc en pacientes con fenilketonuria, puesto que la administración de este mineral traza estimularía la respuesta inmune celular.

(Palabras clave: respuesta inmunitaria celular, nutrición zinc, fenilketonuria.)

Agradecimientos

Agradecemos a la Srta. Mónica Moraga P. por su excelente asistencia técnica y a la Sra. Gloria Icaza por su valiosa contribución en el análisis estadístico de los resultados.

Referencias

1. Guttlider F, DiLella AG, Ledley FD, et al.: Molecular biology of phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1987; 146 (Suppl 1): A5-A11.
2. Colombo M, Trancoso L, Raimann E, Perales CG, Barros T, Cornejo V: Diagnóstico de Fenilketonuria en Chile. *Rev Chil Pediatr* 1988; 59: 235-239.
3. Williamson M, Koch R, Colleen A, Chang C: Correlates of Intelligence Test Results in Treated Phenylketonuric Children. *Pediatrics* 1981; 68: 161-167.
4. Hunt M, Berry H, White P: Phenylketonuria, adolescence, and diet. *J Am Diet Assoc* 1985; 85: 1328-1334.
5. Acosta Ph, Stepnick-Gropper S, Clarke-Sheehan N, et al.: Trace Element Status of PKU Children Ingesting an Elemental Diet. *JPEN* 1987; 11: 287-292.
6. Stepnick-Gropper S, Acosta Ph, Clarke-Sheehan N, Wenz E, Cheng M, Koch R: Trace element status of

- children with PKU and normal children. *J Am Diet Assoc* 1988; 88: 459-465.
7. *Beissel WR, Edelman R, Nauss K, Suskind RM*: Single nutrient effects on immunologic functions. *JAMA* 1981; 245: 53-58.
 8. *Allen JJ, Kay NE, McClain CJ*: Severe zinc deficiency in humans association with a reversible T-lymphocyte dysfunction. *Ann Int Med* 1981; 95: 154-157.
 9. *Weston WI, Huff JC, Humbert JR, Hambidge M*: Zinc correction of defective chemotaxis in Acrodermatitis Enteropathica. *Arch Dermatol* 1977; 113: 422-425.
 10. *Sandstead HH, Henriksen LK, Greger JL, Prasad AS, Good RA*: Zinc nutriture in the elderly in relation to taste acuity, immune response and wound healing. *Am J Clin Nutr* 1982; 36: 1046-1059.
 11. *Cunningham-Rundles C, Cunningham-Rundles S, Iwata T et al.*: Zinc deficiency depressed thymic hormones and T-lymphocyte dysfunction in patients with hypogammaglobulinemia. *Clin Immunol Immunopathol* 1981; 21: 387-396.
 12. *Guthrie R, Susi A*: A Simple Phenylalanine method for detecting phenylketonuria in Large populations of Newborn Infants. *Pediatrics* 1963; 32: 338-343.
 13. *Black R, Lanata CN, Lazo F*: Delayed cutaneous hypersensitivity: epidemiologic factors affecting and usefulness in predicting diarrheal incidence in young Peruvian children. *Pediatr Infect Dis J* 1989; 8: 210-215.
 14. *Oppenheim JJ, Rosentreich DL*: Lymphocyte transformation: Utilization of Automatic Cell Harvesters. In: *In vitro methods in Cell-Mediated of Tumor Immunity*. Academic Press, New York 1976; 573-585.
 15. *Kung PC, Goldstein G, Reinherz EL, Schlossman SF*: Monoclonal antibodies defining distinctive human T-cell surface antigens. *Science* 1979; 206: 347-349.
 16. *Cornejo M, Goya J, Olsen J*: Subpoblaciones de linfocitos T determinadas mediante anticuerpos (AC). *Rev Chil Pediatr* 1987; 58: 39-43.
 17. *Passwell J, Gazit E, Eftir T, Modan M, Lilos P, Cohen E*: Immunologic Studies in Phenylketonuria. *Acta Pediatr Scand* 1976; 65: 673-677.
 18. *Stites DP*: Clinical Laboratory Methods of Detecting Cellular Immune Function. En: *Fundenberg HH, Stites DP, Caldwell JL, Wells JV* (eds). *Basic and Clinical Immunology*, Los Altos, California: Lange Medical Publications, 1980; 382-397.
 19. *Lonnerdal B*: Trace Element Nutrition in Infants. *Annu Rev Nutr* 1989; 9: 109-125.
 20. *Schlesinger L, Arévalo M, Arredondo S, Diaz M, Lonnerdal B, Stekel A*: Effect of a zinc fortified formula on immunocompetence and growth of malnourished children. *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 491-498.
 21. *Chvapil M*: Effect of zinc on cell and biomembranes. *Med Clin North Am* 1976; 60: 799-812.
 22. *Williams RO, Loeb LA*: Zinc requirement for DNA replication in stimulated human lymphocytes. *J Cell Biol* 1973; 58: 594-601.