Anemia ferropriva y respuesta inmune celular

Liana Schlesinger F.¹; Manuel Olivares G.²;
Marianela Arévalo N.³; Patricia Chadud M.⁴

Iron deficiency anemia and cell-mediated immunity

The available information on the effects of iron deficiency on immune response is contradictory. The presence of infections, malnutrition, differences of age between patients and controls, and deficiencies of nutrients other than iron complicates the interpretation of immunological results. Fifteen iron deficient anemic and eleven control infants without iron deficiency, all aged 15 to 19 months and without another nutritional deprivation neither infections were studied to define the effects of iron deficiency anemia on cellular immune response. Delayed cutaneous hypersensitivity reactions to 2 · 4 dinitrochlorobenzene and PPD and lymphoproliferative response to phytohemagglutinin were measured in both patients and controls. No significant differences in the immune response were observed between both groups before and after a three months treatment with 5 mg · kg · day elemental iron given as ferrous sulfate. These results suggest that mild iron deficiency anemia would not impair cellular immune response.

[Key words: iron deficiency, anemia, cellular immunity, delayed hypersensitivity, infants.]

La deficiencia de hierro es una de las carencias nutricionales más prevalentes y la causa principal de anemia en la infancia¹. El lactante, por su gran velocidad de crecimiento y el bajo aporte de hierro en su dieta, constituye uno de los grupos de edad en que la deficiencia de hierro es muy prevalente. En nuestro país 28% de los niños menores de 2 años sufre de anemia y más del doble tienen manifestaciones bioquímicas de deficiencia de hierro².

Entre las expresiones no hematológicas de deficiencia de hierro se mencionan alteraciones de la respuesta inmune, como reducción de la capacidad bactericida de los neutrófilos^{3,4} y del número o proporción de linfocitos T⁵⁻⁹. Diversos estudios se han enfocado en el efecto de la deficiencia de hierro sobre la inmunidad celular, con resultados contradictorios^{5,10-16}.

Con el propósito de dilucidar si la deficiencia de hierro afecta la respuesta inmune celular se determinó la respuesta proliferativa de los

linfocitos y la reacción de hipersensibilidad retardada en un grupo bien caracterizado de lactantes con anemia ferropriva y en niños controles sin deficiencia de hierro, antes y después de suplementar su alimentación con hierro medicinal.

Personas y métodos

Se determinó la respuesta inmunitaria celular en 15 lactantes con anemia ferropriva, cuyas edades fluctuaron entre 15 y 19 meses. Once lactantes de edades y condiciones comparables sirvieron como grupo control. Los niños seleccionados provenían de un estudio de terreno de prevención de deficiencia de hierro con leches fortificadas. Todos los lactantes eran eutróficos, su peso de nacimiento había sido superior a 2 500 g y no presentaban infecciones en el momento del estudio. Ninguno de ellos había recibido vacunas vivas atenuadas en los tres meses previos al estudio. Los criterios utilizados en la definición de anemia por deficiencia de hierro fueron: concentración de hemoglobina (Hb) $\leq$ 10,5 g/dl junto con saturación de transferrina (Sat) $<$ 9%, protoporfirina libre eritrocitaria (PLE) $>$ 100 ug/dl de glóbulos rojos (GR), ferritina sérica (FS) $<$ 10 ug/l y aumento del nivel de Hb superior a 1 g/dl (prueba terapéutica positiva) al cabo de tres meses de tratamiento con 5 mg · kg · día de hierro elemental en forma de sulfato ferroso oral. Los lactantes control tenían todos los parámetros indicadores de la nutrición de hierro dentro de márgenes normales y prueba terapéutica negativa.

Nutrición de hierro y folatos: en todos los pacientes se midieron concentraciones de Hb¹⁷, hierro sérico, capacidad

1. Unidad de Inmunología, INTA, Universidad de Chile.
2. Unidad de Hematología, INTA, Universidad de Chile.
3. Tecnólogo Médico, Unidad de Inmunología, INTA, Universidad de Chile.
4. Tecnólogo Médico, Unidad de Hematología, INTA, Universidad de Chile.

de combinación de hierro y Sat¹⁸, PLE¹⁹, FS²⁰, y concentración de folatos séricos y eritrocitarios^{21,22}.

Reacciones cutáneas de hipersensibilidad retardada: para el estudio de sensibilización con 2-4 dinitroclorobenceno (DNCB) se aplicó 0,1 ml de una solución al 2% de DNCB en acetona en un área de 1 cm de diámetro del antebrazo. Veinte días después se aplicó 0,1 ml de una solución de DNCB al 0,1% en el antebrazo opuesto y se leyó la reacción a las 48 horas²³. Se consideró como reacción positiva la presencia de induración y, o, vesiculación. La prueba cutánea de sensibilidad al PPD se realizó inyectando intradérmicamente 0,1 ml de una solución de tuberculina de 2 UI, pues todos los niños tenían cicatriz de inmunización con BCG. Se consideró como reacción positiva la presencia de una induración ≥ 5 mm de diámetro a las 48 horas²³.

La determinación de la capacidad linfoproliferativa frente a fitohemaglutinina se realizó separando linfocitos de sangre periférica mediante gradiente de Ficoll Hypaque. Se cultivaron 1×10^5 linfocitos en presencia de RPMI 1640, con 20% de suero autólogo, antibióticos, glutamina y fitohemaglutinina (PHA), durante 96 horas, en atmósfera húmeda en una mezcla ambiental de 5% de CO₂ y 95% de aire²⁴. Todos los cultivos se realizaron en triplicados y como controles se realizaron cultivos sin PHA. Dieciocho horas antes del término del período de incubación se agregó 0,5 μ Ci de timidina tritiada, actividad específica 6,7 μ mol/mCi (New England Nuclear, Boston Mass. USA) a cada cultivo. Al término del período de incubación todos los cultivos se cosecharon en un recolector automático de células. La incorporación de timidina tritiada se midió en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresaron como cuentas por minutos (cpm) netas, es decir, cpm de cultivos estimulados con PHA menos cpm de cultivos sin estimular.

La evaluación del estado de nutrición de hierro y el estudio inmunológico se realizaron antes y después de 3 meses de tratamiento con hierro elemental 5 mg $\cdot$ kg $\cdot$ día, en forma de gotas de sulfato ferroso. Para realizar el estudio se solicitó a los padres su consentimiento informado y se obtuvo la aprobación del Comité de Ética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.

La evaluación estadística se realizó mediante pruebas paramétricas como la de t de Student pareada y no pareada, ensayos no paramétricos como Mann Whitney, Friedman y prueba exacta de probabilidad de Fisher.

Resultados

Nutrición de hierro y folato: en la tabla 1 se muestran los indicadores de nutrición de hierro en pacientes y controles. Se observa que los pacientes presentan una anemia ferropriva leve, la que se recupera después de 3 meses de tratamiento con hierro medicamentoso. El grupo control no presenta signos de deficiencia de hierro y sus índices hematológicos no se modifican después del tratamiento con sulfato ferroso. Los niveles de folato sérico y eritrocitario se encontraron sobre 3 μ g/l y 160 μ g/l eritrocitos respectivamente, al inicio y al término del estudio en todos los lactantes.

Respuesta inmune: En 93,3% de los casos, los lactantes con anemia fueron capaces de sensibilizarse al 2-4 DNCB (tabla 2). Sin embargo, un porcentaje significativamente menor de lactantes anémicos presentó respuesta cutánea positiva al PPD en comparación al grupo control ($p < 0,03$, t de Student (tabla 2). Después del tratamiento con sulfato ferroso se repitió la intradermorreacción de PPD en los 6 niños anémicos cuya reacción cutánea era negativa antes del tratamiento, tornándose ésta positiva en sólo uno de ellos.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad proliferativa de

Tabla 1

Indicadores de laboratorio de nutrición de hierro en lactantes anémicos y controles antes y después del tratamiento con sulfato ferroso

	Anémicos Pre-trat. (n: 15)	Anémicos Post-trat. (n: 15)	Controles Pre-trat. (n: 11)	Controles Post-trat. (n: 11)
Hg (g/dl)	9,8 $\pm$ 0,6	12,9 $\pm$ 1,01a	13,3 $\pm$ 0,8b	13,1 $\pm$ 0,6
Sat (%)*	5,2 $\pm$ 1,3	19,2 $\pm$ 12,00a	21,2 $\pm$ 5,7b	34,5 $\pm$ 42,1
PLE (μ g/dl GR)**	183,0 $\pm$ 62,0	119,0 $\pm$ 19,00a	75,0 $\pm$ 13,0b	62,0 $\pm$ 14,0
Ferritina (μ g/l)***	9 (5-17)	32 (20-53)a	34 (23-50)b	31 (22-43)

Resultados expresados como $\bar{x} \pm DE$.

* Saturación de la transferrina

** Protoporfirina libre eritrocitaria

*** Promedio geométrico y rango de 1 DE

a: $p < 0,01$ (t pareado) en relación a grupo anémico pre-tratamiento

b: $p < 0,01$ (t no pareado) en relación a grupo anémico antes del tratamiento

Tabla 2

Respuesta cutánea de hipersensibilidad retardada en lactantes con anemia ferropriva*

	Anémicos	Controles	p
PPD **	7/14	10/11	< 0,05
DNCB	14/15	11/11	ns

* Resultados se expresaron como número de reacciones positivas con respecto al total.

** Todos los niños analizados presentaban cicatriz BCG.

linfocitos frente a PHA entre lactantes anémicos y controles antes del tratamiento con hierro (tabla 3). Sin embargo, en los niños que sufrían anemia, la capacidad linfoproliferativa aumentó al cabo de tres meses de tratamiento con sulfato ferroso, si bien la diferencia no alcanzó a ser estadísticamente significativa.

Comentario

Este estudio muestra que no existe alteración de la respuesta inmunitaria celular en la anemia por deficiencia de hierro, cuando se la determina por la respuesta de hipersensibilidad retardada y la capacidad linfoproliferativa. Entre los numerosos trabajos que han investigado el efecto de esta deficiencia sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos en respuesta a mitógenos y antígenos se han obtenido resultados discordantes, pues en algunos ha sido normal²⁵⁻²⁹, mientras en otros estaba deprimida^{5, 10-14}, comunicándose en este último caso algunas experiencias en que la alteración era corregible con la administración de hierro^{5, 11, 12, 14}. Cabe reiterar que muchos de estos estudios presentan limitaciones metodológicas o fueron realizados en pacientes de diferentes grupos de edad, lo cual dificulta la interpretación de los resultados inmunológicos. Por estas razones este análisis se hizo en un grupo bien caracterizado de lactantes sin antecedentes de peso bajo al nacer, infección, malnutrición o deficiencia de ácido fólico, en los cuales se evaluó adecuadamente la nutrición de hierro. La respuesta linfoproliferativa en los lactantes anémicos y controles bien nutridos en hierro antes y después de suministrar suplementos con hierro medicinal estaba dentro de los límites aceptados como normales y aumentó, aunque no de manera

Tabla 3

Reactividad linfocitaria frente a PHA en lactantes con anemia ferropriva antes y después del tratamiento con sulfato ferroso

	Incorporación de timidina tritlada (cpm x 10 ⁵ linfocitos)	
	Anémicos (n:15)	Controles (n:11)
Pre-tratamiento	39737 ± 100	60558 ± 413
Post-tratamiento	62823 ± 169	42781 ± 176
P	ns	ns

Resultados expresados como X ± ESM

significativa, en los niños con anemia. Estos resultados concuerdan con otros realizados en niños²⁷⁻²⁸ y adultos²⁶⁻²⁹. Existe información que sugiere que alteración de la inmunidad celular sería debida a menor actividad de la nucleótido ribonucleasa, enzima indispensable para la síntesis del DNA, la que para su adecuada función requiere de un aporte continuo de hierro³⁰.

La deficiencia de hierro no alteró, en esta serie, la capacidad de los lactantes a sensibilizarse con DNCB, hecho que indicaría que no existiría una alteración en el reconocimiento y procesamiento antigénico. Este hallazgo es concordante con observaciones en que 100% de un grupo de adultos deficientes en hierro fueron capaces de responder al DNCB, mientras en la deficiencia de ácido fólico sólo el 4% tuvo una reacción cutánea positiva²⁶.

La respuesta cutánea significativamente menor de estos lactantes con anemia al PPD persistió después del tratamiento con hierro, lo que hace poco probable que sea causada por la carencia de este nutriente. Existe escasa información acerca del efecto de la deficiencia de hierro sobre la producción de linfocinas, pero se ha demostrado menor producción de factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en sujetos adultos con anemia ferropriva¹⁰, los que se recuperaron con terapia marcial³¹. Por otra parte, en ratas con anemia ferropriva severa se observó disminución de la producción de IL-1³², en cambio en lactantes con anemia ferropriva la producción y liberación de la misma interleucina era normal³³. Cabe señalar que en la detección de IL-1 en lactantes se utilizó un inmunoensayo específico, en cambio en los animales la determinación

se realizó mediante un bioensayo. Recientemente se ha descrito también menor producción de interleuquina-2 en niños anémicos ferroprivos³⁴, sin embargo llama la atención que en ese mismo estudio los autores no encontraron disminución de la capacidad proliferativa de los linfocitos.

La ausencia de alteraciones causadas por la anemia por deficiencia de hierro en la respuesta inmunitaria celular se sustentaría además en que no ha detectado en estos pacientes mayor frecuencia de infecciones por *Pneumocystis carinii*, infecciones virales, fúngicas sistémicas, propias de las inmunodeficiencias celulares. Aún más, en tres estudios de terreno prospectivos realizados en lactantes de la ciudad de Santiago no se demostraron diferencias en la incidencia de diarrea o infecciones respiratorias entre los sujetos que recibieron alimentos fortificados con hierro y aquellos que no lo hicieron, a pesar que entre estos últimos la prevalencia de anemia fue cercana a treinta por ciento³⁵⁻³⁷.

Basados en nuestros resultados podemos afirmar que la anemia ferropriva leve no alteraría la respuesta inmune celular, sin embargo no podemos descartar que anemias de mayor severidad pudieran determinar una depresión de la función inmunológica.

Resumen

Existe información contradictoria en relación al efecto de la carencia de hierro sobre respuesta inmune. La interpretación de los datos inmunológicos obtenidos en pacientes con anemia ferropriva varía según edad, estado nutricional, presencia de infecciones y asociación con otras deficiencias nutricionales. Para definir el efecto que ejerce la anemia ferropriva sobre la respuesta inmunitaria celular se seleccionaron 15 lactantes con anemia ferropriva y 11 controles adecuadamente nutridos con hierro, entre 15 y 19 meses de edad, eutróficos, sin infecciones ni deficiencias nutricionales asociadas. Se determinó la capacidad de sensibilización a antígenos que evocan respuestas cutáneas de hipersensibilización retardada con 2 - 4 dinitroclorobenceno y PPD, como también la capacidad proliferativa de sus linfocitos al estímulo con fitohemaglutinina. No se observaron diferencias significativas en la respuesta inmune celular entre pacientes y controles antes y al cabo de tres meses de tratamiento con

5 mg · kg · día de hierro elemental en forma de sulfato ferroso. Se sugiere que la anemia ferropriva leve no alteraría la respuesta inmune celular.

(Palabras clave: hierro, deficiencia, anemia, inmunidad celular, hipersensibilidad retardada, lactantes.)

Referencias

1. Florentino RFR, Guirriec RM: Prevalence of nutritional anemias in infancy and Childhood with emphasis on developing countries. En: Stekel A, ed. Iron Nutrition in Infancy and Childhood. New York: Raven Press 1984; 61-74.
2. Ríos E, Olivares M, Amar M, Chadud P, Stekel A: Evaluation of iron status and prevalence of iron deficiency in infants in Chile. En: Underwood BA, ed. Nutrition Intervention Strategies in National Development. New York: Raven Press 1983; 273-283.
3. Chandra RK: Reduced bactericidal capacity of polymorphs in iron deficiency. Arch Dis Child 1973; 48: 864-866.
4. Walter T, Arredondo S, Arévalo M, Stekel A: A effect of iron therapy on phagocytosis and bactericidal activity in neutrophils of iron-deficient infants. Am J Clin Nutr 1986; 44: 877-882.
5. Chandra RK: Impaired immunocompetence associated with iron deficiency. J Pediatr 1975; 86: 899-902.
6. Skrikantia SG, Bhaskaram C, Prasad JS, Krishnamachari KAVR: Anaemia and immune response. Lancet 1976; II: 1307-1309.
7. Bagchi K, Mohanram M, Reddy V: Humoral immune response in children with iron-deficiency anaemia. Brit Med J. 1980; 1249-1251.
8. Prema K, Ramalakshmi BA, Madhavadeppetti R, Babu S: Immune status of anaemic pregnant women. Brit J Obstet Gynaecol 1982; 89: 222-225.
9. Berger J, Schneider D, Dyck JL, Aplogan AJA, Galan P, Hercberg S: Iron deficiency, cell-mediated immunity and infection among 6-36 months old children living in rural Togo. Nutr Res 1992; 12: 39-49.
10. Joynson DHM, Walker M, Jacobs A, Dolby AE: Defect of cell-mediated immunity in patients with iron-deficiency anaemia. Lancet 1972; II: 1058-1059.
11. Macdougall LG, Anderson R, MacNab GM, Katz J: The immune response in iron-deficient children: impaired cellular defense mechanisms with altered humoral components. J Pediatr 1975; 6: 833-843.
12. Fletcher J, Mather J, Lewis MJ, Whiting G: Mouth lesions in iron deficient anemia: Relationship to Candida albicans in saliva and to impairment of lymphocyte transformation. J Infect Dis 1975; 131: 44-50.
13. Sawitsky B, Kanter R, Sawitsky A: Lymphocyte response to phytohemagglutinin in iron deficiency. Am J Med Sci 1976; 272: 153-160.
14. Krantman HJ, Young SR, Ank BJ, O'Donnel MC, Rachelefsky GS, Stiehm RE: Immune function in pure iron deficiency. Am J Dis Child 1982; 136: 840-844.

15. *Dallman PR*: Iron deficiency and the immune response. *Am J Clin Nutr* 1987; 46: 329-334.
16. *Dhur A, Galan P, Hercberg S*: Iron status, immune capacity and resistance to infections. *Comp Biochem Physiol* 1989; 94A: 11-19.
17. *International Committee for Standardization in Haematology*. Recommendation requirements for haemoglobinometry in human blood. *Clin Pathol* 1965; 18: 353-355.
18. *Fischer DS, Price DC*: A simple serum iron method using the new sensitive chromogen tripyridyl-s-triazine. *Clin Chem* 1964; 10: 21-30.
19. *Heller SR, Labbe RF, Nutter JA*: A simplified assay for porphyrins in whole blood. *Clin Chem* 1971; 17: 525-528.
20. *Gamma Dab* (125-I) Ferritin Radioimmunoassay Kit. Clinical assay, Division of Travenol Laboratories Inc., Cambridge, Mass, USA.
21. *Waters AJ, Mollin DL*: Studies on the folic activity of human serum. *J Clin Pathol* 1961; 14: 335-344.
22. *Hoffrand AV, Beverly FA, Mollin DL*: Method of assay of red cell folate activity and the value of assays as a test for folate deficiency. *J Clin Pathol* 1966; 19: 17-28.
23. *World Health Organization Scientific Group*: Immunodeficiency tests for assessing immune status. WHO Tech Rep Ser 1978; 630: 1-98.
24. *Oppenheim JJ, Rosentreich DL*: Lymphocyte transformation: Utilization of automatic cell harvester. In: Bloom BR, David JR, eds. *In vitro* methods in cell-mediated tumor immunity. New York: Academic Press 1976: 73-85.
25. *Kulapongs P, Suskind R, Vithayasi V, Olsen RE*: Cell-mediated immunity and phagocytosis and killing function in children with severe iron-deficiency anaemia. *Lancet* 1974; II: 680-691.
26. *Gross RL, Reid JVO, Newberne PM, Burgess B, Marston BAR, Hift W*: Depressed cell-mediated immunity in megaloblastic anemia due to folic acid deficiency. *Am J Clin Nutr* 1975; 28: 225-232.
27. *Gupta KK, Dhan PS, Singh H*: Cell-mediated immunity in children with iron-deficiency anaemia. *Indian J Pediatr* 1982; 49: 507-510.
28. *Grosch-Wörner I, Grosse-Wilde H, Bender-Görze Ch, Schäfer KH*: Lymphozytenfunktionen bei Kindern mit Eisenmangel. *Klin W* 1984; 62: 1091-1093.
29. *Moraes de Souza H, Kerbauy J, Yamamoto M, Da Silva MP, Dos Santos MRM*: Depressed cell-mediated immunity in iron deficiency anemia due to chronic loss of blood. *Braz J Med Biol Res* 1984; 17: 143-150.
30. *Thelander L, Gräslund A, Thelander M*: Continual presence of oxygen and iron required for mammalian ribonucleotide reduction: possible regulation mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 110: 859-865.
31. *Jacobs A, Hoynson DHM*: Lymphocyte function and iron deficiency anaemia. *Lancet* 1974; II: 844.
32. *Helyar L, Sherman AR*: Iron deficiency and interleukin production by rats leukocytes. *Am J Clin Nutr* 1987; 46: 346-352.
33. *Muñoz C, Olivares M, López M, Simon V, Letelier A, Arévalo M, Schlesinger L*: Effect of isolated iron deficiency in monocyte-derived cytokine production in infants. *J Cell Biochem* 1993; suppl 17B:95.
34. *Galan P, Thibault H, Preziosi P, Hercberg S*: Interleukin 2 production in iron-deficient children. *Biol Trace Elem Res* 1992; 32: 421-426.
35. *Heresi G, Olivares M, Pizarro F, Cayazzo M, Stekel A*: Effect of an iron fortified milk on morbidity in infancy. A field trial. *Nutr Res* 1987; 7: 915-922.
36. *Olivares M, Pizarro F, Heresi G, Hertrampf E, Cayazzo M, Walter T*: Effect of a hemoglobin fortified cereal on morbidity in breast fed infants. En: Recent knowledge on iron and folate deficiencies in the world. Hercberg S, Galan P, Dupin H, eds. Colloque INSERM Paris 1990; 197: 653-658.
37. *Walter T, Olivares M, Pizarro F*: Iron and infection. En: Dietary iron: birth to two years. Filer LJ Jr, ed. Raven Press: New York, 1989: 119-139.