



# Inmunonutrición: metodología y aplicaciones

Belén Zapatera, Andreu Prados, Sonia Gómez-Martínez, Ascensión Marcos

*Grupo de Investigación en Inmunonutrición. Departamento de Metabolismo y Nutrición. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Madrid. España.*

## Resumen

La Inmunonutrición es una materia emergente e interdisciplinar, ya que abarca distintos aspectos relacionados con la Nutrición, la Inmunidad, la Infección, la Inflamación y la Injuria o daño tisular, lo que se ha denominado como la Nutrición y las 4 "Is". En estas interacciones se encuentran implicados los sistemas endocrino, nervioso e inmune, formando parte la microbiota de este último. Actualmente la microbiota intestinal tiene un papel fundamental no solo a nivel del tracto gastrointestinal sino que presenta además un eje de conexión bilateral con el sistema nervioso.

Para el estudio de la Inmunonutrición existen diferentes biomarcadores del sistema inmune que proporcionan información acerca del estado nutricional del individuo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que no existe un solo parámetro para evaluar la relación causa-efecto de la nutrición sobre el sistema inmunitario, sino que es un conjunto de biomarcadores a tener en cuenta dependiendo de las distintas situaciones nutricionales.

Si bien está claro que se trata de una materia multidisciplinar, no solo se deben focalizar los estudios sobre las interacciones entre la nutrición y el sistema inmune de manera aislada, sino sobre otros sistemas del organismo teniendo en cuenta un gran abanico de factores de confusión y determinantes derivados de las condiciones idiosincrásicas de cada individuo, su genética y su estilo de vida.

Por todo ello, la Inmunonutrición permite llevar a cabo una serie de estudios basados fundamentalmente en cuatro líneas de investigación: 1) Evaluación de poblaciones supuestamente sanas pero con riesgo de malnutrición (niños, adolescentes, adultos, gestantes, lactantes, personas mayores y deportistas); 2) Estudio de la evolución de pacientes con enfermedades relacionadas con la nutrición y el sistema inmunitario; 3) Estudio de los efectos de nutrientes, compuestos bioactivos y alimentos convencionales y funcionales sobre el sistema inmunitario; 4) Estudio del impacto del estilo de vida sobre el comportamiento del sistema inmunitario, teniendo como determinantes principales la dieta, el comportamiento alimentario, la actividad física, el sedentarismo, la calidad y cantidad de sueño, y como factor clave, el estrés.

Palabras clave: *Inmunonutrición. Biomarcadores. Microbiota. Estilo de vida. Malnutrición.*

## IMMUNONUTRITION: METHODOLOGY AND APPLICATIONS

### Abstract

Immunonutrition is an emergent and interdisciplinary subject, since it comprises several aspects related to Nutrition, Immunity, Infection, Inflammation, and Injury or tissue damage, what is known as Nutrition and 4 "Is". Within these interactions the endocrine, nervous and immune systems are involved, microbiota being a part of the last one. Nowadays, gut microbiota has been shown to play an essential role, not only in the gastrointestinal tract but also into the nervous system, because of its bilateral connection.

There are several methods to study Immunonutrition, which allow measuring different immunological biomarkers to provide information about the nutritional status. However, it should be taken into account that there is not a single gold standard parameter to evaluate the cause-effect relationship between nutrition and the immune system. On the contrary, a combination of biomarkers have to be assessed depending on the different nutritional situations.

Since Immunonutrition is a multidisciplinary matter as mentioned above, the study on the interactions between nutrition and the immune system has not been exclusively focused as such, but bearing in mind other systems of the organisms as well as a wide range of confounding factors and determinants coming from idiosyncratic features, genes and lifestyle of each individual.

Therefore, Immunonutrition allows to study the following research fields: 1) Evaluation of nutritional status in presumably healthy people with risk of malnutrition (children, adolescents, adults, pregnant women, elderly, and sportspeople); 2) Assessment of the evolution and progress of patients with nutrition and immune-related diseases, such as food allergies, eating and metabolic disorders; 3) Evaluation of the effects of nutrients, bioactive compounds and both conventional and functional foods on the immune system; 4) Evaluation of impact of lifestyle determinants on the immune system, such as diet, food behaviour, physical activity, sedentariness, sleep quality and quantity, and as a key factor, stress.

Key words: *Immunonutrition. Biomarkers. Microbiota. Lifestyle. Malnutrition.*

Correspondencia: Ascensión Marcos.  
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN).  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).  
C/ José Antonio Novais, 10.  
28040 Madrid. España.  
E-mail: amarcos@ictan.csic.es





## Abreviaturas

ICTAN: Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición.

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

ECVs: enfermedades cardiovasculares.

Células NK: células *natural killer*.

Th: linfocitos T colaboradores.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

MPC: malnutrición proteico-calórica.

Fe: hierro.

Zn: zinc.

Cu: cobre.

DHST: test de hipersensibilidad cutánea retardada.

Ig: inmunoglobulina.

LPS: lipopolisacárido.

AFINOS: Actividad Física como Agente Preventivo del Desarrollo de Sobrepeso, Obesidad, Alergias, Infecciones y Factores de Riesgo Cardiovascular en Adolescentes.

PCR: proteína C-reactiva.

C3: factor del complemento 3.

C4: factor del complemento 4.

AVENA: Alimentación y valoración del estado nutricional de los adolescentes españoles.

IL: interleuquina.

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral.

HELENA: Estilo de vida saludable en Europa mediante la nutrición en adolescentes.

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

MALT: tejido linfoide asociado a mucosas.

GALT: tejido linfoide asociado al intestino.

BALT: tejido linfoide asociado a los bronquios.

NALT: tejido linfoide asociado a la nasofaringe.

VALT: tejido linfoide asociado a la vagina.

LDALT: tejido linfoide asociado al drenaje lacrimal.

EVASYON: Desarrollo, aplicación y evaluación de la eficacia de un programa terapéutico para adolescentes con sobrepeso y obesidad: estudio nutricional.

IMC: índice de masa corporal.

TL: telómeros.

## Nutrición e inmunidad

### *El sistema inmune*

El sistema inmune es una compleja red de defensa que protege al organismo frente a agentes potencialmente dañinos y posee la capacidad de responder ante millones de sustancias extrañas denominadas antígenos. A través de una secuencia de reacciones (respuesta inmune), el sistema inmune es capaz de reconocer y eliminar agentes patógenos<sup>1</sup>. De esta manera es capaz de distinguir lo "ajeno" de lo "propio", incluyendo entre sus funciones asegurar la tolerancia de lo "propio", de los alimentos, de determinados componentes medioambientales además de las diferentes bacterias comensales que están presentes en el organismo. Sin embargo, cualquier error o alte-

ración en estas vías de tolerancia, puede dar lugar a trastornos inmunológicos. A pesar de que hay multitud de factores implicados en la etiología de las enfermedades, la mayoría de ellos están directamente relacionados con el sistema inmune, siendo en su mayor parte procesos infecciosos, inflamatorios o autoinmunes<sup>1</sup>. En los últimos años, los estudios científicos han confirmado cómo una respuesta inflamatoria inapropiada juega un papel decisivo en la instauración, evolución y gravedad de muchas enfermedades crónicas, como son el Alzheimer, enfermedades cardiovasculares (ECVs), obesidad, cáncer o enfermedades autoinmunes (diferentes tipos de alergias, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, esclerosis múltiple, o artritis reumatoide)<sup>1,2</sup>.

Esencialmente el sistema inmune se compone de tres niveles de defensa: barreras anatómicas y fisiológicas, inmunidad innata o inespecífica e inmunidad adaptativa o específica (también denominada adquirida)<sup>1,3,4</sup>. El primer nivel de defensa son las barreras físico-químicas, que incluyen la piel, el aclaramiento mucociliar en las vías respiratorias, las mucosas, la lisozima de las lágrimas y saliva, el ácido clorhídrico del estómago y la microbiota comensal cutánea, oral, de los tractos gastrointestinal y genitourinario<sup>4</sup>. Una vez que los agentes infecciosos y otros compuestos nocivos han cruzado esta primera línea de defensa, el sistema inmune inicia mecanismos activos de defensa, que se podrían dividir en dos tipos: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. Ambas respuestas inmunes incluyen varios factores o componentes solubles y células que se desarrollan a nivel sanguíneo, así como determinados microorganismos, como se detalla en la tabla I.

La respuesta inmune es primordial para prevenir la invasión de agentes infecciosos, siendo el primer mecanismo de defensa y cuya función es eliminar rápidamente los patógenos en el caso de que al final consigan entrar<sup>3,4</sup>. El sistema inmune innato está compuesto por: células (granulocitos -neutrófilos, basófilos y eosinófilos-, monocitos/macrófagos, linfocitos y células *natural killer* -NK-), componentes solubles<sup>1,3,4</sup> y microorganismos (tabla I). La inmunidad innata no posee memoria y, por lo tanto, no depende de la exposición previa del organismo a un agente patógeno<sup>4</sup>. Esta respuesta se activa cuando una sustancia extraña invade el organismo, y su objetivo será eliminarla por los mecanismos de fagocitosis y citotoxicidad<sup>1</sup>. A pesar de que la respuesta innata es un buen sistema de defensa, a veces no es suficiente para proteger el organismo, y por lo tanto, se debe poner en marcha la respuesta inmune adaptativa. Dicha respuesta es más compleja y sofisticada, teniendo como característica clave ser específicamente efectiva para aquellos antígenos que provocan la respuesta<sup>4</sup>. De hecho, la respuesta adaptativa se convierte en efectiva varios días después de la activación inicial y persiste durante cierto tiempo después de que el antígeno haya sido eliminado<sup>4</sup>. Esta persistencia crea lo que llamamos "memoria inmunológica", la cual es la pieza clave para que cuando haya otra exposición al mismo





Tabla I Componentes del sistema inmune innato y adaptativo		
	Inmunidad innata	Inmunidad adaptativa
Componentes celulares	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Granulocitos: neutrófilos, basófilos y eosinófilos</li> <li>• Monocitos/macrófagos</li> <li>• Mastocitos</li> <li>• <i>Natural killer</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfocitos B</li> <li>• Linfocitos T: Linfocitos T colaboradores (<math>T_H1</math>, <math>T_H2</math>), Linfocitos T citotóxicos/supresores</li> </ul>
Componentes solubles	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factores del complemento</li> <li>• Proteínas de fase aguda</li> <li>• Citoquinas secretadas por los macrófagos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticuerpos</li> <li>• Citoquinas secretadas por los linfocitos</li> </ul>
Microorganismos	Microbiota intestinal	

antígeno, la respuesta inmunológica sea más efectiva y rápida<sup>4</sup>.

La respuesta adaptativa está mediada principalmente por linfocitos y se clasifica en dos tipos: humoral y celular (fig. 1). En general, la respuesta humoral se lleva a cabo por los linfocitos B, mientras que la respuesta celular está a cargo de los linfocitos T<sup>3,4</sup>. Mientras que la inmunidad humoral se ocupa de los patógenos extracelulares, la inmunidad celular se encarga de los intracelulares (virus y algunas bacterias) que escapan al ataque por parte de la inmunidad humoral<sup>4</sup>. Ambas respuestas se encuentran relacionadas, y juntas consiguen que la respuesta inmune sea específica y muy efectiva. Los linfocitos T colaboradores (Th) tienen la capacidad de secretar citoquinas, las cuales actúan sobre las demás células del sistema inmunitario, participando en el inicio y desarrollo de la respuesta inmune. Las células Th1 promueven la respuesta celular, mientras que las células Th2 estimulan la respuesta humoral<sup>1,3</sup>. Tanto el sistema inmune innato como el adaptativo se comunican por contacto directo célula a

célula, en el que están involucradas las proteínas de superficie celular (por ejemplo, las moléculas de adhesión); además esta comunicación se realiza mediante la producción de mensajeros químicos como son las citoquinas<sup>5</sup>. Por otro lado, la microbiota intestinal, no sólo tiene el papel de barrera física, sino que también interactúa de manera activa con el sistema inmune innato y adaptativo. Por lo tanto, la microbiota actúa como parte del sistema inmune, por lo que es conveniente tenerla en cuenta al igual que el resto de componentes<sup>5</sup> para evaluar el estado nutricional (tabla I y fig. 1).

## Interés de la inmunonutrición

### Relaciones entre nutrición e inmunidad

La nutrición juega un papel importante en el correcto desarrollo del sistema inmune, además de colaborar en su buen funcionamiento a lo largo de la vida. El estudio

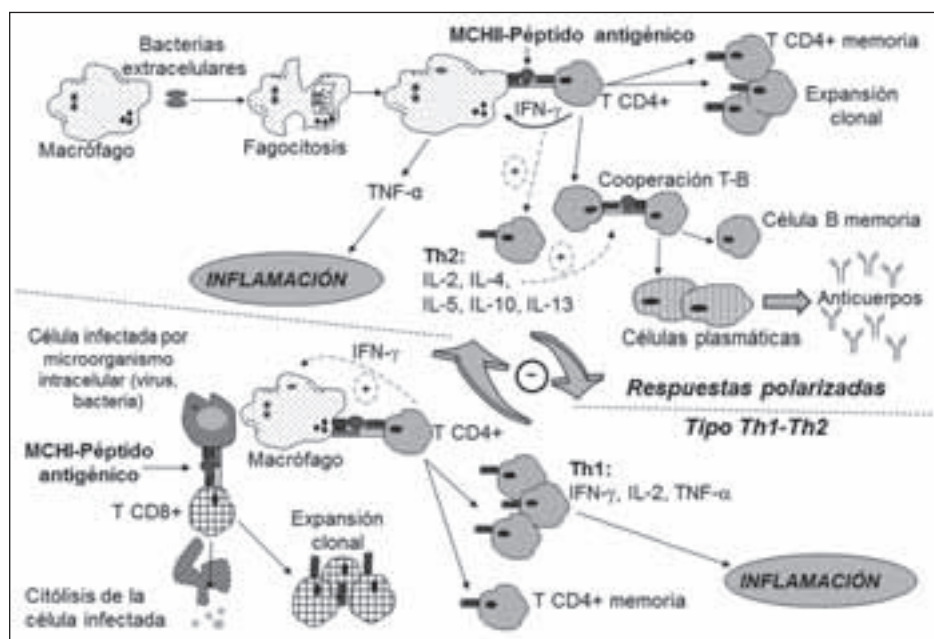


Fig. 1.—Vista esquemática de la respuesta adaptativa inmune. Adaptada de: Marcos A, Nova E, Perdigón G, de Moreno A. *Nutrición e Inmunidad*. En: *Nutrición y Salud Pública. Métodos, Bases Científicas y Aplicaciones*. 2ª ed. Serra LI, Aranceta J, Mataix J, eds. Barcelona: Masson; 2006, pp. 482-90.





de la relación entre ambos (nutrición-función inmune) es relativamente reciente. La Inmunonutrición se define como la ciencia que estudia las interacciones existentes entre la nutrición con el sistema Inmune, la Infección, la Inflamación y la Injuria o daño tisular. Por ello, también se la conoce como el estudio de la Nutrición y las 4 "Ies". La malnutrición es una condición en la que la dieta de una persona no cubre las necesidades adecuadas de nutrientes, ya sea por exceso (sobrenutrición) o por defecto (desnutrición). Tradicionalmente, el estudio de la interacción entre Nutrición e Infección (*"primera I"*) ha incluido el papel de la infección para definir el estado nutricional, y la nutrición como responsable para determinar los mecanismos de defensa del huésped<sup>6</sup>. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su monográfico de 1968 sobre "Interacciones entre Nutrición e Infección" presentó los mecanismos de defensa que relacionaban la infección con un estado nutricional deficitario. En el desarrollo de la inmunología como ciencia, se ha puesto de manifiesto cómo la desnutrición puede afectar la resistencia a infecciones y a la respuesta inmune<sup>7</sup>.

De hecho, los nutrientes tienen un papel fundamental tanto en el desarrollo como en el funcionamiento del sistema inmune, y la deficiencia (ya sea de uno o varios nutrientes) puede comprometer el estado de inmunocompetencia. El conocimiento de que la malnutrición proteico-calórica (MPC) no es sólo un déficit de proteínas y energía, sino que además conlleva una depleción en el aporte de micronutrientes específicos a las células, sirvió para destacar la importancia tanto de los micronutrientes [vitamina A, hierro (Fe), zinc (Zn) y cobre (Cu)] como de sus respectivas proteínas transportadoras, como componentes específicos o no específicos de la respuesta inmune<sup>8</sup>. Estos hallazgos llevaron a la necesidad de confirmar la Inmunidad (*"segunda I"*) como nexo de unión entre la Nutrición y la infección<sup>6</sup>. Posteriormente, el descubrimiento del papel inmunomodulador de varios nutrientes, como el tocoferol, retinol, zinc y ácidos grasos esenciales, abrió un nuevo

campo de estudio sobre la influencia potencial de la nutrición en los procesos inflamatorios<sup>6</sup>. El papel beneficioso para la salud resultante de un adecuado equilibrio en la ingesta de los ácidos grasos omega-3 y omega-6 ayudó a incluir la Inflamación como la *"tercera I"*<sup>6</sup>. Finalmente, el hecho de considerar que los nutrientes también podían modular el daño tisular mediado por hipoxia o toxinas, llevó a incluir la linjuria como la *"cuarta I"*<sup>6</sup>.

### Controversias y limitaciones

Como se desprende de lo dicho anteriormente, el estudio de los parámetros inmunológicos permite evaluar el estado nutricional. El uso de estos parámetros en estudios epidemiológicos no es habitual, ya que está limitado por la necesidad de expertos inmunólogos, laboratorios y técnicas especializadas, así como por los altos costes de dichas pruebas<sup>8</sup>. Además, es importante tener en cuenta que no existe un único biomarcador capaz de predecir un estado de malnutrición y, por consiguiente, es necesario estudiar distintos biomarcadores y su relación con el estado nutricional<sup>9</sup>. En este contexto, las técnicas utilizadas deben estar estandarizadas y basarse en protocolos de laboratorio actualizados. También es necesario calibrar los instrumentos utilizados.

En la evaluación de los biomarcadores de estado nutricional existen diferentes estudios que no se pueden llevar a cabo en sujetos vivos, debido a la utilización de técnicas agresivas. No obstante, la evaluación de la función inmune *in vivo* se puede determinar a través de modelos animales o incluso utilizando análisis como las vacunas o tests de hipersensibilidad cutánea retardada (DHST, del inglés *delayed hypersensitivity skin test*)<sup>9</sup>.

El estudio del sistema inmunitario se afecta por una gran variedad de factores intra-personales y técnicos, que se deben tener en cuenta para reducir la variabilidad de los resultados (tabla II). Además, los polimorfismos

Tabla II

*Factores de confusión intra-personales y factores técnicos que deben tenerse en cuenta en el estudio de la función inmunitaria en humanos*

<i>Factores intra-personales</i>	<i>Factores técnicos</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad</li> <li>• Sexo (hormonas, ciclo menstrual)</li> <li>• Índice Masa Corporal (IMC)</li> <li>• Historia dietética (incluyendo ingesta sólida y líquida así como todo tipo de complementos alimenticios)</li> <li>• Comportamiento alimentario</li> <li>• Actividad física/ejercicio</li> <li>• Tabaquismo</li> <li>• Estado de hidratación</li> <li>• Genética</li> <li>• Enfermedades crónicas e infecciosas</li> <li>• Estrés psicológico</li> <li>• Calidad/Cantidad de sueño</li> <li>• Consumo de alcohol, drogas y medicación</li> <li>• Historial de infecciones y vacunas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selección de la población de estudio y controles apropiados</li> <li>• Hora de toma de muestras (ritmos circadianos)</li> <li>• Temporalidad estacional</li> <li>• Tiempo de ayuno</li> <li>• Uso de períodos de lavado</li> <li>• Duración de los períodos de intervención</li> <li>• Selección apropiada de los biomarcadores inmunológicos</li> <li>• Correcta interpretación de resultados por expertos en inmunonutrición</li> </ul>

Tabla modificada a partir de Albers y cols., 2005<sup>9</sup>.



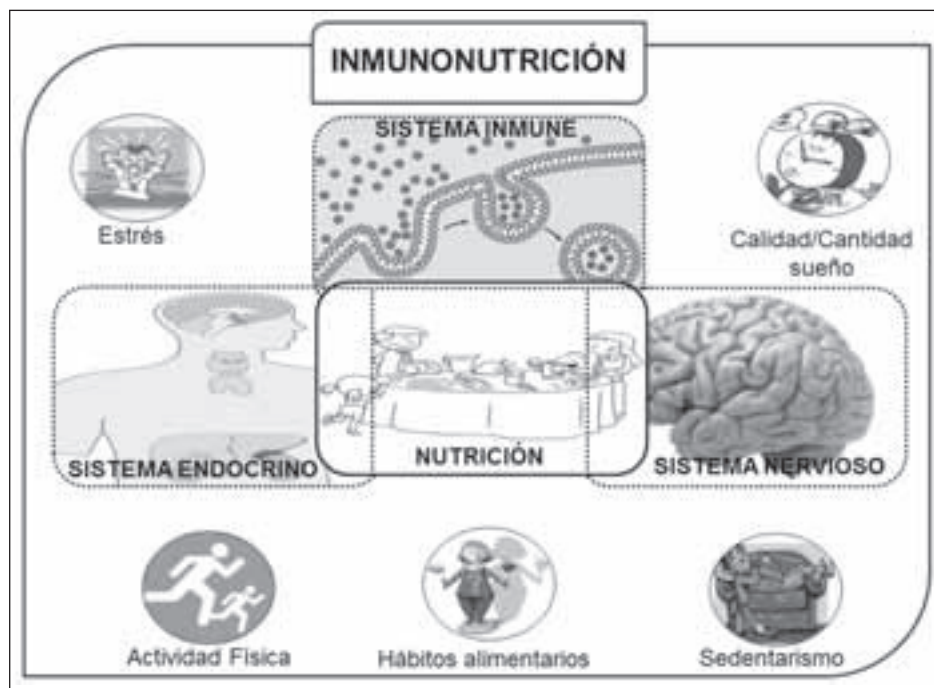


Fig. 2.—Sistemas biológicos y factores de confusión a tener en cuenta en el estudio de la inmunonutrición.

genéticos, los sucesos que ocurren en edades tempranas, el estado hormonal y la microbiota intestinal pueden ser factores condicionantes que expliquen dicha variabilidad. También las limitaciones éticas pueden restringir el uso de marcadores específicos en determinadas poblaciones<sup>9</sup> (tabla II).

Cuando se usan parámetros inmunológicos para valorar el estado nutricional en estudios con humanos es importante tener en cuenta diferentes aspectos. En primer lugar, el número de sujetos del estudio debe ser suficiente para tener una potencia estadística fuerte y poder extrapolar los resultados a la población general<sup>6</sup>. En los estudios de nutrición en humanos existen distintos factores de confusión que son objeto de estudio, tales como: estrés, actividad física/ejercicio, sueño (calidad y cantidad) y comportamiento alimentario<sup>9</sup> (fig. 2). Además, los estudios en humanos habitualmente están limitados por la capacidad de obtener el tipo de muestra necesaria (sangre y algunas secreciones externas como la saliva, las lágrimas y la orina). Por otro lado, hay que tener en cuenta que los intervalos de normalidad y los datos de referencia para el número y la función de células inmunocompetentes en poblaciones específicas (niños, adolescentes, gestantes, personas mayores, deportistas, etc.) no están del todo bien definidos<sup>3</sup>.

Por otra parte, los estudios deberían permitir identificar cambios en la prevalencia de las posibles comorbilidades secundarias. Para ello el diseño de este tipo de estudios debería ser aleatorizado, doble ciego, transversal o en paralelo con unos criterios de inclusión y exclusión adecuados<sup>6</sup>. El objetivo final del estudio debería considerar no solo una adecuada nutrición, sino un impacto en el estado de salud global, en la reducción de comorbilidades y del riesgo de mortalidad así como en los determinantes socioeconómicos de la calidad de vida.

### Estado actual y perspectivas

La evaluación de parámetros inmunológicos permite identificar un estado de malnutrición subclínica, por lo que adquiere un gran interés a la hora de valorar el estado nutricional. Cuando se analizan los parámetros inmunológicos, no hay que olvidar las interacciones complejas y recíprocas entre el sistema inmunitario, el sistema endocrino y el sistema nervioso central, como se ha explicado antes<sup>10</sup>.

### Tejidos y órganos

La malnutrición puede dar lugar a una disminución de la proliferación celular, de la síntesis proteica y deficiencia de nutrientes implicados en las vías metabólicas. Estas alteraciones pueden modificar la respuesta inmunitaria afectando a los tejidos linfoides y al número y función de las células inmunitarias<sup>11</sup>. Específicamente, la MPC produce una atrofia generalizada de los tejidos linfoides. En estas situaciones, el timo, el bazo, las amígdalas, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos se encuentran gravemente afectados, de hecho se ha observado con pruebas histológicas una atrofia específica en áreas de linfocitos T que afecta principalmente la respuesta inmunitaria adaptativa<sup>12</sup>.

### Factores circulantes

#### Moléculas

- *Anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig)*. Los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas que se encuentran





en diferentes fluidos del organismo incluyendo la sangre y secreciones como la saliva, las lágrimas y la leche materna. Están producidas por las células plasmáticas y su función principal es la de reconocer los antígenos o sustancias extrañas y neutralizarlos. Existen cinco tipos principales de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) y cada una de ellas tiene diferentes isotipos (IgG1, IgG4...). Su determinación se puede llevar a cabo a través de distintos inmunoensayos (ELISA, ELISPOT y análisis estándar por nefelometría). La concentración de estos anticuerpos en sangre permite analizar el estado basal de cualquier persona. No obstante, el estudio de las concentraciones de Ig después de una estimulación (a través de cultivos *ex vivo* inducidos por un mitógeno como el lipopolisacárido (LPS) o *in vivo* con un antígeno específico) permite obtener más información sobre la capacidad de respuesta de los linfocitos B. En el estudio AFINOS, se ha observado una asociación entre los niveles bajos de IgE y el cumplimiento de las recomendaciones de sueño.<sup>13</sup>

- **Proteínas de fase aguda: proteína C-reactiva (PCR), factores del complemento 3 (C3) y 4 (C4) y ceruloplasmina.** La proteína C-reactiva (PCR) está implicada en la respuesta inmunitaria innata y es un marcador muy sensible de inflamación. Sus niveles aumentan rápidamente en respuesta a una amplia variedad de estímulos y, por consiguiente, los niveles altos de PCR no tienen especificidad que permita diferenciar una enfermedad de otra, pero, a pesar de ello, la PCR se considera como uno de los predictores de riesgo cardiovascular más fiables. De hecho, la PCR se encuentra normalmente aumentada en sujetos con sobrepeso u obesidad, debido a que se ha detectado una inflamación crónica, resultado que se observa, tanto en niños como en adultos<sup>14</sup>.

En relación a los factores del complemento 3 (C3) y 4 (C4) y la ceruloplasmina, son proteínas también de fase aguda que se comportan como potentes predictores de riesgo cardiovascular en adultos. Los factores del complemento C3 y C4 son parte del sistema inmunitario innato, estimulan la fagocitosis de los agentes extraños o antígenos y activan algunos procesos inflamatorios en el organismo. Por otra parte, la ceruloplasmina es otra proteína producida por el hígado durante la respuesta de fase aguda. Se trata de una proteína plasmática que actúa como transportador de cobre. No obstante, sus niveles altos se asocian con aterosclerosis. Los factores del complemento C3 y C4, la PCR de alta sensibilidad y la ceruloplasmina se pueden medir en suero mediante inmunoturbidimetría<sup>14</sup>.

En una muestra representativa de adolescentes españoles de 13-18,5 años del estudio AVENA (Alimentación y Valoración del Estado Nutricional de los Adolescentes españoles), los niveles de PCR y de factores del complemento C3 y C4 se correlacionaron con el sobrepeso y la obesidad. Particularmente, se encontró que la obesidad central estaba independientemente asociada con las concentraciones de C3<sup>14</sup>.

- **Concentraciones de citoquinas o de receptores solubles de citoquinas.** Las citoquinas se pueden afectar por estados de malnutrición, tanto por defecto como por exceso. Se pueden clasificar como pro-inflamatorias [interleuquinas (IL)-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ] y anti-inflamatorias (IL-2, IL-4, IL-10). Se ha observado que un exceso de grasa corporal no tiene un efecto sobre la capacidad de producción *in vitro* de IL-6 y TNF- $\alpha$  por los leucocitos en una muestra representativa de adolescentes españoles del estudio AVENA<sup>14</sup>. Contrariamente, en los pacientes con anorexia nerviosa, la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 es más baja mientras que la secreción de IL-1 $\beta$  se encuentra más alta en comparación a un grupo control cuando estos niveles se analizan al ingreso hospitalario y un mes después. Estos resultados sugieren que la función inmunitaria en pacientes con anorexia podría estar preservada a pesar de su grave condición de malnutrición<sup>15</sup>. Por otro lado, en el estudio HELENA hemos encontrado que el cociente citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  + IL-1)/citoquinas anti-inflamatorias (IL-4 + IL-10) presenta unos niveles más bajos en el grupo de adolescentes europeos que dormía entre 8 y 9 horas cada noche<sup>16</sup>, lo que implica la importancia de este factor en relación con la función del sistema inmune

Para el estudio de la producción de citoquinas por linfocitos y monocitos se requiere que estas células sean estimuladas con un mitógeno como la fitohemaglutinina o el lipopolisacárido bacteriano, aunque, la producción espontánea se pueda medir también en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) sin estimular. Dichas concentraciones de citoquinas se pueden determinar por ELISA o citometría de flujo.

Actualmente, es muy útil la determinación de los receptores solubles de citoquinas en muestras biológicas a través de inmunoensayos.

#### Células inmunocompetentes

- **Recuento y funcionalidad de neutrófilos y monocitos.** Los neutrófilos y los monocitos son los dos tipos principales de células fagocíticas y su recuento nos ayuda a entender cómo responde el sistema inmunitario ante una infección. Con el objetivo de completar el estudio de estas células, además de conocer sus recuentos también es importante evaluar su funcionalidad. Únicamente en los casos extremos, por ejemplo en situaciones de desnutrición grave, los recuentos de leucocitos por ellos mismos son fisiológicamente relevantes. Es importante por lo tanto estar familiarizados con el significado de sus valores normales de referencia.

- **Recuento de linfocitos totales.** El número total de linfocitos es una prueba de uso habitual que permite valorar el estado nutricional y suele estar por encima de 2.000 células/mm<sup>3</sup>. En la desnutrición disminuye el número de linfocitos T, probablemente debido a una disminución de





la maduración de las células precursoras. Se considera que un recuento total de linfocitos entre 1200 y 2.000 células/mm<sup>3</sup> es demostrativo de desnutrición leve; entre 800 y 1.200 células/mm<sup>3</sup>, desnutrición moderada; y por debajo de 800 células/mm<sup>3</sup>, desnutrición grave<sup>17</sup>.

- *Recuento de subpoblaciones de linfocitos.* El análisis fenotípico mediante citometría de flujo permite diferenciar las diferentes subpoblaciones de linfocitos. Además, da información sobre la redistribución de las células inmunocompetentes causada por diversos factores como el ayuno y la realimentación<sup>13</sup>. El estudio de las subpoblaciones de linfocitos incluye: células T maduras (CD3<sup>+</sup>), células T colaboradoras o *helper* (CD4<sup>+</sup>), células T citotóxicas o supresoras (CD8<sup>+</sup>), células NK (CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> 56<sup>+</sup>), células B (CD19<sup>+</sup>), células *naive* y memoria (CD45RA<sup>+</sup> y CD45RO<sup>+</sup>, respectivamente). Este análisis también permite distinguir las subpoblaciones activas mediante el uso de diferentes marcadores como CD69<sup>+</sup>, que es un reflejo de la funcionalidad del sistema inmunitario. El cociente CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> es un índice del estado nutricional que cuando está disminuido refleja estados de inmunodeficiencia secundaria a situaciones de malnutrición<sup>18,19</sup>. Factores de confusión como la duración del sueño influyen en estos recuentos, de hecho se observa una asociación negativa entre las horas de sueño y los recuentos de CD4<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> en adolescentes europeos<sup>16</sup>.

#### Funcionalidad del sistema inmunitario

##### Medidas *in vivo*

- *Vacunas.* Las respuestas a las vacunas se usan ampliamente en los estudios de inmunonutrición en humanos y permiten obtener información muy útil a la hora de estudiar sus efectos sobre la respuesta inmunitaria. No obstante, pueden estar influidas por una variedad de factores, además de los ambientales, tales como el estrés fisiológico, la nutrición, las enfermedades infecciosas y los determinantes de estilo de vida (por ejemplo, el tabaquismo)<sup>20</sup>.

- *Test de hipersensibilidad cutánea retardada (DHST).* El test de hipersensibilidad cutánea retardada se basa en la reacción que ocurre en respuesta a la inyección intradérmica de un conjunto de antígenos comunes (como por ejemplo, la tuberculina). Los mecanismos inmunológicos e histológicos que caracterizan esta forma de respuesta inmunológica se basan en la movilización de los macrófagos y otras células fagocíticas, ampliando la respuesta linfocítica. Sus resultados son un reflejo de una respuesta inmunitaria celular coordinada e integrada ante un determinado estímulo. Un inconveniente de la utilización de este test, es que no se puede volver a repetir en la misma área cutánea y que una vacunación reciente puede interferir con el resultado obtenido<sup>3</sup>.

##### Medidas *ex vivo*

Las medidas *ex vivo* permiten determinar las respuestas funcionales a diferentes tipos de células inmunitarias<sup>3</sup>.

- *Fagocitosis por neutrófilos y monocitos.* Los sustratos para la fagocitosis se pueden estudiar en estado opsonizado (por ejemplo, cuando el antígeno está recubierto del complemento o por anticuerpos) o no opsonizado. Algunas técnicas (por ejemplo, la citometría de flujo) permiten la identificación del número de células que participan en el proceso de fagocitosis y la actividad fagocítica de cada célula<sup>3</sup>. Las medidas de fagocitosis pueden acoplarse a medidas del estallido oxidativo.

- *Estallido oxidativo respiratorio (generación de superóxido) por neutrófilos y monocitos.* Este análisis permite conocer la capacidad oxidativa de las células fagocíticas (neutrófilos y monocitos). Dicha capacidad se puede expresar tanto en porcentaje como en actividad. Para su análisis se miden las especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno. Esta técnica puede orientar en el estudio de los mecanismos de la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria<sup>3</sup>.

- *Respuesta quimiotáctica de neutrófilos o monocitos.* La respuesta quimiotáctica consiste en el movimiento de los neutrófilos y monocitos hacia un estímulo particular; los estímulos utilizados incluyen el leucotrieno B<sub>4</sub> y los péptidos de las paredes celulares bacterianas<sup>3</sup>.

- *Actividad de las células natural killer.* Las células NK ejercen su actividad citolítica de forma directa o bien a través de la secreción de citoquinas/quimioquinas sin necesidad de reconocer previamente el antígeno, a diferencia de los linfocitos B y T. Las células NK actúan frente a las células infectadas por virus y las células tumorales<sup>21</sup>.

La actividad de las células NK es una de las funciones más sensibles que se afecta por la alimentación. Este hecho se puede deber a que las células NK son altamente dependientes de las citoquinas. Su actividad citolítica se puede expresar de diversas formas, como el porcentaje de células diana muertas o bien el "ratio de lisis", que es un cociente entre las células NK y las células diana<sup>3</sup>.

- *Proliferación de linfocitos.* La proliferación de los linfocitos representa un aumento en el número de linfocitos en respuesta a un estímulo. Habitualmente se mide como la incorporación de timidina marcada radioactivamente dentro del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los linfocitos en división, aunque también están disponibles otras pruebas que no implican el uso de radioactividad<sup>3</sup>.

##### Medidas de respuestas inmunes de mucosas

El tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT, del inglés *mucosa-associated lymphoid tissue*) se encuentra





a lo largo de los revestimientos mucosos del cuerpo humano y constituye el componente más extenso del tejido linfoide humano. Estas superficies mucosas protegen al organismo frente a una enorme cantidad y variedad de antígenos. El MALT incluye el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, del inglés *gut-associated lymphoid tissue*), el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT, del inglés *bronchial-associated lymphoid tissue*), el tejido linfoide asociado a la nasofaringe (NALT, del inglés *nasopharynx-associated lymphoid tissue*), el tejido linfoide asociado a la vagina (VALT, del inglés *vulvovaginal-associated lymphoid tissue*) y el tejido linfoide asociado al drenaje lacrimal (LDALT, del inglés *lacrimal drainage-associated lymphoid tissue*)<sup>22</sup>. La arquitectura básica del MALT incluye áreas discretas en las que los linfocitos B se localizan próximos a las áreas en las que predominan los linfocitos T. Los tejidos linfoides del MALT tienen la capacidad de concentrarse y responder a los antígenos locales. La concentración de la inmunoglobulina A (IgA) total e IgA secretora específica de antígenos se utiliza como una medida útil de las respuestas inmunes de mucosas<sup>3</sup>.

El GALT representa hasta un 80% del sistema inmunológico de la mucosa y se distribuye a lo largo del intestino en dos formas: como GALT organizado, que incluye las placas de Peyer, folículos linfáticos aislados y los ganglios linfáticos mesentéricos; y como GALT difuso, que consiste en los linfocitos dispersos en el epitelio y la lámina propia. Ambos compartimientos son parte de un sistema de control con funciones específicas; el GALT organizado es el sitio inductor de la respuesta inmunitaria, mientras que el GALT difuso es el sitio efector. El GALT está implicado tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adquirida. Otro componente del sis-

tema inmunitario de las mucosas consiste en las células T reguladoras inducibles, que mantienen una tolerancia inmunológica periférica a los antígenos derivados de la dieta o de la microbiota comensal. Los biomarcadores del sistema inmune sistémico se pueden encontrar en la lámina propia y se pueden estudiar por los mismos métodos que se han explicado anteriormente<sup>23</sup>.

### Microbiota

Una microbiota intestinal saludable es vista como un atributo positivo de salud, mientras que la disbiosis (desequilibrio de la microbiota intestinal) se asocia a diferentes alteraciones de salud. El conocimiento actual de la microbiota intestinal provee información esencial para poder intervenir de forma eficiente sobre el estado de salud y sobre enfermedades tales como la obesidad, el síndrome metabólico, las intolerancias alimentarias, la enfermedad inflamatoria intestinal y el síndrome del intestino irritable. Además, el sistema nervioso central también está implicado a través de las vías de señalización y comunicación entre el cerebro y el intestino<sup>24</sup> (fig. 3).

En estudios en humanos, la microbiota intestinal puede actuar como un biomarcador a la hora de evaluar las intervenciones dietéticas y de estilo de vida. En el programa de intervención EVASYON (Desarrollo, implantación y evaluación de la eficacia de un programa terapéutico para adolescentes con sobrepeso/obesidad) que incluye estudio de dieta, actividad física y psicología en adolescentes con sobrepeso/obesidad de 13-16 años, se observó que tras la intervención se podían distinguir dos grupos: grupo con baja pérdida de peso (< 2 kg) y grupo con elevada pérdida de peso (> 4 kg). Se sugiere que la

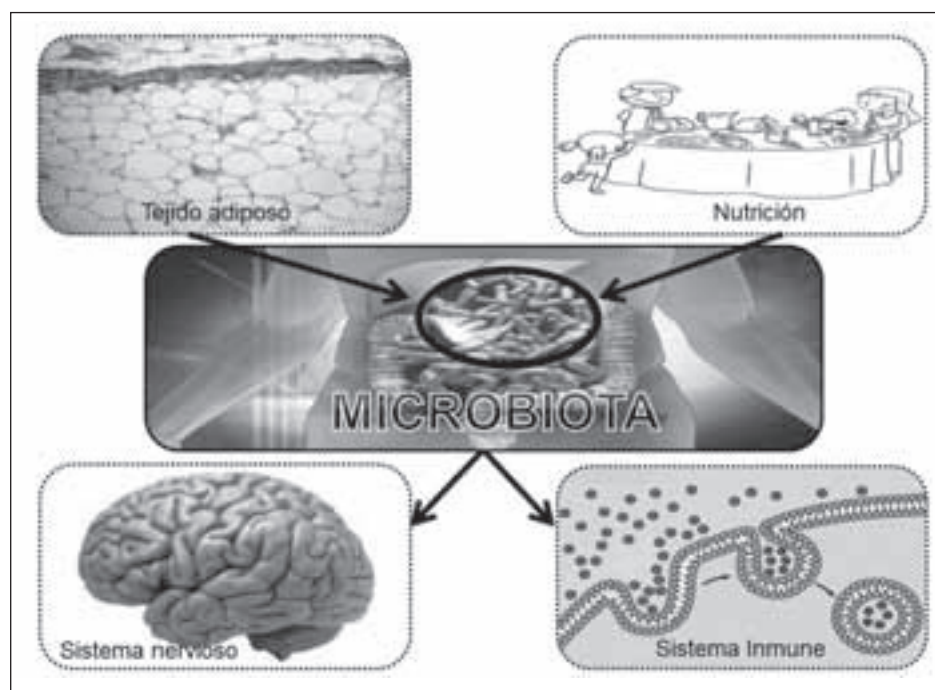


Fig. 3.—Interacción de la microbiota en el estudio de la inmunonutrición.







intervención tuvo un mayor éxito en el grupo que perdió más de 4 kg, posiblemente debido a una composición diferente de la microbiota intestinal entre los dos grupos. Por consiguiente, la composición de la microbiota intestinal de cada persona tiene un papel más importante que lo esperado en las estrategias para perder peso<sup>25</sup>. Por otro lado, los patrones de colonización microbiana en la infancia son diferentes en función del índice de masa corporal (IMC) materno. Esta evidencia sugiere que la microbiota puede actuar como un marcador a la hora de predecir el posible riesgo de obesidad<sup>26</sup>.

Además, la interacción de la microbiota intestinal con las células inmunitarias en el entorno de las mucosas tiene un papel principal en un número de procesos que son directamente dependientes del MALT, tales como la inducción de la tolerancia oral, la modulación de la liberación de citoquinas y quimioquinas y, en general, la regulación de las respuestas inmunitarias en la mucosa intestinal, todos ellos procesos importantes en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>27</sup>.

### Genética

La genómica nutricional tiene un gran potencial a la hora de cambiar el futuro de las guías alimentarias y las recomendaciones dietéticas. Esta disciplina cubre la nutrigenómica, que explora el efecto de los nutrientes sobre el genoma, proteoma y metaboloma, y la nutrigenética, que estudia el efecto de las variaciones genéticas en la interacción entre la dieta y la enfermedad<sup>28</sup>.

La epigenética hace referencia al estudio de los cambios en los patrones heredables de la expresión de los genes que ocurren sin ningún cambio en la secuencia del ADN. En los últimos años, los marcadores epigenéticos se han posicionado como una nueva herramienta para entender la influencia del estilo de vida sobre los fenotipos de obesidad. De hecho, en el estudio EVASYON observamos que los cambios en la metilación pueden ayudar a entender mejor la respuesta de pérdida de peso en adolescentes obesos<sup>29</sup>. Por otro lado, los telómeros (TL) se consideran biomarcadores del envejecimiento biológico. Unos telómeros cortos se han asociado a un aumento de la adiposidad en adultos. En el estudio EVASYON se encontró que una intervención integral de pérdida de peso se acompañó de un aumento significativo de la longitud de los telómeros en adolescentes con sobrepeso/obesidad. Además, se sugiere que una mayor longitud inicial de los telómeros podría ser un predictor de una mejor respuesta de pérdida de peso<sup>30</sup>.

Se han identificado numerosas variantes de genes que están asociadas con un mayor o menor riesgo de diferentes ECVs y de fenotipos intermediarios (por ejemplo: hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes). No obstante, a pesar de la estrecha relación entre el envejecimiento y las ECVs, los estudios que analizan los genes relacionados con la longevidad humana no han obtenido resultados consistentes. El gen APOE representa una

excepción, debido a que se ha identificado su papel relevante en las ECVs y la longevidad<sup>30</sup>.

### Aplicaciones de la inmunonutrición

La inmunonutrición es una materia emergente que permite llevar a cabo una serie de estudios basados fundamentalmente en cuatro líneas de investigación:

- Evaluación a través de biomarcadores inmunológicos del estado nutricional de poblaciones supuestamente sanas pero con riesgo de malnutrición (niños, adolescentes, adultos, gestantes, personas mayores y deportistas). Se pueden estudiar los diferentes biomarcadores inmunológicos y de estrés en muestras de suero y plasma de sujetos en los distintos periodos etarios con el objetivo de detectar el riesgo de estados potenciales de malnutrición, tanto por defecto como por exceso. El desarrollo del sistema inmunitario empieza en el ambiente uterino y continúa durante la lactancia, viéndose afectado por el estilo de vida y la nutrición de la madre. Posteriormente, la infancia y la adolescencia son periodos críticos durante los cuales los hábitos saludables deben ser instaurados, teniendo un impacto posterior sobre la salud en la edad adulta. Finalmente, la inmunosenescencia está relacionada con déficits subclínicos de nutrientes que pueden afectar el sistema inmunitario y las funciones cognitivas de las personas mayores.
- Estudio de la evolución de pacientes con enfermedades relacionadas con la nutrición y el sistema inmunitario, entre las que se encuentran alergias alimentarias y demás atopias, así como trastornos alimentarios, obesidad, síndrome metabólico, diabetes, ECV, distintos tipos de cáncer y patologías de características autoinmunes, como fibromialgia, esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer, en particular.
- Estudio de los efectos de nutrientes, compuestos bioactivos y alimentos convencionales y funcionales sobre el sistema inmunitario.
- Estudio del impacto de determinantes del estilo de vida, como la actividad física, el ejercicio, el sedentarismo, el comportamiento alimentario, el tiempo y la calidad del sueño y el estrés, sobre la respuesta inmunitaria.

### Recomendaciones y consideraciones finales

El uso de los parámetros inmunológicos para evaluar el estado nutricional debería tenerse en cuenta tanto a nivel individual como en epidemiología, especialmente en la clínica. La inmunonutrición como materia emergente y transversal es una potente herramienta que permite detectar desequilibrios nutricionales a nivel subclínico, causados por una situación de malnutrición tanto por defecto como por exceso.





## Referencias

- Romeo J, Pérez de Heredia F, Gómez-Martínez S, Díaz LE, Pozo-Rubio T, Marcos A. Food Supplements and Immune Function in Humans. In: Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases. Watson R, Preedy V, eds. San Diego, CA, USA: Academic Press; 2013, pp.145-56.
- Pérez de Heredia F, Gómez-Martínez S, Marcos A. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc* 2012; 71 (2): 332-8.
- Calder PC. Immunological parameters: what do they mean? *J Nutr* 2007; 137 (3 suppl. 2): 773S-780S.
- Delves PJ, Seamus JM, Burton DR, Roitt IM. Essential Immunology. 12<sup>th</sup> ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2011.
- Purchiaroni F, Tortora A, Gabrielli M, Bertucci F, Gigante G, Ianiro G et al. The role of intestinal microbiota and the immune system. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17 (3): 323-33.
- Uauy R. Academic-industry partnerships in addressing nutrition-[infection-immunity-inflammation] interactions. *Br J Nutr* 2007; 98 (Suppl. 1): S17-23.
- Scrimshaw NS, Taylor CE & Gordon, J. E. (1968) Interactions of nutrition and infection. *Monogr Ser World Health Organ* 57: 3-329.
- Wärnberg J, Ruiz JR, Ortega FB, Romeo J, González-Gross M, Moreno LA et al. On behalf of AVENA group. AVENA study. Food and Nutritional Evaluation in Adolescents. Results obtained 2003-2006. *Pediatr Integr* 2006; (Suppl. 1): 50-5.
- Albers R, Antoine JM, Bourdet-Sicard R, Calder PC, Gleeson M, Lesourd B et al. Markers to measure immunomodulation in human nutrition intervention studies. *Br J Nutr* 2005; 94 (3): 452-81.
- Marcos A. Eating disorders: a situation of malnutrition with peculiar changes in the immune system. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54 (Suppl. 1): S61-64.
- Marcos A. The immune system in eating disorders: an overview. *Nutrition* 1997; 13: 853-62.
- Savino W, Dardenne M. Nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T-cell-mediated immune responses. *Proc Nutr Soc* 2010; 69 (4): 636-43.
- Nova E, Martínez-Gómez D, Gómez-Martínez S, Veses AM, Calle ME, Veiga OL, Marcos A. Influence of health behaviours on the incidence of infection and allergy in adolescents: the AFINOS cross-sectional study. *BMC Public Health* 2014; 14: 19.
- Wärnberg J. Inflammatory status in adolescents; the impact of health determinants such as overweight and fitness. Thesis for doctoral degree, 2006. Stockholm: Karolinska University Press; 2006.
- Nova E, Gómez-Martínez S, Morandé G, Marcos A. Cytokine production by blood mononuclear cells from inpatients with anorexia nervosa. *Br J Nutr* 2002; 88 (2): 183-8.
- Pérez de Heredia F, Garaulet M, Gómez-Martínez S, Díaz LE, Wärnberg J, Andrououts O, Michels N, Breidenassel C, Cuenca-García M, Huybrechts I, Gottrand F, Ferrari M, Santaliestra-Pasias AM, Kafatos A, Molnár D, Sjöström M, Widhalm K, Moreno LA, Marcos A; HELENA Study Group. Self-reported sleep duration, white blood cell counts and cytokine profiles in European adolescents: the HELENA study. *Sleep Med* 2014; 15 (10): 1251-8.
- Codificación de la Desnutrición Hospitalaria. En: Codificación Clínica con la CIE-9-MC. Unidad Técnica de la CIE-9-MC para el Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad y Política Social. Madrid: 2008.
- Walrand S, Moreau K, Caldefie F, Tridon A, Chassagne J, Portefaix G, Cynober L, Beaufrière B, Vasson MP, Boirie Y. Specific and nonspecific immune responses to fasting and refeeding differ in healthy young adult and elderly persons. *Am J Clin Nutr* 2001; 74 (5): 670-8.
- Marcos A, Nova E, Montero A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57 (Suppl. 1): S66-9.
- Van Loveren H, Van Amsterdam JG, Vandebriel RJ, Kimman TG, Rümke HC, Steerenberg PS, Vos JG. Vaccine-induced antibody responses as parameters of the influence of endogenous and environmental factors. *Environ Health Perspect* 2001; 109 (8): 757-64.
- Park KH, Park H, Kim M, Kim Y, Han K, Oh EJ. Evaluation of NK cell function by flowcytometric measurement and impedance based assay using real-time cell electronic sensing system. *Biomed Res Int* 2013; 210726.
- Brandtzaeg P. Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. *Immunol Invest* 2010; 39 (4-5): 303-355.
- Granger N, Kevil CG & Grisham MB (2006) Recruitment of inflammatory and immune cells in the gut: physiology and pathophysiology. In Physiology of the gastrointestinal tract, pp. 1137-1162 [LR Johnson, KE Barrett, JL Merchant, FK Ghishan, HM Said and JD Wood, editors]. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Doré J, Simrén M, Buttler L, Guarner F. Hot topics in gut microbiota. *United European Gastroenterol J* 2013; 1 (5): 311-8.
- Santacruz A, Marcos A, Wärnberg J, Martí A, Martín-Matillas M, Campoy C et al. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17 (10): 1906-15.
- Sanz Y, Moya-Pérez A. Microbiota, inflammation and obesity. *Adv Exp Med Biol* 2014; 817: 291-317.
- Nova E, Wärnberg J, Gómez-Martínez S, Díaz LE, Romeo J, Marcos A. Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *Br J Nutr* 2007; 98 (Suppl. 1): S90-95.
- Corella D, Ordovás JM. Aging and cardiovascular diseases: The role of gene-diet interactions. *Ageing Res Rev* 2014; 18C: 53-73.
- Moleres A, Campión J, Milagro FI, Marcos A, Campoy C, Garagorri JM, Gómez-Martínez S, Martínez JA, Azcona-Sanjulián MC, Martí A; EVASYON Study Group. Differential DNA methylation patterns between high and low responders to a weight loss intervention in overweight or obese adolescents: the EVASYON study. *FASEB J* 2013; 27 (6): 2504-12.
- García-Calzón S, Moleres A, Marcos A, Campoy C, Moreno LA, Azcona-Sanjulián MC, Martínez-González MA, Martínez JA, Zalba G, Martí A; EVASYON Study Group. Telomere length as a biomarker for adiposity changes after a multidisciplinary intervention in overweight/obese adolescents: the EVASYON study. *PLoS One* 2014; 9 (2): e89828.

