



TESIS DOCTORAL

SERIE: SALUD

Estudio de biomarcadores inmunológicos, bioquímicos y endocrinos en pacientes con anorexia nerviosa en su primer episodio

Programa de Doctorado en Biomedicina

Escuela de Doctorado e Investigación

Ana María Elegido Fluiters

Dirigida por:

Dra. Esther Nova Rebato

Dra. Ascensión Marcos Dra. Montserrat Graell Berna

Madrid, 2021

INFORME Y AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR PARA PRESENTAR LA TESIS DOCTORAL

{Insertar Informe RELATIVO A TRABAJO DE INVESTIGACION}

El trabajo recogido en esta tesis doctoral es fruto de un proyecto de investigación financiado por la Fundación Koplowitz, cuyo objetivo era realizar una evaluación longitudinal de variables clínicas, biológicas y familiares involucradas en la prognosis de las pacientes con anorexia nerviosa (AN). El trabajo que ha sido abordado en la presente tesis ha tenido por objeto aportar un estudio de biomarcadores inmunológicos y endocrinos en una población bien definida de pacientes de AN caracterizada por encontrarse en el primer episodio de la enfermedad. Esta premisa inicial se consideró valiosa para la eliminación de factores de confusión que se consideran implicados en la falta de consistencia de las evidencias recogidas en la literatura acerca de la alteración o mantenimiento de dichos marcadores y su significado en relación con los mecanismos adaptativos a las bajas ingestas que las pacientes se autoimponen. Asimismo, se ha estudiado el valor que determinadas hormonas, y marcadores inmunológicos y bioquímicos pueden tener como marcadores de severidad del estado de malnutrición en que se encuentran las pacientes. Además se ha trabajado con un diseño óptimo basado en pares caso-control para sexo, edad y estado socioeconómico, que nos permitiera reducir el efecto de ciertos sesgos y esclarecer cuestiones no resueltas en los antecedentes bibliográficos. Así, esta tesis ha aportado evidencias acerca del posible significado de la linfocitosis relativa como mecanismo de adaptación temprana a las bajas ingestas, ha establecido cuáles son las alteraciones bioquímicas, endocrinas e inmunológicas esperables en pacientes adolescentes en el primer episodio y cómo pueden parecerse o diferenciarse de los resultados obtenidos en grupos de pacientes menos homogéneos y ha permitido valorar marcadores de severidad, considerando que si los biomarcadores siguen presentando valores distintos de la población control al año de tratamiento y con una aceptable recuperación ponderal, podrían estar reflejando mecanismos adaptativos no relacionados exclusivamente con la disminuida masa corporal. Por tanto este trabajo aporta nuevos datos de la situación inmunoendocrina de pacientes con AN de corta evolución de la enfermedad y sienta las bases para relacionar más a fondo el análisis de biomarcadores con la evolución clínica y posibles mejoras del tratamiento.

{Insertar Informe RELATIVO A MERITOS REFERIDOS EN EL DAD}

A lo largo de su periodo de actividad como Doctoranda, ha publicado dos artículos originales de investigación en los que ha participado en tareas de análisis estadísticos y escritura del borrador del manuscrito y ha escrito un tercero que está en una fase avanzada del manuscrito. Ha participado en 12 congresos de alcance nacional o internacional en los que se han presentado comunicaciones orales (4) y posters (8), habiendo realizado la doctoranda varias de las presentaciones como autor principal. Además, ha realizado periodos de estancia en el Hospital Infantil universitario Niño Jesús durante el desarrollo de la tesis doctoral. Con todo ello ha mostrado el aprendizaje de procedimientos necesarios para el desarrollo de la actividad investigadora y ha adquirido competencias para realizarlos de forma independiente.

La Dra. D. Esther Nova Rebató, directora de la Tesis, de la que es autor Dña. Ana Elegido Fluiters.

AUTORIZA la presentación de la referida Tesis para su defensa en cumplimiento del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las Enseñanzas Oficiales de Doctorado, y de acuerdo al Reglamento de Enseñanzas Universitarias Oficiales de Doctorado de la Universidad Europea de Madrid RD99/2011.

____ Madrid, 27 de junio de 2021

Fdo. Dr./Dra. _____



ESCUELA DE DOCTORADO E INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD EUROPEA DE MADRID

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mis tres directoras su entrega y dedicación durante estos años. Muchas gracias Esther por tu invaluable ayuda y por el tiempo dedicado. Gracias por enseñarme la importancia del detenimiento, la reflexión y el análisis detallado en el trabajo de investigación. ¡Gracias por tu paciencia y tu apoyo!. Agradecer también a Ascensión, por creer en mí desde el principio y animarme a que nunca es tarde. ¡Ojalá el mundo estuviera lleno de mentes abiertas como la tuya!, gracias por tu dedicación, tu guía y tus sabios consejos. También me gustaría agradecer a Montse por creer en mí, por su dedicación y por abrirme las puertas del Hospital. Esta ha sido una parte muy importante de mi aprendizaje, con ella he tenido la oportunidad de integrar y comprender, en parte, la verdadera realidad del paciente y la enorme complejidad de estas patologías. Gracias por compartir conmigo tu conocimiento y experiencia y por enseñarme a ver la necesidad de firmeza, respeto y siempre búsqueda de bienestar del paciente. Ha sido para mí un honor trabajar en un proyecto en el que participaban dos Instituciones que se complementan y enriquecen mutuamente. También me gustaría agradecer a Igone, mi tutora desde la universidad, su ayuda y su cercanía. Gracias también por tu confianza desde nuestra primera entrevista y por animarme a desarrollar mi lado clínico. No querría dejar de daros las gracias a las cuatro por vuestra comprensión y confianza para continuar cuando más lo he necesitado.

Me gustaría mostrar también, unas palabras de recuerdo y agradecimiento al Dr. Morandé, un verdadero Maestro, siempre generoso con su inteligencia y experiencia. Por otro lado, me gustaría dar las gracias al Laboratorio clínico del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, al fantástico equipo de la Unidad de TCA, así como al Grupo de Investigación en Inmunonutrición del ICTAN, por su tiempo y su colaboración.

Muchas gracias también a mis hermanos por su apoyo e interés en mi trabajo, y a mis catorce sobrinos y sobrino nieto, por ser siempre motivo de alegría y fortaleza para mí. A mi compañera de estudio Laura. Ha sido un placer pasar todas estas horas contigo para hacer “la ciencia”, gracias por tu apoyo siempre, tu comprensión, tu alegría y tu buena cabeza. Sin los demás podemos avanzar un poco, sólo con los demás podemos llegar lejos. Nachín, Lara, Manzi, Laura. Imposible sin vosotros. Gracias también a Nacho, mi biólogo favorito, por su ayuda, su apoyo, su cariño, y por darme confianza cuando no la tenía. Finalmente a todos mis amigos y también a aquellas personas cercanas a mí que trabajan cuidando, y que me han acompañado en este proceso. ¡Muchas gracias!

“A mis padres, con mi más profundo agradecimiento por el amor y la libertad que me dieron. Por permitirme siempre ser yo misma y por enseñarme a estudiar y a trabajar con amor”.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	11
Índice de Tablas.....	17
Índice de Figuras	18
Acrónimos.....	19
RESUMEN.....	23
ABSTRACT	27
1 INTRODUCCIÓN	33
1.1 Definición: Trastornos de la conducta alimentaria: Anorexia nerviosa, bulimia nerviosa y otros trastornos especificados	33
1.2 Contexto. Etiopatogenia y clínica.....	36
1.2.1 Etiopatogenia	36
1.2.2 Clínica.....	37
1.3 Respuesta fisiológica a la malnutrición en TCA.....	41
1.3.1 Estado nutricional.....	41
1.3.2 Péptidos gástricos.....	41
1.3.3 Sistema inmunológico.....	42
1.3.3.1 Generalidades del sistema inmunitario	42
1.3.3.2 Marcadores inmunológicos y su utilidad en la práctica clínica: 51	
1.3.3.3 Sistema inmunitario en TCA.....	54
1.3.4 Respuesta endocrina y metabólica	60
1.3.4.1 Eje hipotálamo-hipófisis gonadal	62

1.3.4.2	Eje hipotálamo-hipófisis tiroideo	63
1.3.4.3	Eje hipotálamo-hipófisis suprarrenal	64
1.3.4.4	Adipocitoquinas y péptidos reguladores del apetito	64
1.4	Biomarcadores en AN	68
1.5	Justificación de la tesis.....	71
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	77
2.1	Primer estudio.....	77
2.1.1	Hipótesis.....	77
2.1.2	Objetivos	77
2.2	Segundo estudio.....	78
2.2.1	Hipótesis.....	78
2.2.2	Objetivos	78
2.3	Tercer estudio	78
2.3.1	Hipótesis.....	78
2.3.2	Objetivos	79
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	83
3.1	Organización por estudios	83
3.2	Tipos y diseño de investigación.....	84
3.2.1	Primer estudio	84
3.2.1.1	Diseño y constitución del estudio.....	84
3.2.1.2	Variables evaluadas	84
3.2.2	Segundo estudio	84
3.2.2.1	Diseño y constitución del estudio.....	84
3.2.2.2	Variables evaluadas	85

3.2.3	Tercer estudio.....	85
3.2.3.1	Diseño y constitución del estudio	85
3.2.3.2	Variables evaluadas.....	85
3.3	Participantes	85
3.3.1	Pacientes	86
3.3.2	Controles	91
3.3.2.1	Grupo control AFINOS (primer estudio)	91
3.3.2.2	Grupo control ANOBAS (segundo y tercer estudio).....	92
3.3.3	Cálculo del tamaño de la muestra	93
3.3.3.1	Primer estudio.....	93
3.3.3.2	Segundo estudio.....	93
3.4	Instrumentos y procedimientos	94
3.4.1	Medidas antropométricas en pacientes y controles	94
3.4.2	Análisis de sangre	95
3.4.2.1	Recuentos de células blancas.....	95
3.4.2.2	Fenotipado inmunológico de subpoblaciones	96
3.4.2.3	Determinación de adipocitoquinas, citoquinas y PYY	97
3.4.2.4	Determinación de sObR.....	98
3.4.2.5	Determinación de marcadores bioquímicos y hormonales .	98
3.5	Análisis de datos	100
3.5.1	Primer estudio.	100
3.5.2	Segundo estudio	101
3.5.3	Tercer estudio.....	102
4	RESULTADOS	107

4.1	Primer estudio.....	107
4.1.1	Glóbulos blancos y subpoblaciones linfocitarias en pacientes de TCA en estado basal.....	107
4.2	Segundo estudio	120
4.3	Tercer estudio	126
4.3.1	Distribución de grupos y edad	126
4.3.2	Datos antropométricos	126
4.3.3	Parámetros hormonales, bioquímicos, inmunológicos y adipocitoquinas. Marcadores de enfermedad y severidad.....	127
4.3.4	Parámetros bioquímicos e inmunológicos.....	127
4.3.5	Parámetros hormonales	128
4.3.6	Adipocitoquinas	129
4.3.7	Comparaciones entre pacientes con IMC “saludable” y controles	130
5	DISCUSIÓN.....	139
5.1	Estado del sistema inmunológico	139
5.1.1	Células blancas y subpoblaciones linfocitarias	139
5.1.1.1	Diferencias por subtipos diagnósticos	144
5.1.2	Citoquinas.....	146
5.2	Otros mediadores:.....	148
5.2.1	Cortisol	148
5.2.2	Adipocitoquinas	149
5.2.3	Limitaciones del segundo estudio	153
5.3	Biomarcadores en el análisis longitudinal.....	154
5.3.1	Indicadores bioquímicos del estado nutricional	155

5.3.2	Hormonas.....	159
5.3.3	Leptina, sObR y FLI.....	162
5.3.4	Adiponectina	166
	CONSIDERACIONES FINALES Y LÍNEAS DE FUTURO	168
6	CONCLUSIONES	175
	BIBLIOGRAFÍA	179
	ANEXOS	217
	Anexo 1- Modelo de consentimiento informado entregado a participantes	217
	Anexo 2- Permisos de las imágenes	223
	Anexo 3- Publicaciones.....	246

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios diagnósticos de AN. DSM-5.....	23
Tabla 2. Criterios diagnósticos de BN. DSM-5.....	35
Tabla 3. Criterios diagnósticos de OTAIE. DSM-5.....	36
Tabla 4. Manifestaciones clínicas en AN.....	39
Tabla 5. Componentes del sistema inmunitario.....	44
Tabla 6. Diseño, participantes y variables de los tres estudios.....	83
Tabla 7. Subpoblaciones linfocitarias analizadas.....	97
Tabla 8. Técnicas para la determinación de marcadores bioquímicos y hormonales.....	99
Tabla 9. Parámetros antropométricos en controles y pacientes con TCA. Estudio primero.....	108
Tabla 10. Células blancas (porcentaje y número) en adolescentes con TCA.....	110
Tabla 11. Subpoblaciones linfocitarias en adolescentes con TCA.....	113
Tabla 12. Particularidades en las subpoblaciones linfocitarias por subtipos diagnósticos.....	114
Tabla 13. Asociaciones entre el Z score del IMC y los glóbulos blancos en pacientes con TCA.....	116
Tabla 14. Asociaciones entre el Z score del IMC y las subpoblaciones linfocitarias en pacientes con TCA.....	117
Tabla 15. Parámetros demográficos y antropométricos en pacientes adolescentes con AN emparejados con adolescentes sanas.....	122

Tabla 16. Niveles de adipocitoquinas, cortisol y citoquinas en pacientes adolescentes con anorexia nerviosa comparados con adolescentes sanas.....	123
Tabla 17. Niveles de IL-1 β e IL-2 en pacientes adolescentes con anorexia nerviosa comparados con adolescentes sanas.....	124
Tabla 18. Edad y características antropométricas en pacientes adolescentes con anorexia nerviosa comparado con grupo control.....	132
Tabla 19. Biomarcadores sanguíneos en pacientes adolescentes con AN (leves y graves) en comparación con controles sanos, en T0 y tras doce meses de tratamiento.....	133
Tabla 20. Comparaciones grupo saludable-control en tiempo final. Estudio tercero.....	134
Tabla 21. Correlaciones significativas en grupo control.....	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelos conceptuales. Etiopatogenia de los TCA.....	37
Figura 2. Síntomas físicos en la Anorexia nerviosa.....	40
Figura 3. Representación esquemática del sistema inmunológico humano....	49
Figura 4. Diagrama esquemático de la interacción de las células inmunes con el eje HPA a través de citoquinas inflamatorias durante una respuesta normal.....	58
Figura 5. Cambios hormonales y otras alteraciones en pacientes con ANR....	62
Figura 6. Distribución y procedencia de los participantes por estudios.....	86
Figura 7. Área de una distribución normal por segmentos en función de la desviación estándar.....	90
Figura 8. Valores de adipocitoquinas, cortisol, IL-6 y TNF-alpha en pacientes con AN comparados con adolescentes sanas.....	125

ACRÓNIMOS

25-OH VIT D 25 – Hidroxivitamina D

AcMo – Anticuerpos monoclonales

ACTH – Adrenocorticotropina / hormona Adenocorticotropa

AN – Anorexia nerviosa

ANABEL – Anorexia Nerviosa en Adolescentes: Biomarcadores de Evolución Longitudinal

ANOVA – Análisis de varianza unidireccional

ANP – Anorexia nerviosa subtipo purgativo

ANR – Anorexia nerviosa subtipo restrictivo

BN – Bulimia nerviosa

C3 – Factor del complemento C3

C4 – Factor del complemento C4

CART – Péptido regulado por cocaína y anfetamina

CD – Clúster de diferenciación

Célula NK – Célula asesina natural (natural killer)

CPA – Células presentadoras de antígenos

CRH – Corticotropina

DAMPs – Patrones moleculares asociados al daño

DE – Desviaciones estándar

DMO – Densidad mineral ósea

DSM 5 – Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, 5ª edición

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

FLI – Índice de leptina libre

FSH – Hormona foliculoestimulante

GEB – Gasto energético basal

GER – Gasto energético en reposo

GnRH – Hormona liberadora de gonadotropina

HPA – Hipotálamo-hipófisis-adrenal

HUINJ – Hospital Universitario Infantil Niño Jesús

IFN γ – Interferón gamma

IL – Interleuquina

IL-1 β – Interleuquina 1 β

IL-2 – Interleuquina 2

IL-6 – Interleuquina 6

LH – Hormona Luteinizante

NK – Célula asesina natural (natural killer)

NPY – Neuropeptido Y

NSE – Nivel socioeconómico

OTAIE – Otros trastornos alimentarios y de la ingesta especificados

PAMPs – Patrones moleculares asociados a los patógenos

PCI – Peso corporal ideal

PYY – Péptido YY

SNC – Sistema nervioso central

SNS – Sistema nervioso simpático

sObR – Receptor soluble de leptina

T12 – Tiempo 12 meses

T3 – Triyodotironina

Tc – Linfocito T citotóxico

TCA – Trastornos de la conducta alimentaria

TCANE – Trastornos de la conducta alimentaria no especificados

TCR –Receptores de células T

Th – Linfocito T colaborador

TNF – Factor de necrosis tumoral

TNF- α – Factor de necrosis tumoral alpha

To – Tiempo basal

TSH – Tirotropina

Z score – Puntuación normalizada Z

Clúster de diferenciación

CD45+CD3+ (linfocitos T maduros)

CD3+ (linfocitos T maduros)

CD45+CD4+ (Linfocitos T colaboradores)

CD4+ (linfocitos T colaboradores)

CD45+CD8+ (linfocitos T citotóxicos)

CD8+ (linfocitos T citotóxicos)

CD45+CD3-(CD56+16)+ (células *Natural Killer* o NK)

CD57+ (células *Natural Killer* o NK)

CD45+CD19+ (linfocitos B)

CD19+ (linfocitos B)

CD3+CD45RO+ (linfocitos T de memoria)

CD45RO+ RA⁻CD8+ (linfocitos T citotóxicos de memoria)

CD4+CD45RA+ (linfocitos T colaboradores naïve)

CD3+CD4+CD45RO+ (linfocitos T colaboradores de memoria)

CD8+CD45RA+ (linfocitos T citotóxicos naïve)

CD3+CD8+CD45RO+ (linfocitos T citotóxicos de memoria)

RESUMEN

Los trastornos del comportamiento alimentario (TCA) son patologías graves, complejas y de difícil abordaje. Tienen la mayor tasa de mortalidad global de las enfermedades mentales, especialmente en el caso de la anorexia nerviosa. Estos trastornos conllevan importantes problemas sanitarios y sociales con un elevado impacto en la salud pública y graves consecuencias en quienes la padecen, familiares y su entorno.

La anorexia nerviosa (AN) está asociada con una pérdida severa de peso, temor intenso a engordar y distorsiones en la percepción de la imagen corporal. El curso clínico es largo y complicado y los tratamientos no son efectivos en muchas ocasiones. Los pacientes presentan en su clínica evidencias de importantes anomalías inmunológicas, metabólicas y hormonales. En múltiples ocasiones los estudios realizados, especialmente en lo concerniente a alteraciones del sistema inmunológico, no muestran consistencia en muchos de los hallazgos descritos, en parte, por falta de homogeneidad en los propios grupos de estudio.

El presente trabajo tiene como objetivo profundizar en la evaluación de marcadores inmunológicos, metabólicos y hormonales, así como en la detección de biomarcadores clínicos de la enfermedad, en un grupo de pacientes diagnosticadas con AN y otros trastornos alimentarios y de la ingesta especificados (OTAIE) y con unas características definidas, siendo todas las pacientes de sexo femenino, adolescentes y en su primer episodio de la enfermedad. Incluye tres estudios basados en datos recogidos en el marco del estudio integral ANABEL (Anorexia Nerviosa en Adolescentes: Biomarcadores de Evolución Longitudinal), un estudio longitudinal diseñado para evaluar variables bioquímicas, inmunológicas, clínicas, familiares y sociales de utilidad en el

diagnóstico, seguimiento y pronóstico de AN de inicio en la adolescencia. Globalmente, el estudio realizó un seguimiento de 66 pacientes durante un año (46 AN restrictiva, 11 AN purga/atracón, y 9 OTAIE). Este trabajo se compone de tres estudios que presentan resultados de los análisis de células sanguíneas y subpoblaciones linfocitarias, adipocitoquinas y otras proteínas implicadas en la respuesta inmune y la inflamación, así como de determinadas hormonas relevantes en esta patología.

En el primer estudio, realizado en tiempo basal, se compararon células blancas y subpoblaciones linfocitarias en AN y controles. Se observó como hallazgo principal la presencia de linfocitosis relativa ($P < 0.05$) como consecuencia de una mayor producción de linfocitos T y linfocitos B en la población de estudio, lo que parece constituir un mecanismo de adaptación para mantener la respuesta inmune adaptativa en condiciones de bajas ingestas. En particular la subpoblación T CD4+ naïve se modificó de forma proporcionalmente inversa a la magnitud de la malnutrición juzgada por el Z score del IMC ($P < 0.05$). En el segundo estudio se evaluaron, con un diseño de pares caso-control, los niveles de leptina, receptor soluble de leptina, adiponectina, cortisol y las citoquinas IL-1 β , IL-2, IL-6 y TNF- α . De acuerdo con la literatura, los resultados confirmaron valores menores de leptina ($P < 0.001$) y cortisol ($P < 0.05$) y mayores de adiponectina ($P < 0.001$) en comparación con los pares controles. Sin embargo, no se encontró una clara alteración de las citoquinas proinflamatorias en la etapa temprana del desarrollo de la AN, lo que contradice hallazgos publicados previamente descritos en pacientes con AN con características variables. Ello sugiere que la tendencia hacia la activación basal del sistema inmune podría ser un mecanismo más tardío que la linfocitosis relativa y por tanto no sería evidente en pacientes de primer episodio.

Finalmente, el tercer estudio, de carácter longitudinal, reveló la persistencia, tras doce meses de tratamiento, de niveles aumentados de ferritina ($P<0.05$), receptor soluble de leptina ($P<0.05$) y adiponectina ($P<0.05$) así como valores disminuidos de estradiol ($P<0.05$), T3 ($P<0.05$), y leptina ($P<0.05$), en pacientes que al inicio presentaban distinto grado de severidad de acuerdo al IMC. Estas alteraciones estarían poniendo de manifiesto la permanencia de mecanismos de adaptación metabólica a la malnutrición a pesar de la importante recuperación ponderal producida tras los doce meses de tratamiento. Mas allá, encontramos que el grupo de pacientes con características antropométricas saludables tras los doce meses de tratamiento continuaban mostrando niveles alterados de ferritina, estradiol y receptor soluble de leptina, lo cual parece ser indicativo de la necesidad del mantenimiento de mecanismos de compensación incluso en los casos de normopeso; si bien, siguen presentando diferencias en masa corporal respecto al grupo control a pesar de tener una buena respuesta al tratamiento.

Palabras clave: anorexia nerviosa, biomarcadores, adolescentes, sistema inmune, sistema endocrino, adipocitoquinas.

ABSTRACT

Eating disorders (ED) are serious and complex pathologies difficult to treat. They have the highest mortality rates among psychiatric disorders, particularly in the case of anorexia nervosa (AN). These disorders bear substantial sanitary and social costs with a high impact in public health systems and serious consequences to those suffering from them and their families. Anorexia nervosa is characterized by severe weight loss, intense fear of weight gaining and distorted body image. It has a long course with associated complications and treatments are frequently not successful. Patients present with evidence of important immunologic, metabolic and hormonal abnormalities. However, particularly in the case of immune alterations, published studies have not shown consistency in the reported results, which is attributable to lack of homogeneity between the study groups.

The present work aims at contributing to a better evaluation of immunological, metabolic and hormonal markers, and the finding of new clinical biomarkers for the disease, studying a group of patients diagnosed with AN and other specified eating disorders., all being adolescent females in their first episode of the disease. The work is composed of three studies based on data gathered from the integral study ANABEL (Anorexia Nerviosa en Adolescentes: Biomarcadores de Evolución Longitudinal), a longitudinal study designed for the assessment of biochemical, immunological, clinical, familiar and societal variables of potential value for diagnostic, follow-up and prognostic purposes in adolescent-onset AN. Overall, the study followed a total of 66 patients over one year (46 restrictive subtype AN, 11 binge purge subtype AN and 9 OSFED). This work consists of three studies that present results of the analysis of blood cells and lymphocyte subsets, adipocytokines and other proteins involved in the immune response and inflammation, as well as certain relevant hormones in this pathology.

In the first study, done in patients at diagnosis, white blood cell and lymphocyte subset populations from patients with AN and other eating disorders were compared with controls. The main findings are the presence of relative lymphocytosis ($P < 0.05$) in restrictive AN patients as a consequence of a higher relative production of T lymphocytes and B lymphocytes in patients. This seems to indicate the presence of adaptive mechanisms to preserve adaptive immunity in a context of low calorie intake. In particular, CD4+ naive T cell subpopulation changes were inversely correlated with the magnitude of malnutrition as measured by BMI Z-scores ($P < 0.05$). The second study, with a paired case-control design, evaluated serum levels of leptin, leptin soluble receptor, adiponectin, cortisol, and the cytokines IL-1 β , IL-2, IL-6 and TNF- α . In line with previous literature, our results showed decreased levels of leptin ($P < 0.001$) and cortisol ($P < 0.05$), and increased levels of adiponectin ($P < 0.001$) in AN patients compared to the paired controls. However, we did not find clear alterations regarding pro-inflammatory cytokines in this early stage of AN, what is conflicting with previous reports in patient groups of variable features and conditions. This suggests that the manifestation of an activated immune system could be seen later on in the course of disease, and not normally found in the first episode.

Finally, the third study showed, after a twelve month period of treatment, the persistence of high levels of ferritin ($P < 0.05$), soluble leptin receptor ($P < 0.05$) and adiponectin ($P < 0.05$), as well as decreased levels of estradiol ($P < 0.05$), T3 ($P < 0.05$), and leptin ($P < 0.05$) in patients with different initial severity according to BMI values. These alterations seem to indicate the maintenance of adaptive mechanisms for energy balance, despite a substantial weight recovery after the twelve month treatment period. Moreover, we find that also in the subgroup of patients that achieved healthy anthropometric measures, alterations in the

levels of ferritin, estradiol, and soluble leptin receptor still persisted, which could emphasize further persistence of disease-related mechanisms involved in energy balance regulation even in cases with a normalized weight, that is however still under the weight values in controls even after the good response to treatment shown.

Keywords: anorexia nervosa, biomarkers, adolescent, immune system, endocrine system, adipocytokines.

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 Definición: Trastornos de la conducta alimentaria: Anorexia nerviosa, bulimia nerviosa y otros trastornos especificados

Los trastornos de la conducta alimentaria (TCA) son enfermedades psiquiátricas graves que se caracterizan por patrones alimentarios anormales. Según los criterios diagnósticos establecidos por el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, 5ª edición (DSM-5) (1), la anorexia nerviosa (AN) es un trastorno caracterizado por una restricción persistente de la ingesta energética, que resulta en un peso corporal significativamente bajo en relación al correspondiente por edad, sexo y curso de desarrollo. Durante la anorexia nerviosa, los pacientes sufren miedo intenso a ganar peso y una alteración en la forma en la que perciben su propio peso y constitución. La anorexia nerviosa puede cursar de dos modos: el subtipo restrictivo (ANR) y el purgativo (ANP) . El primero incluye aquellas presentaciones en las que la pérdida de peso es debida sobre todo a la dieta, el ayuno y/o el ejercicio excesivo. Las pacientes englobadas en este subtipo no han presentado episodios recurrentes de atracones o purgas en los últimos tres meses. El subtipo ANP se caracteriza porque durante los últimos tres meses, el individuo ha tenido episodios recurrentes de atracones o purgas (es decir, vómito autoprovocado o utilización incorrecta de laxantes, diuréticos o enemas). En la bulimia nerviosa (BN) la característica distintiva es la presencia de atracones, que ocurren en promedio al menos una vez a la semana durante tres meses. Se trata de episodios recurrentes de ingesta, en un periodo de tiempo determinado, de una cantidad de alimentos que es claramente superior a la que la mayoría de las personas ingerirían en un período similar en circunstancias parecidas. La falta de control sobre lo que se ingiere durante estos episodios es un rasgo característico, como

lo es también el hecho de que van seguidos de conductas compensatorias como los vómitos, el ayuno, el uso de laxantes, diuréticos u otros fármacos adelgazantes o ejercicio físico excesivo. La BN se diferencia de la ANP fundamentalmente por el peso, que es bajo en ANP, mientras que la BN se presenta con normopeso o peso elevado (Tablas 1 y 2). En ambos síndromes, AN y BN, los efectos producidos sobre el peso corporal y el estado nutricional son diferentes. Por último, los OTAIE (otros trastornos alimentarios y de la ingesta especificados) constituyen una categoría que reúne aquellas presentaciones en las que predominan los síntomas característicos de un trastorno alimentario, causando malestar clínicamente significativo o deterioro del funcionamiento del individuo, pero que no cumplen todos los criterios de ninguno de los trastornos definidos en la categoría de TCA. Algunos ejemplos de presentaciones que se encuentran englobadas dentro de esta categoría “otro especificado” son los siguientes: bulimia nerviosa de baja frecuencia y/o duración limitada, trastorno por atracón, trastorno por purgas y síndrome de ingestión nocturna de alimentos. La anorexia nerviosa atípica es otro ejemplo de presentación que engloba aquellas pacientes que cumplen todos los criterios para ser incluidas en la categoría de anorexia nerviosa, excepto que el peso del individuo, a pesar de la pérdida significativa, está dentro o por encima del intervalo normal (1,2). Los pacientes englobados en este trabajo pertenecen a la categoría de AN o anorexia nerviosa atípica.

Tabla 1. Criterios diagnósticos de AN. DSM-5.

Criterios diagnósticos de Anorexia nerviosa– DSM 5	
A.	Restricción de la ingesta energética en relación con las necesidades, que conduce a un peso corporal significativamente bajo
B.	Intenso temor a engordar , incluso con bajo peso.
C.	Distorsión en la percepción del peso y de la imagen corporal; excesiva influencia de la figura en la autoevaluación; negación de la gravedad del estado de delgadez en que se encuentra
	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo restrictivo: durante los últimos tres meses no ha habido episodios recurrentes de atracones o purgas. La pérdida de peso se debe a la dieta, el ayuno y/o ejercicio físico intenso. • Tipo con atracones/purgas: durante los últimos tres meses ha habido episodios recurrentes de atracones y/o purgas.

Tabla 2. Criterios diagnósticos de BN. DSM-5.

Criterios diagnósticos de Bulimia nerviosa– DSM 5	
A.	Presencia de episodios de sobreingesta
B.	Presencia de medidas compensatorias orientadas a evitar la ganancia de peso secundaria de ello: vómito autoprovocado, uso incorrecto de laxantes, diuréticos o medicamentos, ayuno o ejercicio excesivo
C.	Ambos se producen, al menos una vez a la semana durante 3 meses.
D.	La autoevaluación se ve indebidamente influida por la constitución y el peso corporal.
E.	La alteración no se produce exclusivamente durante los episodios de anorexia nerviosa

Tabla 3. Criterios diagnósticos de OTAIE. DSM-5.

Criterios diagnósticos de Otros trastornos especificados – DSM 5
<p>1. Anorexia nerviosa atípica: Se cumplen todos los criterios para la anorexia nerviosa, excepto que el peso del individuo, a pesar de la pérdida de peso significativa, está dentro o por encima del intervalo normal.</p> <p>2. Bulimia nerviosa (de frecuencia baja y/o duración limitada): Se cumplen todos los criterios para la bulimia nerviosa, excepto que los atracones y los comportamientos compensatorios inapropiados se producen, de promedio, menos de una vez a la semana y/o durante menos de tres meses.</p> <p>3. Trastorno por atracón (de frecuencia baja y/o duración limitada): Se cumplen todos los criterios para el trastorno por atracones, excepto que los atracones y los comportamientos compensatorios inapropiados se producen, de promedio, menos de una vez a la semana y/o durante menos de tres meses.</p> <p>4. Trastorno por purgas: Comportamiento de purgas recurrentes para influir en el peso o la constitución (p. ej., vómito autoprovocado; uso incorrecto de laxantes, diuréticos u otros medicamentos) en ausencia de atracones.</p> <p>5. Síndrome de ingestión nocturna de alimentos: Episodios recurrentes de ingestión de alimentos por la noche, que se manifiesta por la ingestión de alimentos al despertarse del sueño o por un consumo excesivo de alimentos después de cenar. La ingestión nocturna de alimentos no se explica mejor por influencias externas, como cambios en el ciclo de sueño-vigilia del individuo o por normas sociales locales. La ingestión nocturna de alimentos causa malestar significativo y/o problemas del funcionamiento.</p>

Un aspecto fundamental a destacar es la opinión generalizada que se transmite a la asistencia sanitaria, los médicos y cuidadores, de que los trastornos indicados en la Tabla 3, atípicos e incompletos, son de menor entidad, menos severos o de mejor pronóstico lo cual no resulta ser así. Se trata de cuadros que pueden ser en realidad diferentes estadios de un trastorno grave y no tan infrecuente como se supone a priori, ya que estadísticamente son más del 50% de todos los casos de TCA (3).

1.2 Contexto. Etiopatogenia y clínica

1.2.1 Etiopatogenia

Existen diferentes modelos que han tratado de explicar la etiología, el desarrollo y el mantenimiento de los TCA. El modelo etiopatogénico más aceptado es el modelo pluridimensional que abarca las esferas bio-psico-socio-culturales. Este modelo considera que los TCA son consecuencia de la interacción de factores individuales (biológicos y psicológicos) junto con otros de tipo familiar y

sociocultural, es por ello que los TCA se manejan como un complejo fenómeno bio-psico-socio-cultural (4) (Figura 1).

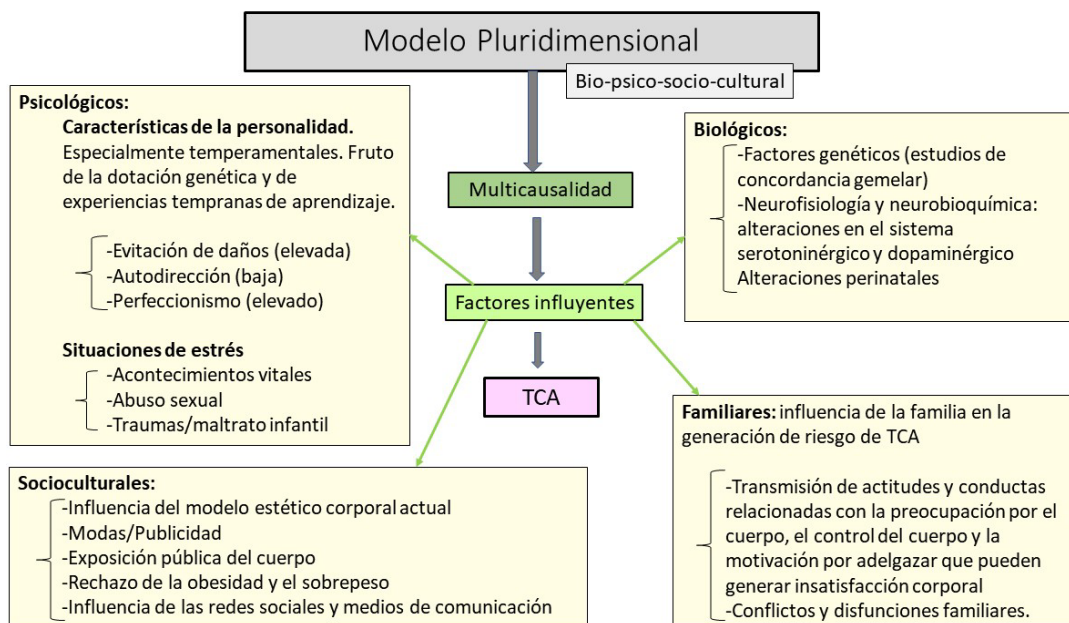


Figura 1. Modelos conceptuales. Etiopatogénesis de los TCA. Adaptado de Faya 2012 (5) y Toro 2014 (6).

1.2.2 Clínica

Como cualquier síndrome psiquiátrico, los TCA son enfermedades multicausales. La cuestión determinante es que éstos poseen una característica definitiva que es la presencia de alteraciones nutricionales. Las consecuencias de estas alteraciones nutricionales otorgan complejidad a la etiopatogénesis de los TCA y explican de un modo esencial su evolución, mantenimiento y gravedad clínica (6).

Las manifestaciones clínicas de los trastornos de la alimentación derivan de dos grupos de alteraciones: 1) la alteración conductual y psicopatológica asociada a los problemas psicológicos e interpersonales subyacentes al trastorno y 2) la

alteración física como epifenómeno, resultado de la malnutrición y de las conductas patológicas. La clínica es compleja y puede llegar a ser muy grave. Los pacientes pueden resultar muy perjudicados tanto física como psicopatológicamente y la mayoría de los sistemas corporales pueden verse afectados (7). Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de los síntomas no son percibidos de forma consciente por el paciente con la gravedad o importancia que tienen en la realidad (8).

La adolescencia constituye un periodo crítico en el desarrollo. Se trata de una etapa de transición entre la infancia y la edad adulta considerada como un momento complicado del desarrollo. Se producen importantes cambios físicos, hormonales, psicológicos y sociales. La presión social que generan en el mundo occidental los estereotipos idealizados en torno al cuerpo, el aspecto y la imagen, constituye una influencia fundamental durante este periodo. Además, en esta etapa se presentan importantes cambios biológicos, incluidos los hormonales, que también juegan un papel determinante en el aumento del riesgo de aparición de estos trastornos (8). El aporte energético insuficiente y un estado nutricional inadecuado intervienen negativamente en el crecimiento y el desarrollo de esta población, que precisa para el correcto funcionamiento del organismo una situación óptima que favorezca el crecimiento y el desarrollo del normal metabolismo celular (9).

Los síntomas y signos clínicos clásicos en la adolescencia los podemos clasificar como: cognitivos, conductuales, emocionales y biológicos (8) (Tabla 4).

Tabla 4. Manifestaciones clínicas en AN.

Manifestaciones clínicas en AN	
Síntomas	
Cognitivos	Intenso deseo o tendencia extrema a perder peso. Pensamiento obsesivo acerca del peso, la comida y la imagen corporal. Insatisfacción corporal Cambios en la sensibilidad interoceptiva Distorsiones cognitivas Rigidez cognitiva
Conductuales	Alteraciones en la conducta alimentaria: restricción y cambios en el estilo alimentario. En anorexia purgo-bulímica tras un periodo restricción aparecen los atracones. En ocasiones, aparecen conductas de riesgo relacionadas con la alta impulsividad, pérdida de control, autolesiones y consumo de sustancias entre otros
Emocionales	Ansiedad fóbica asociada al cuerpo, al peso, a la comida y a la búsqueda del control como síntomas primarios del trastorno. Con el avance de la enfermedad el estado emocional puede ser alterado por la desnutrición produciendo irritabilidad, inestabilidad emocional, tristeza o apatía
Biológicos	Pueden afectar a todos los órganos y sistemas del organismo. Se derivan fundamentalmente del estado de malnutrición y de las conductas patológicas

Las alteraciones biológicas derivan del estado de malnutrición que produce signos y síntomas físicos de diferente gravedad que llegan a poner en riesgo la vida del paciente (Figura 2). El síntoma biológico más importante es la pérdida de peso. Algunas de las primeras molestias físicas percibidas por el paciente son frío, sensación de mareo, estreñimiento, sequedad de piel, pérdida de cabello, fatiga y cansancio. Resulta esencial considerar que la pérdida de peso es un cambio egosintónico con el cual el paciente se siente más o menos cómodo. Si esta pérdida de peso se produce de modo importante y acelerado puede producir una importante inestabilidad médica con presencia de bradicardia, hipotensión e hipotermia que requieren de atención médica urgente (8).

Síntomas físicos en la anorexia nerviosa		
ANR		ANP
General: pérdida de peso, deshidratación, hipotermia, retraso del crecimiento, cambios de humor, irritabilidad, afecto aplanado, ansiedad, depresión		General: pérdida de peso, deshidratación, hipotermia, cambios de humor, irritabilidad, impulsividad
Cabeza y cuello: sequedad de mucosas		Cabeza y cuello: sequedad de mucosas, erosión del esmalte dentario, caries dentales
Cardiovascular: arritmia, prolapso mitral, insuficiencia cardíaca congestiva, hipotensión, acrocianosis, frialdad de las extremidades, edema		Cardiovascular: arritmia, hipotensión
Abdomen: estreñimiento, dolor abdominal, distensión abdominal con las comidas		Abdomen: dolor epigástrico
Dermatológico: palidez cutánea, hiper胡萝卜素emia, lanugo, caída del cabello, sequedad cutánea, uñas quebradizas, signos de autolesión		Dermatológico: palidez cutánea, caída del cabello, sequedad cutánea, uñas quebradizas, signos de autolesión
Neuromuscular: atrofia muscular, disminución de los reflejos, neuropatía periférica, disminución de la concentración, dolor abdominal		Neuromuscular: atrofia muscular, disminución de los reflejos, neuropatía periférica, disminución de la concentración, dolor abdominal
Óseo: osteopenia/osteoporosis		Óseo: osteopenia/osteoporosis
Endocrinológicos/reproductor: amenorrea, pubertad atrasada, pseudohipotiroidismo		Endocrinológicos/reproductor: amenorrea, irregularidades menstruales

Figura 2. Síntomas físicos en la anorexia nerviosa. Adaptado (8,10).

1.3 Respuesta fisiológica a la malnutrición en TCA

1.3.1 Estado nutricional

La desnutrición que afecta a estos pacientes está dominada por un déficit calórico y un aumento relativo de la ingesta de proteínas con respecto a las grasas o los hidratos de carbono, lo que conduce a una desnutrición predominantemente calórica que en su forma más típica sería marasmo (11). En este tipo de malnutrición, se lleva a cabo la utilización metabólica de los lípidos, y en último lugar de las proteínas, que son movilizados como fuente de energía. Se produce una pérdida de peso importante y una disminución de las medidas antropométricas, mientras que el compartimento proteico visceral se mantiene hasta que la enfermedad está muy evolucionada. En estos pacientes es frecuente observar niveles normales de proteínas circulantes, salvo en estados muy graves (12).

1.3.2 Péptidos gástricos

Las alteraciones en los péptidos gastrointestinales pueden contribuir al desarrollo y mantenimiento del TCA y estar implicados en su sintomatología. En respuesta a señales periféricas procedentes del tejido adiposo y del tubo digestivo, el cerebro regula la homeostasis de la energía y el apetito a través de las vías de señalización en el hipotálamo y el tronco del encéfalo (13,14).

El péptido YY (PYY) es una hormona anorexígena liberada por el intestino en respuesta a la ingestión de alimentos. Modula el apetito uniéndose a su receptor para indicar saciedad (13). Esta hormona está altamente implicada en la regulación del metabolismo energético y la homeostasis (15).

Paradójicamente, se han reportado niveles plasmáticos de PYY en AN tanto aumentados (16,17) como disminuidos (18,19) en relación a los controles. Los niveles bajos de PYY son interpretados en AN como un mecanismo de adaptación compensatorio a un balance energético negativo (20).

1.3.3 Sistema inmunológico

1.3.3.1 Generalidades del sistema inmunitario

El sistema inmunitario es una compleja red de defensa que actúa para proteger al organismo frente a agentes extraños (bacterias, virus, hongos, parásitos, levaduras, pólenes, proteínas alimentarias, toxinas, células cancerígenas, etc.) también denominados antígenos (21,22). Este sistema sirve además, para distinguir lo "propio" de lo "ajeno", asegurando la tolerancia de lo "propio", de los alimentos, de determinados componentes medioambientales, además de bacterias comensales que están presentes en el organismo. Esta segunda función resulta esencial para el mantenimiento de la homeostasis del organismo, ya que cualquier error en estas vías de tolerancia puede dar lugar a trastornos inmunológicos (23). Por último, el sistema inmunológico juega un papel determinante en la identificación y eliminación de células tumorales y traumas (24,25).

La primera línea de defensa frente a las agresiones la constituyen las barreras físicas y químicas, entre las cuales destacan la piel y las mucosas (nasal, intestinal y vaginal) y sus secreciones (pH ácido del estómago, lisozima, y otros componentes antibacterianos), así como la propia microbiota autóctona protectora (21).

Una vez los patógenos atraviesan esta primera barrera, el sistema inmunológico responde poniendo en marcha una serie de mecanismos activos de defensa que

actúan de forma coordinada para reconocer y eliminar la amenaza, conformando la “respuesta inmune”. En esta respuesta se establece una primera etapa de reconocimiento del antígeno seguida de una activación, para finalizar con una etapa efectora de destrucción (22).

A su vez, la respuesta se puede dividir en dos categorías: la respuesta inmune innata o inespecífica y la respuesta inmune específica o adquirida, también llamada adaptativa. La diferencia fundamental entre ambas es que mientras que la inmunidad innata es inespecífica y no tiene memoria, la respuesta inmunitaria adaptativa presenta alta especificidad y memoria con respecto a un determinado patógeno. En ambos casos se ponen en funcionamiento células inmunocompetentes (leucocitos), moléculas circulantes (complemento, anticuerpos y proteínas de fase aguda) y mediadores solubles (citoquinas) (22,24) (Tabla 5).

Las células que participan en la respuesta inmunitaria se originan en la médula ósea y se localizan mayoritariamente en los órganos linfoides (timo, bazo, nódulos linfoides y placas de Peyer), y también aparecen dispersas por el organismo, a través del torrente sanguíneo y la circulación linfática dirigiéndose a las zonas en las que son necesarias.

Tabla 5. Componentes del sistema inmunitario.

Componentes de la inmunidad		
Barreras fisicoquímicas	Piel Membranas de las mucosas Lisozima Ácidos del estómago Bacterias comensales	
Mecanismos activos	Inmunidad innata	Inmunidad adquirida
Moléculas circulantes	Factores de Complemento Proteínas de fase aguda	Anticuerpos
Células inmunocompetentes	Fagocitosis: neutrófilos, Monocitos/macrófagos Mediadores de la inflamación: basófilos y eosinófilos, mastocitos Células citotóxicas: <i>natural killers</i> (NK)	Linfocitos B Linfocitos T: Th, <i>helper</i> o colaboradores y Tc, citotóxicos
Mediadores solubles	Citoquinas secretadas por macrófagos	Citoquinas secretadas por linfocitos

I. Respuesta de inmunidad innata

Esta respuesta se encarga de prevenir la entrada de agentes infecciosos en el cuerpo y, en el caso de que entren, trata de eliminarlos rápidamente a través de mecanismos de fagocitosis y citotoxicidad (23).

Las células fagocíticas expresan en su superficie receptores específicos para bacterias y sus componentes (ej. lipopolisacáridos). La unión del ligando al receptor activa la fagocitosis y la consecuente destrucción del microorganismo patógeno por el complemento o por químicos tóxicos, como el radical superóxido. Las células NK se unen directamente a las células tumorales y a las

células infectadas por virus y las programan para su destrucción por apoptosis (22).

La respuesta innata es una defensa inespecífica que funciona a través de mecanismos estándar, sin necesidad de una exposición previa al patógeno, por lo tanto actúa de manera rápida. Sin embargo, una respuesta inmune frecuentemente requiere de las acciones coordinadas de ambos tipos de respuesta, de la inmune innata y de la más potente y flexible, respuesta inmune adquirida (21).

II. Respuesta de inmunidad adquirida

Se trata de una respuesta más compleja que incluye a los linfocitos. Estos actúan de un modo altamente especializado mediante un reconocimiento específico del antígeno o sustancia extraña (microorganismo, toxina, célula maligna, etc.) que ha invadido el organismo, mediante la generación de clones de células que responden de modo muy específico ante el patógeno en cuestión. Esta respuesta se hace efectiva después de varios días de la activación inicial y además, persiste durante un tiempo después de la desaparición del antígeno inicial. Esta persistencia da lugar a la memoria inmunológica, que es la base para una respuesta inmune más fuerte y efectiva frente a la reexposición al antígeno (21,22,25)

Los linfocitos se clasifican en linfocitos T, linfocitos B y células *natural killer* (NK), aunque estas últimas se suelen incluir en la categoría de inmunidad innata, tal como se describe en el apartado anterior (tabla 5). Los linfocitos B son células productoras de anticuerpos que median la inmunidad humoral mientras que los linfocitos T participan en la inmunidad mediada por células o inmunidad celular.

a) Inmunidad mediada por células

La inmunidad mediada por células se lleva a cabo gracias a la actuación de los linfocitos T, que expresan los receptores específicos de antígeno en su superficie (TCR). Los linfocitos T se dividen en “colaboradores” o *helper* (Th), que se distinguen por la presencia de la molécula CD4 en su superficie y en “citotóxicos/supresores” (Tc) caracterizados por la molécula CD8 en su superficie. Las moléculas CD4 y CD8 forman parte de la serie de *clusters* de diferenciación (CDs) utilizados para la identificación de estirpes celulares o estados de diferenciación celular mediante el reconocimiento por anticuerpos monoclonales.

La característica distintiva entre la inmunidad humoral y celular es que mientras que los linfocitos B reconocen antígenos “suelos”, los linfocitos T necesitan que otras células, las células presentadoras de antígenos (CPA) o células infectadas, les “presenten” los antígenos a través de un receptor específico en su superficie. De este modo, cuando se produce la infección de una célula por un patógeno intracelular se señala a los linfocitos T mediante la expresión en la superficie de la célula de un fragmento del péptido derivado del patógeno. Estos fragmentos son transportados a la superficie de la célula infectada y se expresan allí por unas proteínas llamadas complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La combinación del fragmento del péptido derivado del patógeno unido a MHC es lo que es reconocido por el linfocito T. De este modo, la presencia de patógenos intracelulares estimulan a las células T citotóxicas para destruir a la célula infectada. En el caso de los linfocitos T citotóxicos, el complejo que presenta el antígeno en la célula infectada es el MHC tipo I que se une al receptor TCR del linfocito citotóxico.

Los patógenos extracelulares estimulan la acción de los linfocitos Th CD4+. En este caso la presentación del antígeno al linfocito la realizan las CPA (células

dendríticas, macrófagos, linfocitos B, células endoteliales, células epiteliales del timo), a través del complejo MHC II. Los linfocitos CD4+ activados por el antígeno secretan citoquinas que producen diferentes efectos entre los cuales hay que destacar el reclutamiento de neutrófilos y monocitos de la sangre al lugar donde esté el antígeno para su destrucción, y la activación de los monocitos de la sangre (21,22,26).

b) Inmunidad humoral

La respuesta humoral se realiza a través de los anticuerpos y se encarga de eliminar los patógenos extracelulares. Los linfocitos B se caracterizan por su habilidad para producir anticuerpos (inmunoglobulinas), que son específicas para un antígeno individual (25). Los anticuerpos actúan de diferentes modos para combatir a los patógenos. Por un lado, neutralizan microorganismos uniéndose a ellos y así previenen su unión a las células del huésped y a su vez activan a las proteínas del complemento en el plasma y como consecuencia, promueven la destrucción de las bacterias por células fagocíticas. Los linfocitos Th regulan tanto la respuesta humoral activando a los linfocitos B como la respuesta celular activando a las células Tc.

III. Comunicación entre sistemas

La clave del éxito de un sistema tan disperso es la capacidad de sus componentes para comunicarse de forma eficaz y rápida. Esta comunicación se lleva a cabo mediante contacto célula-célula a través de las proteínas de superficie celular y a través de la secreción de mensajeros químicos, fundamentalmente citoquinas, con acción endocrina, pero, fundamentalmente paracrina y autocrina.

Entre ellas encontramos las denominadas interleuquinas (IL-1, IL-2, ...IL-37), interferones (IFN- α , IFN- β , IFN- γ), factor de crecimiento transformante (TGF), quimioquinas y factores de necrosis tumoral (TNF), como el TNF- α . Las citoquinas participan en todas las etapas de la respuesta inmune induciendo cambios en el crecimiento, desarrollo y actividad de las células diana tras su unión a receptores celulares. Cada citoquina puede tener múltiples actividades según los diferentes tipos de células que las que se unen o que las reconocen (22).

El TNF- α , y las IL-1 e IL-6 son las citoquinas proinflamatorias más estudiadas producidas por monocitos y macrófagos y constituyen importantes biomarcadores de inflamación (27) (Figura 3).

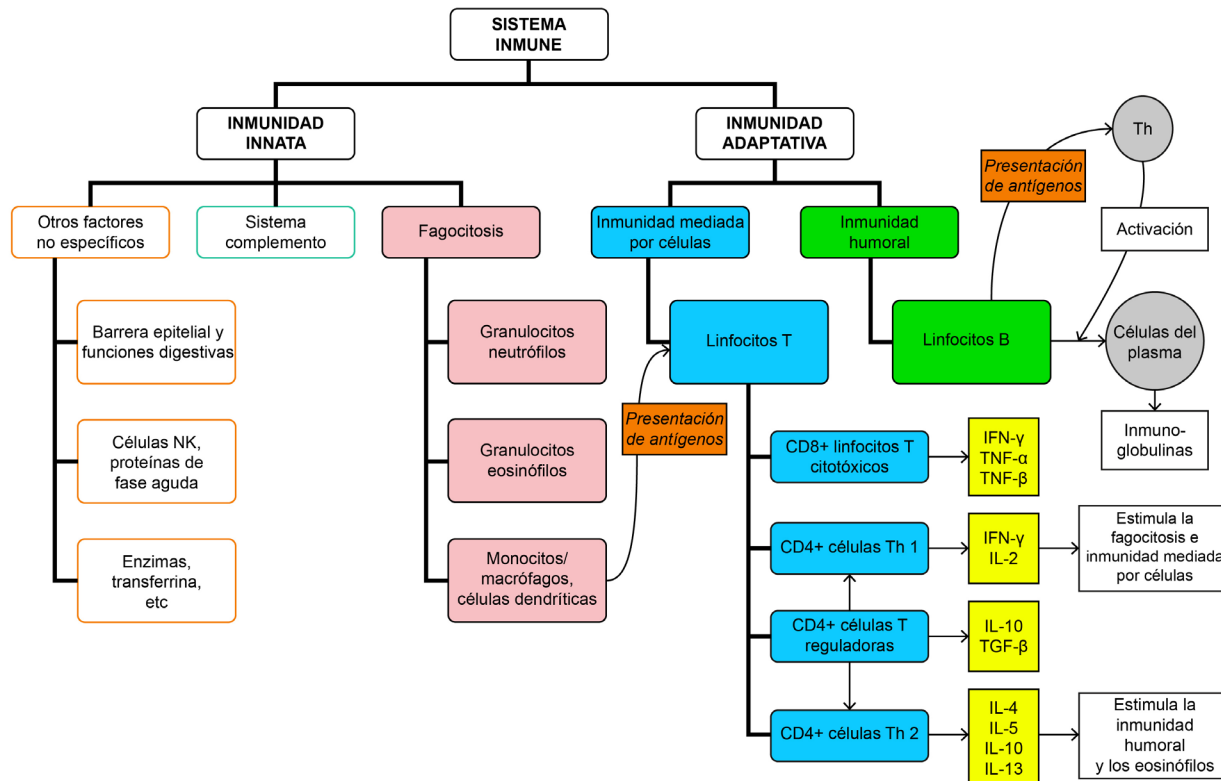


Figura 3. Representación esquemática del sistema inmunológico humano. CD = Cluster de diferenciación; IFN- γ = interferón- γ ; IL = interleucina; Célula NK = célula asesina natural (natural killer); Th = linfocito T colaborador; TGF = factor de crecimiento transformante; TNF = factor de necrosis tumoral. Adaptado de (28)

IV. Inflamación

Es un proceso biológico complejo que protege al cuerpo del daño potencial causado por infecciones, lesiones, traumas u otras formas de daño tisular.

Cuando las barreras físicas que separan lo propio de lo no propio son vulneradas, se pone en marcha una respuesta inflamatoria, que se encuadraría dentro de lo que hemos denominado inmunidad innata. La respuesta inflamatoria está basada en interacciones entre células de tejidos, células endoteliales y células del sistema inmune.

En el caso de la agresión mecánica el daño tisular se traduce en la liberación de componentes tisulares y de la matriz desestructurada llamados patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Cuando la agresión es por colonización de un patógeno se liberan los denominados patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) (29).

Las células endoteliales de las vénulas postcapilares y los macrófagos responden a estas señales del tejido cambiando de forma y expresando moléculas de adhesión en su superficie que interaccionan con moléculas complementarias en los leucocitos circulantes, reteniéndolos y atrayéndolos desde la circulación al lugar donde se ha producido la infección o daño. Mediante la emisión de pseudópodos, los leucocitos se dirigen al interior de los tejidos por “diapédesis” (30).

Los neutrófilos son las primeras células en migrar a la zona afectada donde se activan para llevar a cabo la fagocitosis. Las proteínas del complemento se activan por contacto con bacterias y así se ensamblan para formar complejos de

ataque a membrana que se insertan en la pared exterior de los microorganismos y producen la lisis celular, que a su vez atrae más leucocitos y promueve la fagocitosis (21).

Papel de las citoquinas en la inflamación.

Las citoquinas proinflamatorias desempeñan un papel determinante en los procesos inflamatorios. Estas citoquinas activan neutrófilos, monocitos y macrófagos para iniciar la destrucción de células bacterianas y tumorales, aumentan la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de neutrófilos y células endoteliales, estimulan la proliferación de linfocitos T y B e inician la producción de otras citoquinas proinflamatorias. Por tanto, TNF- α , IL-1 e IL-6 son mediadores de la inmunidad tanto natural como adquirida y son un vínculo importante entre ellos. La producción de cantidades apropiadas de estas citoquinas es importante en respuesta a la infección, sin embargo, la producción inapropiada o la sobreproducción puede ser peligrosa. Estas citoquinas, particularmente TNF- α , están implicadas en causar algunas de las respuestas patológicas que ocurren en estados inflamatorios agudos y crónicos.

1.3.3.2 Marcadores inmunológicos y su utilidad en la práctica clínica:

I. Marcadores solubles: citoquinas

La detección y cuantificación de citocinas está jugando un papel cada vez más importante en la práctica clínica. Se trata de un campo de estudio muy activo que está proporcionando conocimientos clave para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (31).

Diferentes trabajos han demostrado la participación de citoquinas en el desarrollo de una gran variedad de enfermedades. El TNF- α , por ejemplo, se

asocia con enfermedades como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal, la sarcoidosis y la psoriasis (32,33).

En ciertos tipos de cánceres se ha establecido un fuerte vínculo entre la inflamación crónica y la progresión tumoral y se ha propuesto que la medición de determinadas citoquinas relevantes podría resultar útil para mejorar el diagnóstico en ciertos tipos de cánceres (33–35). En relación con el sistema cardiovascular, la patogenia y la progresión de la insuficiencia cardíaca también se ha asociado con la acción de citocinas proinflamatorias sobre tejidos cardíacos y extracardíacos. Además, se ha demostrado que las pruebas de IL-18 podrían aportar valor pronóstico a los marcadores inflamatorios en pacientes con enfermedad aterosclerótica (36,37).

Otras categorías de afecciones en las que las citoquinas demuestran tener un papel activo son las afecciones obstétricas y ginecológicas, y los trastornos autoinmunitarios (34,38). Por último, resulta interesante destacar la utilidad del uso de citoquinas para evaluar el pronóstico de afecciones hereditarias y a menudo crónicas, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer; así como su uso terapéutico para revertir eventos agudos que surgen de la quimioterapia o radioterapia de ciertos tipos de cáncer o en el tratamiento de ciertos trastornos por inmunodeficiencia (38).

II. Marcadores celulares

La caracterización y cuantificación del número y contribución porcentual de leucocitos, así como de sus subpoblaciones (p. ej., neutrófilos, monocitos, linfocitos, linfocitos T, linfocitos B, células NK) es un campo en expansión en la

práctica clínica dada su utilidad a la hora de monitorizar el estado inmunológico tanto en inmunodeficiencias primarias (IDP) como secundarias, así como para la detección de alteraciones en la inmunidad celular o humoral (39).

Los linfocitos y otros leucocitos, así como sus precursores hematopoyéticos, presentan, como se ha comentado anteriormente, patrones característicos de moléculas de superficie (CD) que son aprovechados como marcadores para distinguir y caracterizar distintas poblaciones celulares. El uso de anticuerpos monoclonales (AcMo) que reconocen una determinada molécula de membrana leucocitaria o hematopoyética, conjugados con distintos fluorocromos, permite llevar a cabo la caracterización de estas células (24,40).

En la práctica pediátrica, el recuento sanguíneo completo es la mejor prueba de laboratorio inicial al sospechar una IDP, centrándose en el recuento absoluto de linfocitos. Un recuento <3.000 células/ mm^3 sugiere un defecto de inmunidad celular y constituye una fuerte indicación para la realización de un estudio de subpoblaciones linfocitarias (39).

Algunos ejemplos de enfermedades en las que el estudio de las subpoblaciones linfocitarias tiene aplicación para su diagnóstico y detección son: enfermedades pulmonares (41), asma (42), artritis reumatoide (43) y cáncer (44).

III. Marcadores inmunitarios en la evaluación del estado nutricional

Una adecuada nutrición es fundamental para el correcto desarrollo y mantenimiento del sistema inmunitario. En ese sentido es lógico pensar que cualquier desequilibrio nutricional podrá afectar a la competencia del sistema inmunitario (45). Los datos epidemiológicos existentes relacionan la presencia de déficits nutricionales con desequilibrios inmunológicos (46). Dada la relación que existe entre nutrición e inmunidad, los estudios de inmunocompetencia

proporcionan indicadores indirectos sensibles del estado nutricional; de ahí que, diferentes pruebas inmunológicas se transforman en herramientas para el diagnóstico del estado nutricional y de seguimiento tras las intervenciones nutricionales (47).

1.3.3.3 Sistema inmunitario en TCA

Los trastornos de la conducta alimentaria son un caso atípico de malnutrición. Las deficiencias nutricionales que se producen en estos trastornos conllevan el compromiso de la actividad normal del sistema inmunitario (48). El impacto de esta desnutrición en el sistema inmunológico ha recibido poca atención y la literatura científica que se ha publicado no siempre muestra hallazgos consistentes (49). Sí parece haber en general un consenso en la aceptación de que el estado de inmunodepresión de los pacientes es menos grave que en la desnutrición proteico-energética clásica (50). La inmunidad celular y humoral parecen verse afectadas de forma diferente (51).

Los estudios realizados de variables hematológicas e inmunológicas en este tipo de pacientes con TCA revelan características propias de un sistema inmunológico alterado. Estas características incluyen: presencia de leucopenia con linfocitosis relativa (52,53), baja respuesta a pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada (54,55) y una producción alterada de citoquinas en respuesta a un estímulo en comparación con la de un grupo de control (56).

La presencia de trastornos hematológicos en pacientes con anorexia nerviosa es un hallazgo muy frecuente. Existen numerosas anomalías en la composición y función de la médula ósea durante la AN (57). En pacientes con AN es frecuente encontrar leucopenia, como mencionamos anteriormente, y una menor actividad de los granulocitos (58). Las deficiencias dietéticas pueden disminuir el

número y la actividad fagocítica de los granulocitos polimorfonucleares. En este sentido, estudios de laboratorio realizados en pacientes con AN mostraron una disminución de la capacidad de adhesión, disminución de la capacidad bactericida y disminución de la actividad celular en neutrófilos (59,60)

I. Subpoblaciones linfocitarias

La linfocitosis relativa se refiere a un aumento del porcentaje de linfocitos periféricos entre los glóbulos blancos, mientras que el número absoluto de linfocitos es normal (61). Se ha publicado un número bastante escaso de estudios con respecto a las subpoblaciones linfocitarias en pacientes con TCA (52,62–67) y los hallazgos no son del todo consistentes. El descenso de las células T (CD2+) parece afectar a todos los subtipos: linfocitos T CD3+ (linfocitos maduros), los CD4+ (linfocitos T colaboradores), y los CD8+ (linfocitos T citotóxicos). Las CD57+ (células *Natural Killer* o NK) también se encuentran disminuidas. Sin embargo, la subpoblación de linfocitos CD19+ (linfocitos B) no parece verse alterada. Este hecho conduce a pensar que en las pacientes con TCA, las alteraciones de la inmunidad afectan, como se mencionó anteriormente, en primer lugar a la inmunidad celular (en la cual participan principalmente los linfocitos T) y sin embargo la inmunidad humoral (mediada por los linfocitos B), a priori, estaría mejor conservada (48,68).

Varios autores coinciden al describir una reducción tanto en el porcentaje como en el número absoluto de linfocitos T CD8+ en pacientes con AN; descenso atribuido a la disminución en la población de células T CD8+CD45RO+ RA⁻ (memoria) (65,66,69).

Esto contrasta con resultados de otros autores que contrariamente encuentran un aumento del número de células CD8+ junto con una reducción en las células

T colaboradoras vírgenes (CD4+CD45RA+) (52,62). Con respecto a las células T colaboradoras (CD4+), se ha descrito una tendencia al aumento en el porcentaje, quizás en un intento de preservar el número absoluto de células CD4+ (66,69). Lo que no queda claro, sin embargo, es cómo podría funcionar tal mecanismo compensatorio en relación con el grado de desnutrición.

El cociente CD4+/CD8+, considerado como un buen marcador nutricional que se presenta disminuido en la malnutrición proteico energética, generalmente no se ve afectado en la AN, aunque ocasionalmente se han descrito valores tanto disminuidos (70)(54) como aumentados (69) respecto a un grupo control.

Se ha propuesto que la disparidad de los resultados pueda deberse a que algunos de estos estudios presentan importantes deficiencias derivadas de la heterogeneidad de los pacientes que participan en los mismos. Se trata en concreto de cuestiones como el estado nutricional de las pacientes, la edad (65,66), la alteración de la dieta practicada por las pacientes previa a su estudio (71), la duración de la enfermedad (66), el subtipo de AN o la categoría de TCA (62,63,65,66). En este sentido, los episodios de vómitos se pueden considerar como una de las características más inductoras de estrés y que provocan que también en pacientes con BN se afecte de manera importante el sistema inmunológico (72).

En general, la evidencia sugiere que, al igual que en otros estados de inanición, la inmunocompetencia y en particular el estudio de las subpoblaciones linfocitarias son una herramienta útil para el seguimiento del estado nutricional de pacientes con TCA (49).

II. Citoquinas en TCA

Como se ha comentado anteriormente, estos mensajeros solubles actúan en la comunicación del sistema inmune y a la vez participan de forma activa en la regulación de múltiples vías metabólicas y neuroendocrinas (73).

Estas proteínas parecen estar alteradas en individuos con AN (74). Algunos estudios realizados en pacientes con AN han reportado niveles plasmáticos elevados de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 β (IL-1 β), interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) en comparación con controles (75,76); lo cual ha sido descrito también en un metaanálisis (77). Sin embargo, no existe una coherencia total entre los estudios, algunos de los cuales no han encontrado ninguna alteración en las citoquinas al comparar con mujeres sanas (78,79).

Es importante añadir que en el caso de las citoquinas sucede lo mismo que con las subpoblaciones linfocitarias y encontramos, al comparar estudios, la existencia de una alta variabilidad en la edad de los pacientes y la duración de la enfermedad, lo cual dificulta la comparación entre los diferentes estudios (49).

Algunos autores sugieren que las citoquinas podrían tener un papel muy importante en el desarrollo y evolución de los trastornos alimentarios y además ser reguladores fundamentales del metabolismo corporal en AN y BN (80,81). Para empezar, la evidencia sugiere que la activación del circuito de retroalimentación bidireccional entre los productos finales, citoquinas y cortisol, que es fundamental para el funcionamiento apropiado del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunológico (82), parece estar alterada en los pacientes con AN (83). Durante la respuesta normal a una infección, las células inmunitarias como los macrófagos y los linfocitos T y B, producen y liberan citoquinas proinflamatorias

que producen la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) dando como resultado la liberación de glucocorticoides suprarrenales. A su vez, los glucocorticoides retroalimentan negativamente a las células inmunes para suprimir la síntesis y liberación de citoquinas, protegiendo así de las consecuencias perjudiciales de una respuesta inmunitaria hiperactiva (Figura 4) (84).

En el caso de las pacientes con AN, Limone et al. encontraron una correlación positiva entre el cortisol plasmático y la secreción in vitro de IL-1 β que sugería que la retroalimentación negativa se encontraba alterada (83).

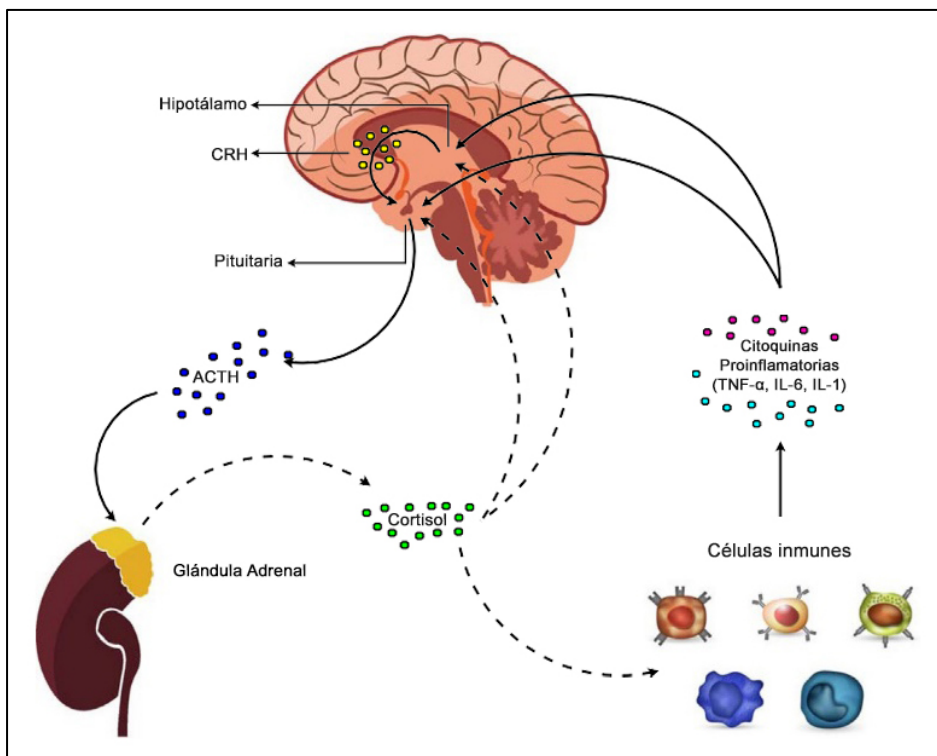


Figura 4. Diagrama esquemático de la interacción de las células inmunes con el eje HPA a través de citoquinas inflamatorias durante una respuesta normal. Las flechas continuas indican estimulación y las flechas discontinuas indican inhibición. ACTH: Adrenocorticotropina / hormona adenocorticotropa; CRH: Corticotropina. Adaptado de (85).

Por otro lado, también se ha sugerido que el nivel basalmente alto de producción de citoquinas proinflamatorias pudiera estar relacionado con una respuesta deficiente a un estímulo adicional, lo que podría explicar la alteración de la capacidad para montar la respuesta de fase aguda típica frente a una infección (86). Además, el incremento de citoquinas proinflamatorias puede activar el eje HPA y causar un aumento del cortisol, que, a su vez, puede ejercer una función inmunosupresora, que podría afectar a la producción de otras citoquinas como interleuquina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN γ) (48). Finalmente resulta importante introducir una cuestión planteada por Corcos et al., que destacan el papel de las citoquinas de los compartimentos central o periférico en la alteración de la neurotransmisión en el cerebro (87). En este sentido, el aumento de la IL-1 β en el sistema nervioso central de estas pacientes se asocia con un incremento de la producción de catecolaminas (88) y una inhibición de la producción de neuropéptido-Y en el hipotálamo, pudiendo ambos causar la disminución del apetito (89). Además las citoquinas proinflamatorias también interactúan con péptidos derivados del gen de la proopiomelanocortina (POMC), como las endorfinas, que están a su vez involucradas en comportamiento alimentario (49,90–93).

III. Otras proteínas del sistema inmunológico

El sistema del complemento juega un papel clave en la respuesta antibacteriana aguda, como un componente principal de la inmunidad innata, principalmente como responsable de la calidad de la respuesta antigénica. Estas proteínas, entre las que se incluyen los factores del complemento C3 y C4 (C3,C4), también se encuentran disminuidas en la anorexia y la bulimia nerviosa (94,95). En relación con la AN, los niveles alterados de estos factores del complemento parecen relacionarse con el agravamiento de los hábitos restrictivos y el riesgo

de recaídas, por lo que se les considera marcadores útiles del estado nutricional (96). El hecho es, que muchos de las moléculas reguladoras se ven involucradas en procesos adaptativos durante la AN y las alteraciones en el sistema inmunológico suelen ser frecuentemente consecuencia de la malnutrición, por lo que la recuperación clínica y la realimentación de las pacientes suelen ir asociadas con la normalización y recuperación, si no total, parcial, de las alteraciones descritas (62,97).

Resulta esencial al analizar los parámetros inmunológicos tener en cuenta la existencia de complejas interacciones entre el sistema inmunitario y el sistema neuroendocrino. La malnutrición parece tener un impacto en la comunicación que normalmente establecen estos sistemas (48). En este sentido, investigaciones recientes sugieren que otros factores diferentes del peso y relacionados con alteraciones en hormonas y neuropéptidos involucrados en el control del apetito y la saciedad pueden jugar un papel importante en la explicación de algunas de las anomalías del sistema inmunológico (98). El alcance de los cambios inmunológicos y metabólicos que se producen depende de la duración del trastorno, la severidad en la reducción de la ingesta y de la cantidad de peso perdido (94,97,99). Las alteraciones de los neurotransmisores típicas de la AN, además, pueden perpetuar las conductas alimentarias alteradas y pueden ser responsables de comorbilidades psiquiátricas, incluyendo el estrés, la ansiedad y la depresión que, a su vez, como trastornos independientes de los alimentarios, también suelen presentarse con alteraciones inmunitarias. (48,100)

1.3.4 Respuesta endocrina y metabólica

En el transcurso del síndrome de la AN la pérdida de peso se traduce en graves complicaciones físicas y psicológicas. En respuesta a estas alteraciones, los

pacientes experimentan complejas adaptaciones fisiológicas y cambios en múltiples ejes neuroendocrinos con el objetivo de permitir la supervivencia (101). La selección natural ha conducido a la evolución de sistemas hormonales y metabólicos para que sea garantizado el equilibrio a corto y largo plazo entre el gasto energético y la ingesta de alimentos durante los episodios de inanición (102). Prácticamente todos los sistemas hormonales pueden verse afectados y, en la mayoría de los casos, tienden a normalizarse con la recuperación del peso y no precisan tratamiento específico (103) (Figura 5).

El hipotálamo tiene un papel clave en el control del metabolismo energético. Numerosas sustancias sintetizadas en diferentes órganos envían señales a centros hipotalámicos para regular el apetito y el gasto energético (104).

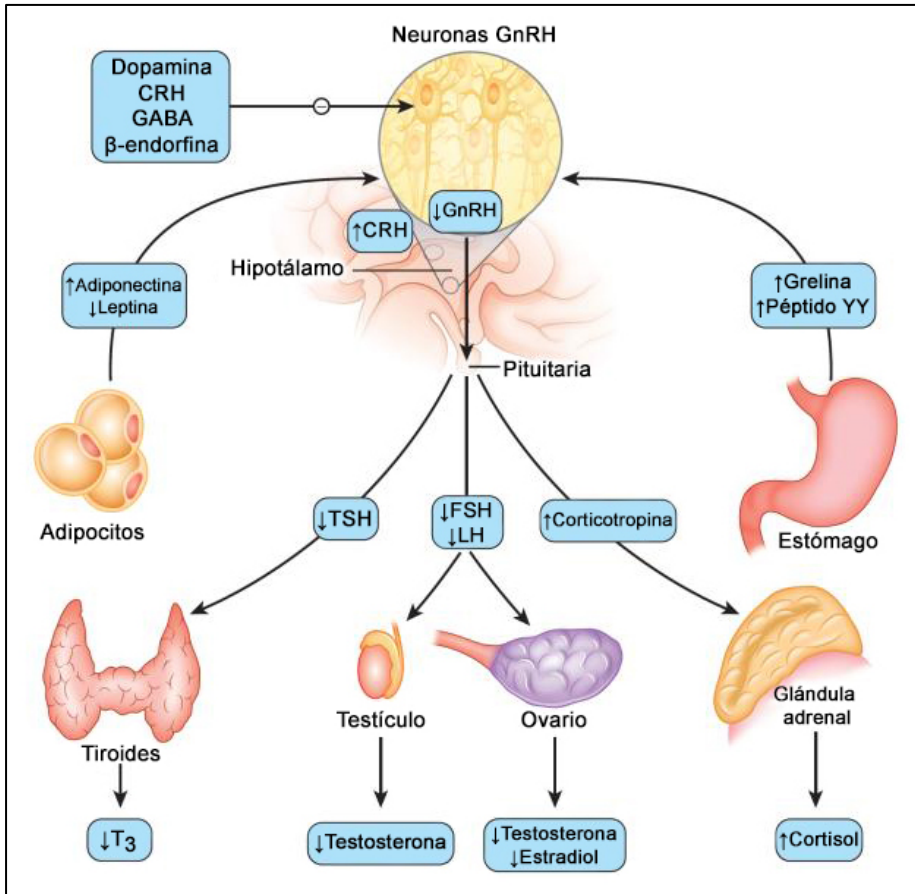


Figura 5. Cambios hormonales y otras alteraciones en pacientes con ANR. FSH: Hormona foliculoestimulante; LH: Hormona Luteinizante; TSH: Tirotropina; CRH: corticotropina; T3: triyodotironina; GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina. Adaptada de (105).

1.3.4.1 Eje hipotálamo-hipófisis gonadal

La paciente con anorexia nerviosa presenta alteración de la función hipotálamo-hipófisis-ovárica en forma de hipogonadismo hipogonadotrofo, que puede ser debido a diferentes factores como la disfunción hipotalámica, la pérdida de peso, el ejercicio físico, el hipoestrogenismo y la alteración de neurotransmisores, de la melatonina y de la leptina entre otros (106). Desde

una perspectiva evolutiva, resulta apropiado que el sistema reproductivo se desactive en tiempos de hambre y estrés (107). En mujeres con AN, varios estudios han mostrado pulsos de la hormona luteinizante (LH) inmaduros, prepúberes y de baja amplitud que revierten con el aumento de peso. La pulsatilidad alterada de la LH se manifiesta como amenorrea hipotalámica (108). Esto produce como resultado niveles bajos de estradiol y testosterona (109,110).

Cuando el cuadro clínico se instaura antes o durante la pubertad, ésta se caracteriza por una falta de inicio o una detención de su avance. Si la enfermedad se presenta cuando el desarrollo puberal ha finalizado se traduce clínicamente en una amenorrea secundaria (106).

La pronunciada distribución sesgada de sexo en la AN da pie a considerar la susceptibilidad dependiente del sexo y el posible rol patógeno que las hormonas sexuales puedan tener en la enfermedad (102). Por un lado sabemos que el estradiol modula procesos centrales en los que intervienen péptidos saciantes y orexigénicos (111). A su vez, se ha visto que posiblemente la deficiencia de hormonas sexuales empeore los síntomas de la ansiedad y la depresión que son característicos de la AN (102). Finalmente, este estado hipoestrogénico es a su vez un factor de riesgo en la reducción de la densidad mineral ósea (DMO) (112).

1.3.4.2 Eje hipotálamo-hipófisis tiroideo

La disfunción tiroidea en la anorexia nerviosa se manifiesta con un estado hipotiroideo sin hipersecreción de TSH (106). La inanición y la pérdida de peso son seguidas por una disminución adaptativa en las concentraciones circulantes

de triyodotironina (T3) (113–115) y tiroxina (T4) para disminuir la tasa metabólica y el gasto energético basal (GEB)(116). Con el aumento de peso, los niveles de T3 aumentan y se ha observado además, una correlación con el aumento de la tasa metabólica (117,118).

1.3.4.3 Eje hipotálamo-hipófisis suprarrenal

El eje HPA se encuentra estimulado en la AN. Se observan niveles plasmáticos de cortisol aumentados que correlacionan inversamente con el IMC y la masa grasa, los pulsos secretorios aparecen elevados y existe un aumento de la vida media del cortisol (114,119–122). Además, como se comentó anteriormente al hablar de las citoquinas, la evidencia sugiere que el circuito de retroalimentación bidireccional entre las citoquinas y el cortisol, que es fundamental para el correcto funcionamiento del eje HPA se encuentra alterado en pacientes con AN (83,86).

1.3.4.4 Adipocitoquinas y péptidos reguladores del apetito

Los mecanismos para controlar la ingesta de alimentos implican complicadas interacciones entre los sistemas periféricos y el sistema nervioso central (SNC). El hipotálamo desempeña un papel clave en el control del metabolismo energético, es responsable de la sensación de hambre y saciedad (ingreso energético) y mediante la modulación del sistema nervioso simpático (SNS) interviene en la termogénesis adaptativa (gasto energético). Estos procesos se realizan a través de péptidos reguladores del apetito, sintetizados en diferentes órganos: melanocortina, proteína agouti, péptido regulado por cocaína y anfetamina (CART) y neuropeptido Y (NPY) en el propio sistema nervioso central; PYY, ghrelina y factor liberador de la hormona del crecimiento en el sistema gastrointestinal, insulina en el sistema endocrino y leptina, adiponectina

y visfatina en tejido adiposo. Estos peptidos envían señales a los centros hipotalámicos para regular de manera positiva o negativa el apetito y el gasto energético (123,124).

La regulación del balance energético a largo plazo se realiza mediante un sistema constituido por hormonas segregadas en proporción a la adiposidad corporal, leptina e insulina fundamentalmente, que actuarían sobre el SNC. Éste a su vez responde a los cambios en la grasa corporal, activando la vía anabólica o catabólica. La primera, mediante la producción de NPY que estimula la ingestión de alimentos, y la segunda a través del sistema de la melanocortina hipotalámica (α -MSH), lo cual reduce el hambre y produce pérdida de peso (125,126).

En la anorexia nerviosa, la pérdida de peso posterior a la restricción de la ingesta alimentaria se produce principalmente a expensas del tejido adiposo (127). Como hemos mencionado, esta inanición desencadena diversos mecanismos adaptativos que van variando a lo largo del curso de la enfermedad (94). En este sentido, las adipocitoquinas y las citoquinas se encuentran entre las moléculas reguladoras que han sido designadas como contribuyentes esenciales para algunas de las adaptaciones fisiológicas que se llevan a cabo (53). Específicamente, la leptina y la adiponectina han emergido como las más abundantes hormonas derivadas del tejido graso, redefiniendo el tejido adiposo como un componente clave no solo del sistema endocrino, sino también del sistema inmunológico (128).

La leptina es una hormona anorexigénica (129) que indica las reservas de energía actuales del organismo. Su producción es proporcional a la grasa almacenada (130). Las concentraciones plasmáticas de leptina aparecen marcadamente reducidas en los pacientes con AN en comparación con los

controles (127,131–135), lo cual está relacionado con su papel crucial en la adaptación neuroendocrina a la inanición, siendo responsable de una manera muy determinante de los cambios inducidos en los ejes neuroendocrinos en condiciones de falta de energía (136). Distintos trabajos han puesto de manifiesto el importante papel que la leptina desempeña en las adaptaciones que se llevan a cabo durante la AN y su potencial uso en el laboratorio para diagnóstico (134), pronóstico y seguimiento de la enfermedad (133,137).

Por otro lado, la adiponectina es una hormona derivada del tejido adiposo que actúa como factor sensibilizante a la insulina (138). Aunque la adiponectina es una adipocitoquina bastante estudiada en pacientes con AN, dos revisiones realizadas sobre este tema ponen de manifiesto la existencia de resultados contradictorios entre los trabajos publicados (137,139). Mientras que algunos estudios mostraron niveles disminuidos o sin cambios en pacientes con anorexia nerviosa en comparación con los controles (131,140–142), la mayoría de los estudios que comparan los niveles de adiponectina en pacientes con AN con controles sanos encontraron niveles más altos. (132,143–145).

De igual modo que sucede con la leptina, la adiponectina juega un papel importante en el control de la homeostasis energética (146). Esta adipocitoquina actúa como una hormona orexígena y favorece el almacenamiento al estimular la ingesta de alimentos e inhibir el gasto energético (147). Por último, se ha observado que las fluctuaciones en los niveles de adipocitoquinas a lo largo del curso del tratamiento han mostrado asociaciones con la recuperación antropométrica (132) lo que apunta a estos biomarcadores como indicadores útiles de respuesta al tratamiento y posiblemente también como indicadores del riesgo de futura recaída.

La grelina, a su vez, es un péptido orexigénico secretado por las células oxínticas del estómago que provoca una disminución de la pulsatilidad de la gonadotropina en animales y seres humanos (148). Se ha descrito que este péptido se encuentra elevado en mujeres con trastornos alimentarios y amenorrea (113). A su vez se ha propuesto que la grelina pueda constituir un mejor discriminador de la disponibilidad inmediata de energía que la leptina (149).

Ya mencionábamos al hablar del estado inmunológico las interconexiones existentes entre hormonas y neuropéptidos y el sistema inmunitario. Se sabe, que la leptina y la adiponectina producen efectos sobre las células inmunológicas, siendo la leptina un potenciador de la activación inmunitaria y un regulador al alza de las respuestas inflamatorias, mientras que la adiponectina, por el contrario, se comporta como inhibidora de la producción de citoquinas proinflamatorias (150). Además de lo descrito anteriormente, la leptina también podría funcionar como un importante regulador de la actividad del sistema inmunitario, ligando la función de los linfocitos T con el estado nutricional (48).

La literatura señala una creciente necesidad e interés por investigar en mayor profundidad las interacciones que se producen entre el eje HPA, las citoquinas y las hormonas reguladoras del apetito y del control del peso en fases agudas del desarrollo de la enfermedad. Resulta esencial evaluar si alguna de estas moléculas podría ser útil para estimar las probabilidades de recuperación y de recaída a lo largo del tratamiento. En muchos casos parece que la controversia hallada en los resultados publicados con respecto a los marcadores inmunes y las moléculas reguladoras podría estar asociada, en cierta medida, a la heterogeneidad de los pacientes incluidos en los grupos de estudio en cuanto a edad y duración de la enfermedad (76,79,151); por ello, resultan esenciales

estudios acerca de estos biomarcadores metabólicos e inmunológicos en grupos homogéneos de pacientes que controlen esa heterogeneidad.

1.4 Biomarcadores en AN

La AN es una enfermedad grave, en la cual los pacientes pueden resultar muy afectados tanto física como psicopatológicamente. La compleja etiopatogenia, la presencia de múltiples factores mantenedores, así como la aparición de complicaciones en órganos y sistemas que requieren tratamiento específico, hacen que el curso del tratamiento suela ser largo y comprometido. En el caso de una enfermedad que presenta consecuencias tan graves, resulta fundamental disponer de biomarcadores sensibles y fiables que ayuden a seguir adecuadamente el curso de la misma. Asimismo, el uso de biomarcadores adecuados durante el tratamiento facilita que las intervenciones sean más eficaces y biológicamente mejor informadas (96,107,152). No obstante, no resulta fácil establecer buenos biomarcadores en AN ya que, en frecuentes ocasiones, encontramos pacientes que aun sufriendo importantes alteraciones físicas y psicopatológicas presentan valores normales en las analíticas rutinarias de laboratorio (96,153). Recientes trabajos destacan la importancia de desarrollar investigaciones destinadas a identificar biomarcadores y factores de riesgo biológicos que permitan comprender mejor los mecanismos biológicos subyacentes en AN (154).

El principal biomarcador utilizado en AN es el IMC (1). El DSM-5 establece como primer criterio diagnóstico para la AN el bajo peso corporal en el contexto de la edad, el sexo y la salud física (1). Por otro lado, desde el punto de vista clínico, es generalmente aceptado que la estrategia más indicada para mejorar los resultados biológicos es la recuperación de peso (155). Sin embargo, se ha comprobado en diferentes ocasiones que la normalización del peso corporal no

significa que la enfermedad se haya resuelto, ya que frecuentemente, pacientes con IMC considerados como saludables, aún presentan importantes síntomas que incluyen trastornos de la alimentación y depresión (156,157).

Al ser el IMC el principal biomarcador en AN, el DSM-5 ha considerado importante definir y clasificar de acuerdo con esta escala la gravedad de la enfermedad, estableciendo los denominados **especificadores de gravedad**. De este modo, según su índice de masa corporal, los pacientes con AN se clasifican en: leve ($IMC \geq 17,0$), moderado ($IMC=16-16,99$), grave ($IMC= 15-15,99$) y extremo ($IMC < 15$) (1). En el caso de niños y adolescentes, lo que el DSM-5 recomienda es utilizar los percentiles de IMC correspondientes. En realidad, no solo el DSM-5, también otros trabajos (158–160) señalan la importancia de diferenciar entre pacientes con un muy bajo IMC y alta gravedad de los síntomas (AGS) y los pacientes con un IMC más alto y baja gravedad de síntomas (BGS); ya que ambos subgrupos parecen presentar diferentes respuestas endocrinas y emocionales.

La utilidad del uso de estos especificadores de gravedad parece ser muy clara en el caso de pacientes con un IMC bajo, pero no parece clara en el resto de los casos. Varios estudios han puesto de manifiesto la asociación que existe entre valores de IMC muy bajos y complicaciones médicas graves (7,133,161) dejando clara la utilidad de los especificadores de gravedad en el caso de enfermedad aguda (162). Sin embargo, en lo que respecta a IMC moderados, la evidencia no resulta concluyente a la hora de establecer asociaciones generalizadas entre el peso y la probabilidad de recuperación u otros factores pronósticos (163,164). En este sentido, algunos de los autores que han investigado la validez de los especificadores de gravedad según el IMC (162,165–169) muestran un apoyo limitado a la validez de su uso como indicadores de gravedad y destacan la importancia de estudiar e investigar otras variables clínicas.

En línea con esto, podemos ver cómo varios parámetros biológicos, diferentes del IMC, ya han sido propuestos como relevantes biomarcadores para el seguimiento de la AN. La proteína hepática ferritina ha sido propuesta por varios autores (170–172) como un buen biomarcador del estado de desnutrición, válido también para monitorear las mejoras en el estado nutricional de los pacientes. Varios estudios realizados en pacientes con AN han encontrado altas concentraciones de esta proteína durante el diagnóstico inicial, que disminuían con la rehabilitación nutricional (94,172–175). Otro indicador del estado nutricional, la transferrina, también se ha encontrado alterado en pacientes con AN observándose niveles más bajos que en los controles (94,176). Parece que el patrón de recuperación de la transferrina está muy ligado al proceso de renutrición y por ello se ha propuesto también como marcador nutricional en pacientes con AN (65). El C3, otra proteína hepática que es también un tradicional indicador del estado nutricional, se ha descrito disminuida en varias ocasiones en pacientes con AN (52,94–96,177) y también ha sido propuesta como un posible marcador sérico de relevancia clínica, al reflejar la gravedad de la enfermedad y facilitar el seguimiento del proceso de realimentación (96). Por otro lado, la leptina, que como mencionamos, se encuentra notablemente reducida en pacientes con AN (127,132,134), también se ha propuesto como un adecuado marcador de detección y seguimiento (132,134). Por último, algunos autores coinciden en el uso de la hormona T3 como biomarcador durante el curso del tratamiento en AN, debido en este caso a su utilidad clínica para evaluar la supresión metabólica y la posterior recuperación (178). El estudio de estos y otros factores que puedan actuar como marcadores biológicos constituye una gran área de interés en el espectro de los TCA.

1.5 Justificación de la tesis

Los TCA son patologías de difícil manejo que derivan en cuadros médicos importantes con severas consecuencias físicas y psicológicas (179). Se trata de enfermedades que poseen la mayor tasa de mortalidad global (del 5-10%) de las enfermedades mentales, sobre todo en el caso de la AN (3).

La elevada complejidad generada por la conjunción de numerosos factores predisponentes, desencadenantes y de mantenimiento repercute en el hecho de que sea una enfermedad con una elevada tasa de cronicidad (3). De hecho, los TCA se han convertido en un importante problema social y sanitario con un elevado impacto en la salud pública, y con graves consecuencias para quienes la padecen, su familia y su entorno. Considerando todo lo descrito anteriormente resulta fundamental la realización de proyectos de investigación que abarquen el estudio de esta enfermedad desde diferentes puntos de vista.

Los pacientes con TCA presentan en su clínica evidencias de anomalías hematológicas, bioquímicas, nutricionales, hormonales e inmunológicas que se corresponden con correlatos biológicos. El estudio de variables biológicas que funcionen como indicadores de eventos moleculares y celulares aporta información muy valiosa para mejorar la comprensión de la enfermedad y debería contribuir al uso de dichos marcadores biológicos como una herramienta esencial en el diagnóstico, tratamiento y evaluación de su curso. El estudio de los biomarcadores resulta esencial también para la identificación de casos graves y establecer el pronóstico; en definitiva, para mejorar la asistencia con una aproximación terapéutica más eficaz.

En la actualidad existe un creciente interés por el estudio del sistema inmunológico debido a que la etiopatogenia de un elevado número de

enfermedades crónicas se ha relacionado con alteraciones en este sistema. Los estudios realizados acerca de las modificaciones del sistema inmunológico en pacientes con TCA no muestran consistencia en muchos de los hallazgos descritos, hecho que parece atribuible en primer lugar a la falta de coincidencia en relación a las características de los pacientes estudiados, cuando no a una excesiva falta de homogeneidad en los propios grupos de estudio, sobre todo en los trabajos más antiguos.

La motivación del presente trabajo es profundizar en la evaluación de marcadores inmunológicos, metabólicos y hormonales, concretamente en pacientes adolescentes que sufren el primer episodio de la enfermedad, así como en la detección de biomarcadores clínicos de enfermedad y severidad. El trabajo se ha llevado a cabo en el marco del estudio integral ANABEL (*Anorexia Nerviosa en Adolescentes: Biomarcadores de Evolución Longitudinal*), un estudio de seguimiento de un año de duración en adolescentes, diseñado para evaluar variables clínicas, psicológicas, familiares, sociales, bioquímicas e inmunológicas de utilidad en el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de AN de inicio en la adolescencia. Las pacientes incluidas en los tres estudios que conforman esta tesis han sido tomadas enteramente del estudio ANABEL.

Además de pacientes pertenecientes a la categoría de AN, en esta tesis también se incluyeron pacientes cuyo trastorno fue clasificado como OTAIE. En adelante, al hacer mención al grupo total de pacientes estudiadas se nombrarán como pacientes con TCA, aunque se alude exclusivamente a AN y OTAIE y se excluirían pacientes con BN.

Como controles se han utilizado adolescentes sanas participantes en los estudios ANOBAS (180) Y AFINOS (181), tal como se detalla en el apartado de materiales y métodos (pag 79). El estudio ANOBAS se concibió posteriormente y

de forma complementaria al estudio ANABEL. Su objetivo fue el estudio de especificadores psicológicos y biológicos que permitieran discriminar entre pacientes de TCA, pacientes con trastorno afectivo y pacientes con asma del sexo femenino, dado que son todos trastornos que comparten características disruptoras a nivel psicológico y familiar que pueden alterar la regulación neuroinmunoendocrina. Las pacientes con TCA son las mismas del estudio ANABEL y se emparejaron, mediante un diseño caso-control (1-3) con adolescentes sanas y con las pacientes de trastorno afectivo y las pacientes con asma, siendo las adolescentes de estos tres últimos grupos reclutadas y estudiadas durante el desarrollo del proyecto ANOBAS (180) (PSI2011-23127).

El estudio AFINOS, por otra parte, se enfocó exclusivamente a población adolescente sana de la comunidad de Madrid, y de forma resumida, su objetivo fue estudiar relaciones entre sobrepeso/obesidad, actividad física y prevalencia de alergia e infecciones. La población de sexo femenino incluida en este estudio, coordinado por el grupo de inmunonutrición del ICTAN y realizado con la misma metodología analítica para los biomarcadores comunes con la población de pacientes con TCA del estudio ANABEL, se incluyó para constituir la población de referencia o grupo control.

Los objetivos, así como algunos apartados de la metodología y los resultados se han organizado en tres secciones correspondientes a tres estudios separados, los cuales tienen en común el haber sido realizados con datos obtenidos de las pacientes participantes en el estudio ANABEL. Dos de estos trabajos han sido publicados (Anexo 1).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Primer estudio

2.1.1 Hipótesis

Existe un interés científico por delimitar la importancia relativa que tienen, respectivamente, la desnutrición y el grado y naturaleza de la psicopatología, para explicar las observaciones a nivel del sistema inmunológico de pacientes con TCA, tales como la leucopenia o la alteración de los distintos tipos de linfocitos. En ocasiones se ha dado mayor preponderancia a la interacción neuroinmunológica que subyace al comportamiento alimentario alterado que a la malnutrición (64,182). Así, la hipótesis a contrastar es que las diferentes células inmunitarias y, específicamente, las subpoblaciones linfocitarias, se ven afectadas tanto por el subtipo diagnóstico como por la gravedad de la desnutrición en pacientes con TCA.

2.1.2 Objetivos

- Evaluar la influencia de la pérdida de masa corporal en la variabilidad de las células blancas y las subpoblaciones linfocitarias en este grupo de pacientes con TCA.
- Analizar la influencia del subtipo diagnóstico en la variabilidad de las células blancas y las subpoblaciones linfocitarias en este grupo de pacientes con TCA.

2.2 Segundo estudio

2.2.1 Hipótesis

- Aunque existen inconsistencias entre los estudios publicados, muchos de ellos han descrito que determinados parámetros inmunológicos (citoquinas) y endocrinos (adipocitoquinas y cortisol) se encuentran alterados en pacientes con AN (77,182,183). Sin embargo es difícil contar con marcadores sensibles en esta malnutrición atípica en la que las analíticas de rutina no muestran apenas alteraciones hasta las etapas más avanzadas del desgaste corporal (96,153). Por tanto, es necesario estudiar la situación de los biomarcadores potenciales en las condiciones concretas de los pacientes de reciente inicio de la enfermedad. Hipotéticamente, estos parámetros se mostrarán alterados también en un grupo de pacientes con AN en su primer episodio.

2.2.2 Objetivos

- Evaluar el estado basal de determinados biomarcadores metabólicos e inmunológicos en un grupo homogéneo de pacientes en su primer episodio de AN.

2.3 Tercer estudio

2.3.1 Hipótesis

- La utilidad de los especificadores de gravedad, es decir la gravedad de los signos y síntomas, como ayuda para identificar un peor pronóstico en las pacientes cuenta con opiniones variables entre expertos, siendo

más admitida su utilidad en los casos que presentan un índice de masa corporal (IMC) gravemente alterado que en casos que presentan una alteración moderada o leve (163,164). Se precisa identificar y validar otro tipo de biomarcadores clínicos que complementen al IMC. En tal caso, la hipótesis que se desea contrastar es que existen biomarcadores diferentes del IMC que pueden operar como marcadores de enfermedad y severidad al inicio y pasados doce meses de tratamiento en pacientes con TCA en su primer episodio.

2.3.2 Objetivos

- Analizar la presencia de biomarcadores diferentes del IMC que puedan actuar como marcadores de enfermedad y severidad tanto en el momento inicial del tratamiento como al cabo de doce meses del mismo, en una muestra de pacientes adolescentes con AN clasificadas según la gravedad del trastorno juzgada por la pérdida de masa corporal, durante su primer episodio de la enfermedad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Organización por estudios

Como se ha explicado anteriormente, este trabajo se compone de tres estudios que forman parte de un estudio más amplio denominado ANABEL, cuya finalidad ha sido brevemente mencionada en el apartado 1.5. Las diferencias en el número y tipo de diagnóstico de los pacientes incluidos, así como el diseño de cada estudio, el número y procedencia de los sujetos controles y las variables de estudio, se exponen en la Tabla 6.

Tabla 6. Diseño, participantes y variables de los tres estudios.

	Tipo y diseño del estudio	Participantes		Variables de estudio
		Pacientes	Controles	
Estudio 1	Observacional, analítico, de corte transversal	N=66	N=90	Inmunológicas: glóbulos blancos y subpoblaciones linfocitarias
	Estadio inicial o fase aguda	Origen: Estudio ANABEL	Origen: Estudio AFINOS	
Estudio 2	Observacional, analítico, de pares caso-control ajustados por edad, sexo y estado socioeconómico, de corte transversal	N=41	N=41	Inmunológicas (citoquinas), adipocitoquinas y cortisol
	Estadio inicial o fase aguda	Origen: Estudio ANABEL	Origen: Estudio ANOBAS	
Estudio 3	Observacional, longitudinal analítico y retrospectivo	N=66	N=45	Bioquímicas, inmunológicas y hormonales
	Estadio inicial y tras doce meses de tratamiento	Origen: Estudio ANABEL	Origen: Estudio ANOBAS	

3.2 Tipos y diseño de investigación

3.2.1 Primer estudio

3.2.1.1 *Diseño y constitución del estudio*

Se trata de un estudio analítico, observacional y transversal realizado en el estadio inicial o fase aguda de la enfermedad.

3.2.1.2 *Variables evaluadas*

Se evaluaron las variables antropométricas y porcentaje y número total de células blancas: leucocitos, linfocitos, neutrófilos, monocitos, basófilos y eosinófilos. A su vez, también se estudiaron las siguientes subpoblaciones linfocitarias: CD45+CD3+ (linfocitos T maduros), CD45+CD4+ (Linfocitos T colaboradores), CD45+CD8+ (linfocitos T citotóxicos), CD45+CD3-(CD56+16)+ (Natural killer) CD45+CD19+ (linfocitos B), CD3+CD45RO+ (linfocitos T de memoria), CD4+CD45RA+ (linfocitos T colaboradores naïve), CD3+CD4+CD45RO+ (linfocitos T colaboradores memoria), CD8+CD45RA+ (linfocitos T citotóxicos naïve), CD3+CD8+CD45RO+ (linfocitos T citotóxicos memoria), Ratio CD4+/CD8+.

3.2.2 Segundo estudio

3.2.2.1 *Diseño y constitución del estudio*

En este caso se siguió un diseño de pares caso-control emparejados 1:1 por sexo, edad y nivel socioeconómico (NSE), con el objetivo de reducir los posibles

factores de confusión. Este estudio es también transversal y se realizó con datos correspondientes al momento basal del estudio ANABEL.

3.2.2.2 Variables evaluadas

Se investigaron variables antropométricas, adipocitoquinas [leptina, receptor soluble de leptina (sObR)], adiponectina e índice de leptina libre (FLI)] y parámetros inmunológicos (citoquinas IL-1 β , IL-2, IL-6 y TNF- α) y hormonales (cortisol).

3.2.3 Tercer estudio

3.2.3.1 Diseño y constitución del estudio

Se trata de un estudio longitudinal de casos con un grupo control ajustado por sexo y edad. Los parámetros corresponden con medidas tomadas en tiempo basal (T0) y al cabo de doce meses de tratamiento (T12).

3.2.3.2 Variables evaluadas

Se estudiaron las variables antropométricas y un total de 13 parámetros séricos: bioquímicos [ferritina, transferrina, albúmina y 25-hidroxivitamina D (25-OH-vit D)], hormonales [PYY (PYY), T3, cortisol y estradiol] y adipocitoquinas (leptina, sObR y FLI y adiponectina).

3.3 Participantes

Los pacientes y controles incluidos en los tres estudios pueden verse de forma esquemática en la figura 6, y se describen a continuación.

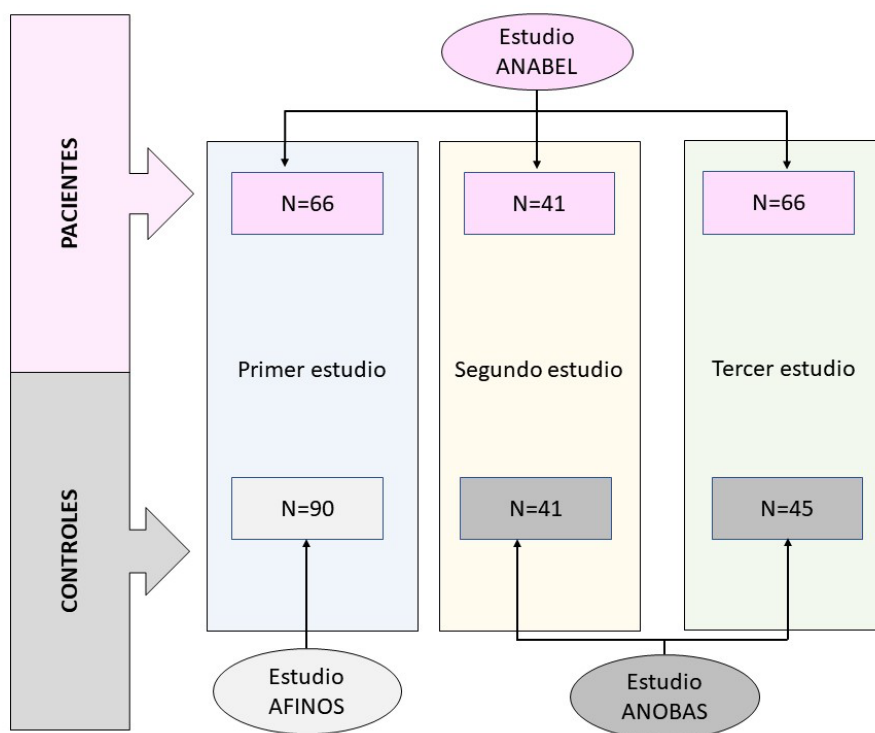


Figura 6. Distribución y procedencia de los participantes por estudios.

3.3.1 Pacientes

Las pacientes incluidas en los tres estudios fueron tomadas del estudio ANABEL (Figura 6). Durante los años 2010 a 2013, todas aquellas adolescentes diagnosticadas con AN típica o atípica en la Unidad de Trastornos Alimentarios del Hospital Universitario Infantil Niño Jesús (HUINJ) de Madrid fueron invitadas a participar en el estudio longitudinal ANABEL. El diagnóstico se realizó mediante una entrevista semiestructurada antes del ingreso. El estudio integral, con una planificación de dos años de duración, tenía por objetivo la evaluación de variables clínicas, familiares, sociales, psicológicas y biológicas implicadas en el pronóstico de adolescentes con AN u OTAIE (184). Ciento catorce pacientes fueron sometidos a *screening* para su inclusión en el estudio, de las cuales

treinta y cinco fueron excluidas por no cumplir con todos los criterios de inclusión y trece pacientes rechazaron participar en el estudio. Un total de 66 pacientes que cumplían los criterios de inclusión que se muestran a continuación fueron reclutadas para el estudio.

- Criterios de inclusión:
 - 1) Sexo femenino
 - 2) Rango de edad entre 12 y 17 años
 - 3) Primer episodio de TCA
 - 4) Primer ingreso para tratamiento de TCA (185,186)
 - 5) Aceptación para participar en el estudio
 - 6) Analítica completa de sangre
- Criterios de exclusión:
 - 1) Pacientes con diagnóstico diferencial de cualquier otra enfermedad
 - 2) Pacientes que hubiesen seguido algún tratamiento previo específico para TCA
 - 3) Haber recibido una vacuna dentro de las seis semanas anteriores al día de la toma de muestra de sangre
 - 4) Haber sido hospitalizada por infecciones u otras enfermedades

Las pacientes fueron inicialmente diagnosticadas de acuerdo a los criterios del DSM IV-TR (187) mediante una entrevista realizada por expertos clínicos. Atendiendo a los subtipos diagnósticos la clasificación resultó de la siguiente manera: AN subtipo restrictivo (N = 40), AN subtipo de atracón / purga (N = 9) y trastornos de la conducta alimentaria no especificados (TCANE), según la denominación del DSM IV (N = 17). Posteriormente los pacientes se reclasificaron de acuerdo con el DSM-5 (1,188), para estar en línea con los criterios operativos actuales. Este hecho permitió reducir el número de

pacientes sin categoría especificada TCANE (189) de 17 a 9 pacientes, resultando los nuevos subgrupos de la siguiente manera: AN subtipo restrictivo (N = 46), AN subtipo de atracción / purga (N = 11) y OTAIE (N = 9).

Del total de las 66 pacientes, el 81,8% presentaban amenorrea (primaria o secundaria), 10,6% regla irregular y el 7,6% restante mostraba ciclos menstruales normales.

La mayoría de los pacientes en el momento de la incorporación en el estudio habían sido ingresados recientemente para tratamiento intrahospitalario (76%) (185), un número menor ingresó para seguir la hospitalización domiciliaria (21%) de acuerdo con la modalidad descrita por Villaseñor y col. (186) y el 3% siguió tratamiento ambulatorio. El 71% de los pacientes hospitalizados se encontraban en un percentil del IMC para la edad menor o igual a 10 (190).

Todos los participantes y sus padres dieron su consentimiento pleno e informado una vez que se les explicaron el propósito y la naturaleza del estudio. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas éticas de la declaración de Helsinki de 1964 y sus posteriores modificaciones, y la ley española 14/2007 de Investigación Biomédica. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Infantil Niño Jesús.

El primer estudio incluye las 66 pacientes mencionadas. En el caso del segundo estudio participaron 41 pacientes de las 66 procedentes del estudio ANABEL y 41 controles sanas procedentes del estudio ANOBAS (ver apartado 3.3.2.2.). Al tratarse de un diseño de pares caso-control, cada caso de AN se emparejó con un control utilizando la edad y el NSE como criterios de coincidencia. El NSE se tipificó utilizando el índice de Hollingshead, basado en la educación y ocupación del cuidador primario (191). Un rango de I a V designó las categorías más baja a más alta de NSE. El emparejamiento por criterio de edad tuvo una permisividad

de ± 1 año y para el emparejamiento por NSE se procuró usar la misma categoría, pero se admitió también una categoría adyacente en un porcentaje mínimo de casos. Inicialmente, con este criterio se formaron 50 pares caso-control, pero solo 41 correspondían a pacientes de AN con análisis completos de biomarcadores sanguíneos. Así pues, en este segundo trabajo se incluyeron 41 parejas y no se incluyó el diagnóstico OTAIE.

En relación a las 41 pacientes que se emparejaron en este estudio, la mayoría habían sido admitidas recientemente para recibir tratamiento hospitalario (80%), un número menor ingresó para seguir la hospitalización domiciliaria (15%) y el resto (5%) recibió tratamiento ambulatorio. Por otro lado, el sesenta y cinco por ciento de los pacientes se encontraban bajo terapia psicofarmacológica (ansiolíticos / antidepresivos / antipsicóticos) que había sido prescrita no antes de tres semanas previo a la evaluación. El 37% de los pacientes con AN tomaba inhibidores de la recaptación de serotonina, el 32% tomaba ansiolíticos (benzodiazepinas) y el 7% tomaba antipsicóticos de segunda generación. Sin embargo, el 46% de los pacientes en terapia psicofarmacológica tenían una combinación de al menos dos tipos de medicación.

En el tercer estudio participaron las 66 pacientes adolescentes del estudio ANABEL y 45 controles sanas procedentes del estudio ANOBAS. Se establecieron dos grupos entre las pacientes atendiendo a su severidad (anorexia nerviosa leve y grave). La clasificación se hizo en base al percentil del IMC (al tratarse de pacientes adolescentes) según el criterio establecido por el DSM-5 en sus especificadores de gravedad. En adultos el punto de corte entre grupo leve y grave se encuentra fijado en un IMC de 16 kg / m². De acuerdo con esto, se procedió a averiguar a qué percentil de IMC de adulto correspondían los puntos de corte establecidos en el DSM-5, para así trasladar esos puntos de corte de adultos a puntos de corte según percentil en adolescentes. De acuerdo con las

tablas de Sobradillo (190), el percentil de IMC que corresponde a una mujer adulta de 27 años con un IMC de 16 kg / m² es un percentil 3 que a su vez equivale a -2 desviaciones estándar (DE) (192). De este modo se trasladó a la población adolescente y se fijó el punto de corte en -2DE, o lo que es lo mismo - 2 puntuaciones Z de IMC (Figura 7).

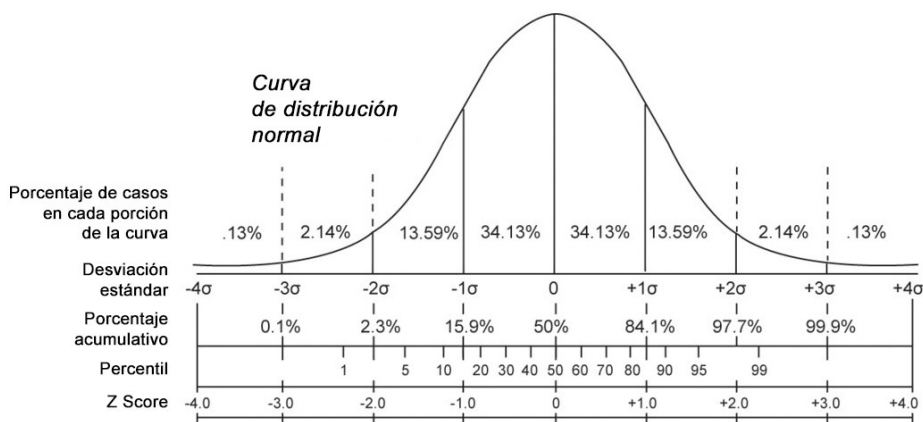


Figura 7. Área de una distribución normal por segmentos en función de la desviación estándar.

En este estudio, el subgrupo leve incluye a aquellas pacientes pertenecientes a los subgrupos leve y moderado según la clasificación del DSM-5. Esto se ha traducido en aquellas pacientes con percentil de IMC > 3, o lo que es lo mismo: una puntuación Z de IMC > -2. Por otro lado, el subgrupo de anorexia nerviosa grave comprende aquellas pacientes diagnosticadas como severas y extremadamente severas según el DSM-5 (1) que en nuestro caso se traduce en aquellas que tienen un percentil de IMC ≤ 3 equivalente a una puntuación Z de IMC ≤ -2.

Asimismo, en el punto final del estudio (T12) se creó un nuevo grupo que incluía aquellas pacientes (N=36) que presentaban un percentil de IMC calificado como “saludable”. Para establecer el grupo “saludable” en nuestro grupo de

adolescentes se tomó como referencia el IMC considerado como saludable en el caso de adultos con AN ($\text{IMC} \geq 18.5 \text{ kg/m}^2$), el recomendado para utilizar tanto en entrevistas clínicas como en investigaciones epidemiológicas en pacientes con AN (193,194). Este punto de corte en adultos se trasladó posteriormente a adolescentes, utilizando el conversor de la web pediátrica (192) resultando corresponder con un percentil 15 o una puntuación Z del IMC de -1 . Finalmente se realizaron comparaciones entre este grupo y el control.

3.3.2 Controles

Se utilizaron dos grupos control en los tres estudios (Figura 6).

3.3.2.1 Grupo control AFINOS (primer estudio)

En el primer estudio el grupo control estuvo formado por 90 adolescentes cuyos datos fueron recogidos durante su participación en el estudio epidemiológico AFINOS (181), llevado a cabo en la región de Madrid (España) y que tuvo como objetivo investigar la actividad física como agente preventivo del desarrollo de sobrepeso, obesidad, alergias, infecciones y factores de riesgo cardiovascular en adolescentes. Todos los sujetos participantes se encontraban sanos, libres de enfermedad psiquiátrica o somática, tal como contestaron en cuestionarios autoadministrados respondidos por ellos y por sus padres.

Antes de participar en el estudio AFINOS, todos los adolescentes voluntarios y sus padres / tutores fueron informados sobre las características del estudio y ambos, los adolescentes y sus tutores, brindaron consentimiento firmado por escrito. El Estudio AFINOS fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital

Puerta de Hierro (Madrid, España) y por el Comité de Bioética del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas.

3.3.2.2 Grupo control ANOBAS (segundo y tercer estudio)

En el segundo y tercer estudios, el grupo control fue constituido a partir de 41 y 45 controles sanas respectivamente, procedentes del estudio ANOBAS. Este grupo control estuvo formado por 50 adolescentes sanas, libres de enfermedades psiquiátricas o somáticas, según lo comprobado por entrevistas clínicas (K-SADS-PL) que fueron realizadas por psicólogos capacitados. Estas niñas participaron en el estudio de casos y controles ANOBAS (PSI2011-23127) (195), que implicó la cumplimentación de una batería de cuestionarios psicológicos por parte de padres y adolescentes. Las familias fueron reclutadas en escuelas de enseñanza secundaria de Madrid (tanto públicas como subvencionadas por el Estado) a través de solicitudes de participación de respuesta directa enviadas a través del alumnado. Los informes psicológicos y los resultados de las analíticas en sangre se entregaron personalmente a los padres. Aquellos adolescentes que presentaban un diagnóstico psiquiátrico fueron remitidos a sus correspondientes servicios de salud mental y fueron excluidos del estudio.

Ningún sujeto control participante en el estudio fue vacunado en las seis semanas previas al día de la toma de muestra de sangre. Tampoco presentaron ningún episodio infeccioso activo o apuntaron haber tomado medicamentos inmunomoduladores en las seis semanas previas a la toma de muestra.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas éticas de la declaración de Helsinki de 1964 y sus posteriores modificaciones, así como a la ley española 14/2007 de Investigación Biomédica. Este estudio ANOBAS fue

aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Infantil Niño Jesús y la Universidad Autónoma de Madrid. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los padres y tutores de los participantes incluidos en el estudio.

3.3.3 Cálculo del tamaño de la muestra

3.3.3.1 *Primer estudio*

El tamaño de la muestra para este estudio se calculó tomando el porcentaje de linfocitos como resultado principal, asumiendo una media \pm desviación estándar de $34,23 \pm 8,96$ (%) en adolescentes sanas (70) y considerando como relevante un cambio medio del 12% sobre los valores de la población, es decir ± 4 en el valor absoluto del porcentaje de linfocitos. Tomando una relación de asignación desequilibrada entre los grupos de pacientes y de controles de un 1:1,36, una diferencia media estimada del 12% con varianzas iguales, un poder estadístico del 80% y un error alpha de 0,05, el número mínimo de medidas a realizar es 156, distribuidas como 66 y 90 en los grupos de pacientes y de controles, respectivamente.

3.3.3.2 *Segundo estudio*

Para el estudio de pares de casos y controles emparejados, el poder de análisis se basó en el cortisol, asumiendo que la leptina, la adiponectina y los otros parámetros relacionados no presentarían dificultades con respecto al poder estadístico porque el impacto esperado de la anorexia nerviosa en ellos es mayor que para el cortisol. Tomando como referencia el valor de cortisol de adolescentes europeos sanos publicado en Pérez de Heredia et al. (2014)(196), considerando un poder estadístico del 80% y una diferencia mínima esperada del 20% entre los grupos AN y C, los resultados mostraron que serían necesarios 42 pares emparejados. Sin embargo, cálculos similares del tamaño de muestra

para los valores de citoquinas produjeron tamaños de muestra inviables debido a la muy alta desviación estándar que presentan estos biomarcadores (196).

3.4 Instrumentos y procedimientos

3.4.1 Medidas antropométricas en pacientes y controles

Todos los pacientes y controles fueron sometidos a una evaluación antropométrica siguiendo procedimientos estándar (sin zapatos y en ropa interior) y llevada a cabo por un investigador o profesional sanitario en el caso de las pacientes.

Las mediciones de las pacientes se realizaron en el primer día del ingreso o al día siguiente, utilizando una balanza electrónica digital (Seca 780 [Hamburg, Deutschland]; precisión de 0,100 g) con una varilla de medición telescópica incorporada (Seca 220: precisión de 0,5 cm). Las medidas antropométricas en el grupo control ANOBAS se obtuvieron en sus correspondientes escuelas utilizando una báscula digital Seca (Tipo 799 precisión de 0,100 g) con varilla de medición de altura. De forma similar, las medidas del grupo control procedente del estudio AFINOS se obtuvieron con una báscula estandarizada con precisión de $\pm 0,05$ kg y estadiómetro incorporado para la medición de la talla con precisión de ± 1 mm.

A partir de estos datos, tanto en pacientes como en controles se calcularon los estándares de referencia para parámetros antropométricos aplicando una escala ordinal o de percentiles y a través del cálculo de la puntuación normalizada Z (también conocido como Z score). “El Z score es una unidad tipificada, o normalizada que se utiliza en estadística para comparar datos procedentes de diferentes muestras o poblaciones y se define como el número

de desviaciones típicas que un valor dado toma con respecto a la media de su muestra o población de referencia” (197).

El IMC [peso (kg) / talla² (m²)], y el Z score del IMC fueron calculados según las tablas de referencia de crecimiento españolas (190). Como se ha explicado más arriba, para el Z score la fórmula aplicada fue: (valor IMC – Media poblacional para la edad y sexo)/DE poblacional para la edad y sexo. Posteriormente, se calcularon los correspondientes percentiles de IMC y el porcentaje de peso corporal ideal (% PCI) de acuerdo con los datos antropométricos de Sobradillo, y utilizando las tablas y el sitio web de pediatría española (192).

3.4.2 Análisis de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre venosa de los pacientes y los controles (AFINOS y ANOBAS) entre las 8:00 y las 9:00 horas de la mañana, en ayunas de 8 a 12 horas.

En el caso de los pacientes la extracción se realizó al día siguiente de la inscripción en el estudio. Las muestras se recogieron en tubos Vacutainer con agente anticoagulante EDTA-K3E (BD Biosciences, San José, CA, USA) y en tubos sin anticoagulante. Exceptuando el tubo para hematología y subpoblaciones linfocitarias, el resto de tubos se centrifugaron durante 15 min. a 1300g y 4°C para obtener plasma o suero y fueron alícuotados en diferentes tubos y congelados a -80°C hasta su uso. Todos los análisis se realizaron en diferentes alícuotas para evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

3.4.2.1 Recuentos de células blancas

Los recuentos de células blancas (en porcentaje y número absoluto de células) fueron determinados en pacientes y sujetos control AFINOS con un contador

automático de células sanguíneas ADVIA 120 (Siemens Healthcare, Madrid, España) y contador automático H1(Technicon Bayer, Tarrytown, Nueva York, EE.UU.), respectivamente.

3.4.2.2 *Fenotipado inmunológico de subpoblaciones*

Las muestras de sangre de los pacientes y de los controles AFINOS se diluyeron 1: 1 con el reactivo Cytochex™ (Streck Laboratories, Omaha, NE, EE. UU.), un conservante indicado para ampliar el número de días en los que es posible realizar el inmunofenotipaje de glóbulos blancos porque preserva la actividad de los sitios antigénicos. Así, el inmunofenotipado se realizó dentro de los 7 días posteriores a la recogida. Para ello, se incubaron alícuotas de sangre (200µL) durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con ACMo conjugados con fluorocromo (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.) que permitieron diferenciar las células positivas para los siguientes marcadores de superficie: CD45 (marcador pan-leucocitario), CD3 (células T maduras), CD4 (células T colaboradoras), CD8 (células T citotóxicas), CD19 (células B), CD16 + 56 (células *Natural killer*), CD45RO (células de memoria) y CD45RA (células naïve).

Se realizó un procedimiento de inmunotinción cuádruple con las siguientes combinaciones: CD3/CD8/CD45/CD4, CD45RA/CD45RO/CD8/CD3, CD45RA/CD45RO/CD4/CD3 y CD3/CD16 + 56/CD45/CD19. El anticuerpo de reconocimiento de la molécula que ocupa cada posición en dichas combinaciones llevaba conjugado un fluorocromo distinto según esa misma posición en esta serie: FITC/PE/PerCP-Cy5.5/APC.

Después de la lisis de los glóbulos rojos, los linfocitos se analizaron mediante citometría de flujo (FACScan Plus Dual Laser; Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). La cuantificación de células positivas para cada fluorocromo se realizó

frente a un tubo control en el que la muestra de sangre se incubó con anticuerpos isotípicos conjugados con los mismos fluorocromos que los ACMo empleados para el marcaje de las subpoblaciones. Con ello se definió la fluorescencia inespecífica, y se empleó como umbral de positividad para el resto de las muestras. Se obtuvo el porcentaje de cada subpoblación linfocitaria y se calcularon los recuentos celulares absolutos a partir del número total de linfocitos (Tabla 7). A su vez, también se calculó la relación CD4 + : CD8 +.

Tabla 7. Subpoblaciones linfocitarias analizadas

Subpoblaciones Linfocitarias	
CD45+CD3+	Linfocitos T Maduros
CD45+CD4+	Linfocitos T-Auxiliares
CD45+CD8+	Linfocitos T-Citotóxicos
CD45+CD3(CD56+16) +	Células NK
CD45+CD19+	Linfocitos-B
CD3+CD45RO+	Linfocitos T-Memoria
CD4+CD45RA+	Linfocitos T-Aux, Naïve
CD3+CD4+CD45RO+	Linfocitos T-Aux, Memoria
CD8+CD45RA+	Linfocitos T-Citotox, Naïve
CD3+CD8+CD45RO+	Linfocitos T-Citotox, Memoria

En cada caso, el CD que figura en la primera posición se ha utilizado como población de anclaje para el cálculo.

3.4.2.3 Determinación de adipocitoquinas, citoquinas y PYY

Los niveles plasmáticos en ayunas de adipocitoquinas (leptina y adiponectina), PYY y citoquinas (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α) fueron medidos mediante la tecnología de inmunoensayo múltiple con microesferas identificadas por una combinación de fluorocromos (xMAP technology de Luminex Corp., Austin, TX, USA). Se usaron kits comerciales siguiendo el protocolo del fabricante (Human Metabolic

Hormone, Human Adipokine y Human high sensitivity Cytokine/Chemokine; Milliplex MAP de Millipore Corp.). Para la lectura de resultados se utilizó el equipo MAGPIX (Luminex Corp.). La concentración mínima detectable para cada analito fue la siguiente: IL-1 β , 0,06 pg/mL; IL-2, 0,26 pg/mL; IL-6, 0,20 pg/mL; TNF- α , 0,07 pg/mL; leptina, 27 pg/mL; adiponectina, 11 pg/mL; PYY, 28 pg/mL. El FLI se calculó como el cociente leptina: sObR.

3.4.2.4 Determinación de sObR

El sObR se midió mediante ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay; Abnova, Walnut, CA, EE. UU.) y posteriormente se leyeron los resultados en un lector de microplacas (Espectrofotómetro PowerWave XS; BioTek). La concentración mínima detectable para el sObR fue 0,04 ng/mL.

3.4.2.5 Determinación de marcadores bioquímicos y hormonales

A continuación, se resumen los métodos, proveedores y sensibilidad en la determinación de marcadores bioquímicos y hormonales que fueron realizados según protocolos del laboratorio del hospital Niño Jesús de Madrid (Tabla 8).

Tabla 8. Técnicas para la determinación de marcadores bioquímicos y hormonales.

Parámetro	Método	Modelo de analizador	Proveedor	Sensibilidad
Ferritina	Inmunoensayo enzimático tipo sandwich	DXI 800	Beckman Coulter	0,2 ng/mL
Transferrina	Inmunoturbidimetría	Image	Beckman Coulter	75 mg/dL
Albúmina	Colorimetría verde de Bromocresol	AU-680	Beckman Coulter	1,5 g/dL
25-OH VIT D	Ensayo inmunológico quimioluminiscente	Lumipulse G600II	Fujirebio	4 ng/mL
Complemento C3	Inmunoturbidimetría	Image	Beckman Coulter	6 mg/dL
T3	Ensayo inmunológico quimioluminiscente	DX880	Beckman	0,1ng/mL
Cortisol	Ensayo inmunológico quimioluminiscente	Architect i1000SR	Abbott	1 µg / dL
Estradiol	Radioinmunoensayo (Spectria)	Auto-gamma Cobra	Packard	1,5 pg/mL

25-OH VIT D: 25 hidroxivitamina D; T3: triyodotironina

3.5 Análisis de datos

3.5.1 Primer estudio.

Antes de los análisis estadísticos, se examinó la normalidad de la distribución de los datos con la prueba de Kolmogov-Smirnov, así como la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. En los casos en que fue necesario se realizó una transformación logarítmica de la variable para conseguir la normalidad de su distribución.

Las diferencias entre pacientes con TCA y el grupo control, así como las diferencias entre cada uno de los diferentes subtipos de TCA y el grupo control se evaluaron mediante la prueba t de Student de muestras independientes. Las diferencias significativas entre los tres grupos de diagnóstico, ANR, ANP y OTAIE, se calcularon mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Cuando el análisis indicó una diferencia significativa, se utilizó el método de Tukey para realizar una comparación por pares entre los diferentes subtipos diagnósticos.

Para evaluar el efecto del Z score del IMC sobre las variables hematológicas e inmunológicas, se utilizó un modelo de regresión lineal corregido por la edad. En un segundo modelo, se incluyó también el subtipo diagnóstico como un factor de potencial influencia.

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una $P < 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el software estadístico IBM SPSS versión 22.

3.5.2 Segundo estudio

Del mismo modo que en el primer estudio, antes de realizar los análisis estadísticos se examinó la distribución normal de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Después de la transformación logarítmica los valores de IL-6, leptina y FLI y la transformación logarítmica de la variable más 1 para TNF- α , todas las variables se distribuyeron normalmente.

Las diferencias entre los pacientes con AN y sus controles emparejados se evaluaron mediante un modelo lineal mixto que incluía “Grupo (AN o Control)” y “Tratamiento psicofarmacológico (sí / no)” como factores fijos y “Par” como factor de repetición con efecto aleatorio. En el mismo modelo, se incluyó el “subtipo de AN (ANR o ANP)” como factor anidado dentro del grupo AN y se analizó mediante un contraste jerárquico de efectos fijos tipo I.

Dado que los valores detectables de IL-1 β e IL-2 en plasma fueron solo el 25% y el 49% de las muestras totales, respectivamente, esas variables se analizaron mediante una conversión a variables categóricas. Se definieron tres niveles para cada citoquina: valores indetectables, rango "bajo" y rango "medio", ya que un número equilibrado de los datos detectables totales se incluyó en las dos últimas categorías. Posteriormente, se comparó la distribución de los datos de AN y Control por categoría mediante la prueba de Chi-cuadrado.

Finalmente se realizaron correlaciones parciales ajustadas por edad buscando relaciones significativas entre citoquinas, adipocitoquinas, niveles de cortisol y puntuación Z del IMC en los pacientes y controles por separado. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el software estadístico IBM SPSS versión 23.

3.5.3 Tercer estudio

De nuevo, previo a la realización de los análisis estadísticos, se chequeó la normalidad y la homogeneidad de varianza de las variables a estudio mediante dos pruebas: prueba de Kolmogov-Smirnov (para test de normalidad) y prueba de Levene (para test de homogeneidad de la varianza).

- I. *Comparaciones entre el grupo control y los subgrupos grave y leve en ambos momentos del tiempo.*

Las diferencias entre el grupo control y los subgrupos de pacientes severos y leves se calcularon mediante la prueba t de Student de muestras independientes, tanto en el momento basal como al cabo de 12 meses.

Las siguientes variables necesitaron ser transformadas a logaritmos en base 10 para alcanzar la normalidad: 1) en T0: ferritina, estradiol, leptina, sObR, y adiponectina; 2) en T12: Z score del IMC, ferritina, albúmina, C3, estradiol, leptina, PYY y FLI. A su vez, en el grupo de control, las siguientes variables necesitaron ser transformadas a logaritmo de base 10 para alcanzar la normalidad: ferritina, estradiol y leptina. Con aquellas variables que no seguían una distribución normal, incluso después de ser transformadas a logaritmos de base 10, se empleó la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney. Este fue el caso del Z score del IMC, albúmina, leptina, PYY y edad.

- II. *Cálculo de las diferencias entre subgrupos.*

Las diferencias entre los subgrupos severo y leve en cada tiempo (T0 y T12), se llevaron a cabo utilizando un modelo lineal general univariado que incluía: “severidad” como factor fijo y “edad” como covariable. Este modelo se realizó tanto con las variables normales como con aquellas que habían sido

transformadas. En el caso de aquellas variables que no cumplían con los requisitos (albúmina y leptina en T0 y albumina y PYY en T12) se utilizó un modelo lineal generalizado no paramétrico con una distribución Tweedie, que incluía: “severidad” como factor predictor y “edad” y “valor de la variable en T0” como covariables, y como estadístico la Chi-cuadrado de Wald.

III. Comparaciones grupo saludable frente al grupo control.

Se realizó una comparación de todas las variables entre el grupo de pacientes que presentaban un percentil del IMC denominado “saludable” y el grupo control en T12. Para ello se comprobó en primer lugar qué variables mostraban correlación significativa con el Z score del IMC en el grupo de los controles, para realizar la corrección en los casos necesarios (C3, leptina, sObR, FLI).

A continuación, se llevó a cabo la prueba t de Student de muestras independientes con aquellas variables que resultaron normales o alcanzaron la normalidad después de realizar una transformación logarítmica (ferritina, transferrina, C3, C4, estradiol, leptina, FLI y adiponectina). La prueba no paramétrica U de Mann Whitney se realizó con las siguientes variables: Z score IMC, ferritina, albúmina y PYY. En aquellos casos en los que se había encontrado una corrección con el Z score del IMC se utilizaron modelos lineales univariados con el Z score del IMC como covariable.

También se realizaron correlaciones parciales ajustadas por edad entre las variables séricas de las pacientes y se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $P < 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el software estadístico IBM SPSS versión 22. Todos los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Primer estudio

4.1.1 Glóbulos blancos y subpoblaciones linfocitarias en pacientes de TCA en estado basal.

Para el estudio de poblaciones linfocitarias el grupo de pacientes estaba constituido por 66 adolescentes diagnosticadas con TCA. Los resultados de las medidas antropométricas de pacientes y controles se recogen en la Tabla 9. El grupo total de 66 pacientes se distribuía en 46 pacientes con ANR (70%), 11 con ANP (17%) y 9 pacientes diagnosticadas de OTAIE (13%). Comparados con los controles, tanto el peso como el IMC son significativamente más bajos en el conjunto de pacientes (TCA) así como en cada subgrupo diagnóstico por separado.

Entre los diferentes grupos de diagnóstico, el peso es significativamente menor en ANR y ANP en comparación con OTAIE ($p > 0.001$). También observamos diferencias en cuanto al IMC entre subtipos diagnósticos. El subgrupo restrictivo presenta el IMC más bajo ($15,36 \pm 1,45$), mientras que el subgrupo de las pacientes OTAIE es el que menos se diferencia del grupo control ($19,12 \pm 1,23$ vs. $21,3 \pm 2,99$).

En relación al tiempo de duración de la enfermedad, el tiempo más corto correspondía a las pacientes de OTAIE (7,11 meses), y el más alto a las de ANP (15,18 meses), pero la diferencia entre los tres grupos no alcanzaba significación estadística.

Tabla 9. Parámetros antropométricos en controles y pacientes con TCA. Estudio primero.

	CONTROL	TCA	OTAIE	ANP	ANR	p#
	n=90	n=66	n=9	n=11	n=46	
Edad (años)	14,86±1,17	14,62±1,38	14,44±1,24	15,27±1,42	14,50±1,38	0,230
Peso (kg)	56,98±8,97	42,08±6,45***	49,92±5,65 ^a	43,92±3,80 ^{***b}	40,11±5,84 ^{***b}	<0,001
Altura (m)	1,63±0,06	1,61±0,07°	1,61±0,05	1,63±0,04	1,61±0,08°	0,850
IMC (kg/m²)	21,29±2,99	16,05±1,84***	19,12±1,23 ^a	16,45±0,75 ^{***b}	15,36±1,45 ^{***c}	<0,001
Duración de la enfermedad (meses)		10,97±8,16	7,11±3,41	15,18±8,85	10,72±8,32	0,110

Los valores se expresan como medias ± DE

IMC: índice de masa corporal; TCA: trastorno del comportamiento alimentario; OTAIE: trastorno del comportamiento alimentario no especificado; ANP: AN subtipo purgativo; ANR: AN subtipo restrictivo.

Asteriscos indican diferencias frente al control; Prueba t Student. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, °P<0,1

#ANOVA entre grupos TCA.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de TCA. Prueba de Tukey; P<0,05.

Con respecto a los glóbulos blancos, se encontró un número más bajo de leucocitos en las pacientes con TCA en comparación con las adolescentes sanas ($P = 0,019$) (Tabla 10). Tanto los porcentajes como el número total de neutrófilos, monocitos y basófilos son significativamente más bajos en el grupo TCA frente al grupo control. Por el contrario, se observó un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos respecto del grupo control, mientras que el número de linfocitos fue similar.

Comparando los diferentes subtipos diagnósticos con el grupo control de forma individual, se encontró una tendencia en ANR y ANP a presentar menor número de leucocitos ($P = 0,074$ y $P = 0,091$, respectivamente). Se observaron también valores más bajos en el porcentaje y el número de monocitos y basófilos en todos los subtipos de diagnóstico, mientras que el aumento en el porcentaje de linfocitos solo fue significativo en el grupo ANR ($P = 0,007$). Además, el porcentaje y número de neutrófilos resultó más bajo tanto en ANR como en ANP al comparar con los controles, sin embargo, en ANP no alcanzó significación estadística debido al pequeño tamaño del grupo. La población de eosinófilos mostró un mayor porcentaje en OTAIE y ANP ($p = 0,022$ y $p = 0,007$, respectivamente) frente a los controles, pero no se encontraron diferencias en el número de eosinófilos.

No se observaron diferencias relevantes entre los subgrupos de TCA en los diferentes tipos de glóbulos blancos, excepto por un mayor porcentaje de eosinófilos en ANP en comparación con ANR.

RESULTADOS

Tabla 10. Células blancas (porcentaje y número) en adolescentes con TCA.

	CONTROL	TCA	OTAIE	ANP	ANR	p [#]
	n=90	n=66	n=9	n=11	n=46	
Leucocitos (cel./μL)	6612±1736	5962±1612*	5841±1590	5673±1602°	6055±1643°	0,780
Linfocitos (%)	35,6±9,1	38,9±9,5*	35,5±12,6	36,7±11,1	40,0±8,3**	0,153
Linfocitos (cel./μL)	2300±617	2260±636	1950±494	2049±771	2370±606	0,011
Neutrófilos (%)	53,7±9,6	50,5±10,2*	54,4±14,2	49,4±12,8	50,1±8,6*	0,156
Neutrófilos (cel./μL)	3624±1406	3094±1305*	3264±1740	2869±1484°	3115±1186*	0,871
Monocitos (%)	7,0±1,5	4,4±1,5***	4,6±1,5*** ^{a, b}	5,3±2,7*** ^a	4,1±1,0*** ^b	0,092
Monocitos (cel./μL)	461±151	259±100***	272±126***	281±88***	251±99***	0,424
Basófilos (%)	1,4±0,5	0,9 ±0,4***	0,8±0,4**	1,0±0,5*	0,9±0,4***	0,466
Basófilos (cel./μL)	94±41	53±27***	43±17***	55±31**	55±28***	0,297
Eosinófilos (%)	2,2±1,1	2,7±2,1	3,4±2,1* ^{a, b}	3,6±2,2*** ^a	2,4±2,1 ^b	0,039
Eosinófilos (cel./μL)	150±84	159±115	188±100	196±111	144±118	0,358

Los valores se expresan como medias ± DE

TCA: trastorno del comportamiento alimentario; OTAIE: otros trastornos de la conducta alimentaria y de la intesta especificados ANP: AN subtipo purgativo; ANR: AN subtipo restrictivo.

Asteriscos indican diferencias frente al control; Prueba t Student. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, °P<0,1

#ANOVA entre grupos TCA ajustado por edad

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de TCA. Prueba de Tukey; P<0,05.

El análisis de las diferentes subpoblaciones linfocitarias (Tabla 11) mostró solo algunas diferencias significativas entre los subtipos diagnósticos, mientras que sí se observaron importantes diferencias al comparar con el grupo control.

Así, el grupo completo de pacientes con TCA mostró porcentajes más altos de linfocitos CD4+ y CD19+ y porcentajes más bajos de CD8+ y células NK en comparación con los controles. En relación a los porcentajes de células de las subpoblaciones naïve y memoria, en el grupo global de pacientes con TCA se observó un porcentaje significativamente menor de CD8+ memoria y significativamente más alto de CD8+ naïve que en los controles. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de CD4+ naïve y CD4+ memoria en comparación con los controles. Por subtipos diagnóstico, estos resultados también se observan en el grupo ANR. En referencia al grupo ANP, la elevación en el porcentaje de linfocitos CD4+ observado en relación a los controles es incluso mayor que el observado en los otros dos subtipos.

En cuanto al número de células, no se observaron diferencias en la subpoblación linfocitaria de los CD4+ totales, ni en CD4+ naïve o CD4+ memoria al hacer la comparación entre los grupos TCA y control. Sin embargo, se encontraron recuentos más bajos de CD8+, NK y CD8+ memoria y un aumento en el número de células CD19+ en relación con el grupo control. Por subtipos de diagnóstico, los recuentos de células CD8+ fueron más bajos solo en el subgrupo OTAIE, y los CD19+ fueron más altos solo en ANR. Los cambios en las subpoblaciones CD4+ y CD8+ se reflejan en el cociente CD4+:CD8+, que fue significativamente mayor en el grupo total de pacientes, así como en todos los subtipos de diagnóstico que en el grupo control.

En relación con las células naïve y memoria, los subgrupos ANP y ANR mostraron un porcentaje mayor de CD8+ naïve y un porcentaje y número de células significativamente menor de CD8+ memoria que el grupo control. Por el contrario, no se encontraron diferencias entre ANP y ANR y tampoco frente al grupo control para CD4+ naïve y CD4+ memoria (ni en % ni en número). Sin embargo, el subgrupo OTAIE se comportó de forma distinta, mostrando un porcentaje de CD4+ naïve más bajo que los controles y una tendencia a presentar un número más bajo de células CD8+ naïve que los controles (Tabla 12).

Tabla 11. Subpoblaciones linfocitarias en adolescentes con TCA.

		CONTROL	TCA	OTAIE	ANP	ANR	P [#]
		n=90	n=66	n=9	n=11	n=46	
CD45+CD3+	%	70,2±6,5	69,4±5,9	65,0±5,8 ^a	74,3±4,7 ^b	69,1±5,4 ^a	0,003
Linfocitos T Maduros	cel./μL	1613±455	1567±464	1275±374 [*]	1527±609	1634±427	0,023
CD45+CD4+	%	37,8±6,7	41,6±6,3 ^{***}	40,4±4,5 ^a	46,6±4,8 ^{***b}	40,6±6,5 ^a	0,018
Linfocitos T-Auxiliares	cel./μL	872±287	933±305	792±245	960±392	955±291 [°]	0,182
CD45+CD8+	%	26,9±5,7	23,6±4,9 ^{***}	23,2±5,7 [°]	25,2±4,7	23,4±4,8 ^{***}	0,676
Linfocitos T-Citotóxicos	cel./μL	619±218	530±184 ^{**}	452±149 [*]	508±188	551±189 [°]	0,137
CD45+CD3(CD56+16) + Células NK	cel./μL	382±193	230±106 ^{***}	279±134	172±108 ^{**}	234±96 ^{***}	0,141
CD45+CD19+	%	10,9±2,8	12,7±4,4 ^{**}	11,8±4,0	11,0±3,1	13,3±4,6 ^{**}	0,168
Linfocitos-B	cel./μL	249±88	293±149 [*]	232±114	236±165	319±147 ^{**}	0,007
CD3+CD45RO+	%	49,6±9,9	42,9±11,5 ^{***}	47,6±15,4	40,5±11,2 ^{**}	42,6±10,6 ^{***}	0,526
Linfocitos T-Memoria	cel./μL	788±249	656±220 [*]	586±206 [*]	609±248 [*]	683±216 [*]	0,138
CD4+CD45RA+	%	48,3±10,4	47,0±12,0	39,6±12,1 [*]	46,3±13,3	48,6±11,4	0,152
Linfocitos T-Aux. Naïve	cel./μL	428±181	453±228	331±192	455±240	478±230	0,127
CD3+CD4+CD45RO+	%	26,4±5,0	26,3±7,6	28,8±8,7	29,0±8,2	25,1±7,1	0,116
Linfocitos T-Aux. Memoria	cel./μL	420±141	398±133	354±103	443±204	396±116	0,859
CD8+CD45RA+	%	58,1±13,2	64,0±12,0 ^{**}	57,1±18,6 ^a	72,2±8,8 ^{**b}	63,7±11,5 ^{a,b}	0,117
Linfocitos T-Citotox. Naïve	cel./μL	360±152	341±134	262±132 [°]	364±132	351±134	0,121
CD3+CD8+CD45RO+	%	14,5±5,7	11,0±5,0 ^{***}	12,9±7,2	8,4±3,4 ^{**}	11,3±4,7 ^{**}	0,396
Linfocitos T-Citotox. Memoria	cel./μL	234±118	169±91 ^{***}	158±97 [°]	127±60 ^{***}	182±94 ^{**}	0,127
cociente CD4+:CD8+		1,49±0,48	1,84±0,52 ^{***}	1,85±0,55 [*]	1,92±0,47 ^{**}	1,82±0,54 ^{***}	0,934

Los valores se expresan como medias ± DE

TCA: trastorno del comportamiento alimentario; OTAIE: otros trastornos del comportamiento alimentario y de la ingesta especificados; ANP: AN subtipo purgativo; ANR: AN subtipo restrictivo.

Asteriscos indican diferencias frente al control; Prueba t Student. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, °P<0,1

[#]ANOVA entre grupos TCA ajustado por edad. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de TCA. Prueba de Tukey; P<0,05.

Tabla 12 . Particularidades en las subpoblaciones linfocitarias por subtipos diagnósticos.

Subtipo diagnóstico	
<i>ANR</i>	<p>En este subtipo se observa un mayor porcentaje y número de linfocitos B (CD45+CD19) que en controles, hecho que no se repite en los otros dos subtipos diagnósticos.</p> <p>Se observa también un aumento del porcentaje de linfocitos T CD4+ comparado con controles y mayor porcentaje de linfocitos T CD8+ naïve y menor de linfocitos T CD8+ memoria.</p>
<i>ANP</i>	<p>En este subtipo se observa un mayor porcentaje de linfocitos T maduros (CD45+CD3+) que en control y muestra diferencias con los otros dos subgrupos.</p> <p>El subtipo ANP también es aquel en el que se observa un mayor aumento del porcentaje de linfocitos auxiliares CD4+ frente al grupo control, pero sigue en cualquier caso la misma dirección que en el grupo ANR. También las diferencias de las células CD8+ naïve y memoria frente a control son semejantes a las observadas para ANR.</p>
<i>OTAIE</i>	<p>En el subtipo OTAIE no se observa el mantenimiento en el número de células totales CD45+CD3+ (linfocitos T maduros) que sí se observa en los subtipos ANP y ANR. Es el único subtipo que presenta valores significativamente más bajos que los controles en cuanto a este número de células totales CD45+CD3+.</p> <p>Es el único subtipo en el que se observa un descenso del porcentaje de CD4+CD45RA+</p> <p>Por último, el aumento del porcentaje de CD8+CD45RA+ observado en ANP y ANR no se observa en este subtipo y el número de CD8+ naïve y memoria es inferior al del grupo control.</p>

Los resultados del modelo lineal general que evalúa el efecto de la edad, el Z score del IMC y el subtipo diagnóstico sobre el perfil de leucocitos y subpoblaciones linfocitarias (Tablas 13 y 14) mostraron una influencia del Z score del IMC sobre el porcentaje y número de linfocitos, que es independiente del subtipo diagnóstico. Únicamente en el caso de los eosinófilos se observó una tendencia a una influencia mayor del subtipo diagnóstico que del Z score del IMC.

Tabla 13. Asociaciones entre el Z score del IMC y los glóbulos blancos en pacientes con TCA.

	Modelo básico ^a				Modelo básico + subtipo diagnóstico ^b				
	Z score de IMC			R ²	Z score de IMC		Subtipo diagnóstico		R ²
	β	95% CI	P		P	P			
Leucocitos (cel./μL)	-0,042	(-0,863,0,626)	0,752	0,013	0,996	0,880	0,017		
Linfocitos (%)	-0,311	(-9,244,-1,067)	0,014	0,138	0,039	0,815	0,143		
Linfocitos (cel./μL)	-0,329	(-0,631,-0,102)	0,007	0,201	0,081	0,891	0,204		
Neutrófilos (%)	0,213	(-0,699,8,274)	0,097	0,098	0,121	0,544	0,116		
Neutrófilos (cel./μL)	0,090	(-0,399,0,809)	0,500	0,009	0,459	0,707	0,020		
Monocitos (%)	0,291	(0,008,0,119)	0,026	0,081	0,048	0,079	0,155		
Monocitos (cel./μL)	0,192	(-0,012,0,080)	0,143	0,054	0,161	0,519	0,074		
Basófilos (%)	-0,100	(-0,255,0,114)	0,448	0,027	0,461	0,505	0,049		
Basófilos (cel./μL)	-0,143	(-0,019,0,006)	0,273	0,05	0,694	0,737	0,060		
Eosinófilos (%)	0,190	(-0,034,0,218)	0,150	0,045	0,972	0,067	0,126		
Eosinófilos (cel./μL)	0,135	(-0,026,0,080)	0,307	0,023	0,809	0,403	0,051		

^a Regresión lineal ajustada por edad.

^b Modelo lineal general que incluye subtipo diagnóstico como factor independiente y Z score y edad como covariables.

β, Coeficiente de regresión estandarizado; IC, intervalo de confianza.

Tabla 14. Asociaciones entre el Z score del IMC y las subpoblaciones linfocitarias en pacientes con TCA.

		Modelo básico ^a				Modelo básico + subtipo diagnóstico ^b		
		Z score IMC			R ²	IMC-Z	Subtipo	R ²
		β	95% CI	P		score	diagnóstico	
					P	P		
CD45+CD3+	%	-0,200	(-4,692,0,601)	0,127	0,054	0,532	0,005	0,205
Linfocitos T Maduros	cel./μL	-0,353	(-482,222,-91,465)	0,005	0,182	0,077	0,884	0,185
CD45+CD4+	%	0,010	(-2,779,3,001)	0,939	0,048	0,894	0,033	0,151
Linfocitos T-Auxiliares	cel./μL	-0,250	(-270,159,2,236)	0,054	0,092	0,189	0,702	0,102
CD45+CD8+	%	0,042	(-1,901,2,619)	0,752	0,011	0,504	0,607	0,028
Linfocitos T-Citotóxicos	cel./μL	-0,221	(-154,180,10,493)	0,086	0,096	0,369	0,928	0,098
CD45+CD3-(CD56+16) + Células NK	%	0,316	(0,500,4,450)	0,015	0,097	0,420	0,053	0,142
	cel./μL	0,058	(-38,323,60,070)	0,660	0,014	0,753	0,103	0,085
CD45+CD19+	%	-0,118	(-2,873,1,068)	0,363	0,050	0,938	0,449	0,078
Linfocitos-B	cel./μL	-0,267	(-32,98,-7,325)	0,029	0,188	0,291	0,749	0,196
CD3+CD45RO+	%	0,228	(-0,758,9,775)	0,092	0,047	0,199	0,606	0,063
Linfocitos T-Memoria	cel./μL	-0,147	(-155,503,43,536)	0,265	0,079	0,815	0,756	0,088

RESULTADOS

		Modelo básico ^a				Modelo básico + subtipo diagnóstico ^b		
		Z score IMC			R ²	IMC-Z	Subtipo	R ²
		β	95% CI	P		score	diagnóstico	
					P	P		
CD4+CD45RA+	%	-0,279	(-11,228,-0,515)	0,032	0,085	0,352	0,739	0,094
Linfocitos T-Aux. Naïve	cel./μL	-0,296	(-219,600,-18,221)	0,021	0,117	0,134	0,839	0,122
CD3+CD4+CD45RO+	%	0,283	(0,374,7,108)	0,030	0,115	0,130	0,697	0,126
Linfocitos T-Aux. Memoria	cel./μL	-0,060	(-76,307,48,407)	0,656	0,004	0,564	0,572	0,021
CD8+CD45RA+	%	-0,114	(-8,461,3,390)	0,395	0,012	0,802	0,026	0,126
Linfocitos T-Citotox. Naïve	cel./μL	-0,235	(-116,232,5,403)	0,073	0,076	0,427	0,443	0,101
CD3+CD8+CD45RO+	%	0,063	(-1,818,2,914)	0,645	0,006	0,621	0,153	0,066
Linfocitos T-Citotox. Memoria	cel./μL	-0,167	(-67,293,14,946)	0,208	0,075	0,419	0,442	0,100

Los valores se expresan como medias ± DE

TCA: trastorno del comportamiento alimentario; OTAIE: otros trastornos del comportamiento alimentario y de la ingesta especificados; ANP: AN subtipo purgativo; ANR: AN subtipo restrictivo.

Asteriscos indican diferencias frente al control; Prueba t Student. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, °P<0,1

#ANOVA entre grupos TCA ajustado por edad

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de TCA. Prueba de Tukey; P<0,05.

El Z score del IMC en el modelo básico mostró una relación positiva y significativa con los porcentajes de CD4+ memoria y células NK y una relación negativa con los recuentos de linfocitos T y B, así como con el porcentaje y recuento de linfocitos T CD4+ naïve. No se encontró influencia del subtipo diagnóstico cuando se incluyó en el modelo.

4.2 Segundo estudio

En este segundo estudio de pares caso –control, 33 pacientes son del subtipo ANR y 8 pacientes son ANP, lo cual se corresponde con el 80% y el 20% respectivamente.

La Tabla 13 muestra la distribución de los pacientes con AN y controles según las categorías de NSE. En el 87,8% de los casos para la edad y el 85,4% para el NSE se formaron parejas de la misma categoría. Cinco pacientes con AN se emparejaron con un control un año más joven. Cinco pacientes con AN se emparejaron con un control en una categoría de NSE inmediatamente inferior y un paciente con AN se emparejó con un control en una categoría de NSE inmediatamente superior. No obstante, la distribución por edad y NSE fue similar en los grupos AN y Control, como se pretendía (Tabla 15).

La desnutrición en los pacientes con AN se evidencia en los valores del Z score del IMC como se muestra en la Tabla 15. Los niveles de leptina fueron significativamente más bajos en los pacientes con AN que en sus controles, mientras que las concentraciones de receptor de leptina, adiponectina y cortisol fueron significativamente más altas (Tabla 16; Figura 8). No se encontraron diferencias entre los subtipos de AN en los valores de adipocitoquinas, aunque hubo una tendencia a niveles elevados del receptor de leptina en ANR en comparación con ANP junto con valores de FLI más bajos.

Se encontraron correlaciones significativas entre las adipocitoquinas y el Z score del IMC, tanto en pacientes como en los controles, en concreto, para la leptina y el sObR, pero no para la adiponectina.

Con respecto a las citoquinas, los niveles de TNF- α en plasma fueron significativamente más bajos en el grupo completo de AN que en sus controles

emparejados, pero no se observaron diferencias en IL-6 e IL-1 β entre ambos grupos (Tablas 16 y 17; Figura 8).

La IL-1 β fue detectable solo en el 25% (N = 20) del total de la muestra y mientras que la distribución general de los valores por rangos fue similar en ambos grupos (P = 0,124), la proporción de pacientes con niveles "medios" (20%, N = 8) fue mayor que en los controles (5%, N = 2) (Tabla 17). De manera similar, se observaron diferencias entre los grupos para IL-2. La proporción de pacientes con valores detectables fue mayor (63%, N = 26) que en los controles (39%, N = 16) y también la proporción de pacientes con niveles "medios" fue mayor en los pacientes con AN (36,6%, N = 15) que en los controles (14,6%, N = 6).

No se encontraron correlaciones entre las concentraciones de citoquinas y el Z score del IMC, ni en los pacientes ni en los controles. Tampoco se encontraron correlaciones entre citoquinas y adipocitoquinas en ninguno de los grupos de estudio. La correlación entre leptina y sObR se observó tanto en AN como en el grupo control. Además, se encontró una correlación positiva entre el cortisol y el sObR ($r = 0,436$; $P = 0,005$), a la vez que se detectó una correlación inversa entre el cortisol y el Z-Score del IMC ($r = -0,403$; $P = 0,010$). Ambas asociaciones también se observaron restringiendo la muestra a las pacientes ANR, pero no en los pares sanos.

Tabla 15. Parámetros demográficos y antropométricos en pacientes adolescentes con AN emparejados con adolescentes sanas.

	Control N=41	AN N=41	ANR N=33	ANP N=8	<i>p</i> ^a	<i>p</i> ^b
Age (years)	14,56±1,25	14,71±1,35	14,58±1,35	15,25±1,28	0,611	0,369
NSE (N, (%))					0,970	0,840
Nivel I	3 (7,3)	3 (7,3)	3 (9,1)	0 (0)		
Nivel II	1 (2,4)	2 (4,9)	2 (6,1)	0 (0)		
Nivel III	6 (14,6)	5 (12,2)	4 (12,1)	1 (12,5)		
Nivel IV	10 (24,4)	9 (22)	7 (21,2)	2 (25,0)		
Nivel V	21 (51,2)	22 (53,7)	17 (51,5)	5 (62,0)		
					<i>p</i> ^{c,d}	<i>p</i> ^{c,e}
IMC (kg/m ²)	21,43±1,98	15,57±1,35	15,40±1,40	16,27±0,81	<0,001	0,105
IMC Z-Score	0,21±0,85	-1,62±0,38	-1,65±0,41	-1,49±0,14	<0,001	0,219
Duración de la enfermedad (meses)	-	12,32±9,23	11,70±9,12	14,88±9,88	-	-
Psicofármacos (N, (%))	0 (0)	27 (65)	20 (60)	7 (87,5)	-	-

Los valores se expresan como media ±DE.

IMC, índice de masa corporal; ANR: AN subtipo restrictivo; ANP: AN subtipo atracón-purga; NSE, nivel socioeconómico de acuerdo con el Hollingshead index (191).

^a: AN vs. Control. Prueba t de Student para comparaciones de edad y Prueba Chi² para comparaciones de NSE.

^b: ANP vs. ANR. Prueba U de Whitney para las comparaciones de edad y prueba de Chi² para las comparaciones de NSE.

^c Modelo lineal mixto incluyendo “grupo” como factor fijo, “par” como factor de repetición con efecto aleatorio y “subtipo de TCA” como factor anidado analizado a través de un contraste de efecto fijo jerarquizado de tipo I.

^d: Efecto grupo (AN vs. Control).

^e: Efecto subtipo AN (ANR vs. ANP).

Tabla 16. Niveles de adipocitoquinas, cortisol y citoquinas en pacientes adolescentes con anorexia nerviosa comparados con adolescentes sanas.

	Control N=41	AN N=41	ANR N=33	ANP N=8	p #,a	p #,b
Leptina (pg/mL)	7496±5102	1393±1170	1289±1202	1822±977	<0,001	0,104
sObR (ng/mL)	13,83±3,44	31,94±12,39	33,78±12,72	24,39±7,53	<0,001	0,046
FLI (ng/mL)	0,684±0,701	0,056±0,062	0,050±0,066	0,079±0,038	<0,001	0,045
Adiponectina (µg/mL)	20,58±8,10	33,99±14,89	34,60±13,90	31,45±19,47	<0,001	0,547
Cortisol (µg/dL)	14,72±4,76	17,65±5,64	18,23±6,06	15,24±2,42	0,004	0,123
IL-6 (pg/mL)	2,96±6,32	2,39±4,94	2,67±5,47	1,25±1,39	0,152	0,761
TNF-α (pg/mL)	4,43±1,90	3,60 ± 2,99	3,56±3,11	3,78±2,66	0,008	0,646

Los valores se expresan como media ±DE.

FLI: índice de leptina libre. sObR: receptor soluble de leptina

Modelo lineal mixto incluyendo "grupo" y "psicofármacos" como factores fijos, "par" como factor de repetición con efecto aleatorio y "subtipo diagnóstico" como un factor anidado analizado mediante un contraste jerárquico de efectos fijos de tipo I

a Efecto grupo (AN vs. Control).

b Efecto subtipo AN (ANR vs. ANP).

Tabla 17. Niveles de IL-1 β e IL-2 en pacientes adolescentes con anorexia nerviosa comparados con adolescentes sanas.

		Control	AN	P
IL-1β [#]	Indetectable	34 (82,9) ^a	28 (68,3) ^a	0,124
	Bajo	5 (12,2) ^a	5 (12,2) ^a	
	Medio	2 (4,9) ^a	8 (19,5) ^b	
IL-2 [§]	Indetectable	25 (61,0) ^a	15 (36,6) ^b	0,041
	Bajo	10 (24,4) ^a	11 (26,8) ^a	
	Medio	6 (14,6) ^a	15 (36,6) ^b	

Los datos muestran el número de sujetos y el porcentaje entre paréntesis

[#] IL-1 β : Valores indetectables, <0,05 pg/mL; Valores bajos, 0,05-0,27 pg/mL; Valores medios, 0,27- 7,43 pg/mL,

[§] IL-2: Valores indetectables, <0,1 pg/mL; Valores bajos, 0,1-1 pg/mL; Valores medios, 1-33,8 pg/mL,

Las columnas con diferentes letras en superíndice indican diferencias entre los grupos en ese nivel.

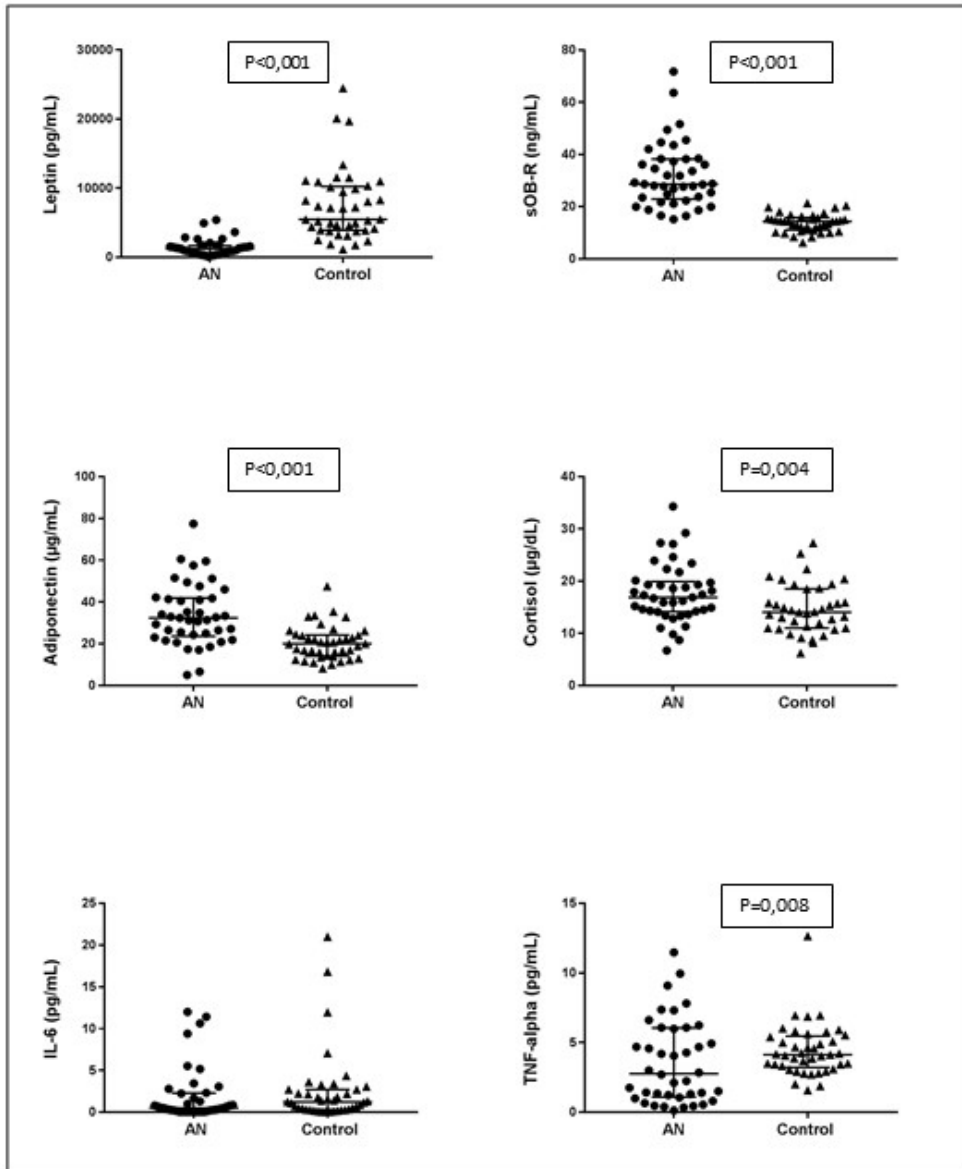


Figura 8. Valores de adipocitoquinas, cortisol, IL-6 y TNF- α en pacientes con AN comparados con adolescentes sanas. Las gráficas muestran los valores individuales de cada parámetro en AN y controles. Las diferencias significativas se señalan indicando la P del efecto “grupo” en el modelo lineal mixto expuesto en la Tabla 16.

4.3 Tercer estudio

4.3.1 Distribución de grupos y edad

La Tabla 18 muestra la edad y otras variables antropométricas de las pacientes y del grupo control en el tercer trabajo. El grupo de estudio está constituido por 66 pacientes, de las cuales 41 pertenecen al subgrupo leve y 25 al subgrupo grave (62,1% y 37,9% del total respectivamente). Tras doce meses de tratamiento el 71,2% de las pacientes continuaban adheridas al estudio. No se encontraron diferencias en cuanto a la edad al comparar los subgrupos leve y grave con el grupo control; sin embargo, sí hubo diferencia en la edad entre ambos subgrupos de pacientes ($p = 0,047$). El subgrupo de pacientes graves presentó una edad media (15,0 años) mayor que el de las pacientes del subgrupo leve (14,4 años). El 84% de los pacientes con 16 años pertenecieron al subgrupo grave.

Entre las 47 pacientes que permanecieron en el estudio en T12, 30 pacientes procedían del subgrupo leve y 17 del subgrupo grave (64% y 36% respectivamente).

4.3.2 Datos antropométricos

El IMC y el Z score del IMC aumentaron significativamente al cabo de doce meses de tratamiento; no obstante, ambos subgrupos mostraron, en ese momento, diferencias con el grupo control (Tabla 18). Al final del estudio, la media de Z score de IMC en ambos subgrupos fue superior a -1. En el caso de aquellas pacientes que iniciaron el tratamiento como “pacientes leves” se observó una diferencia en el IMC frente al control que estaba cerca de dejar de ser significativa ($p = 0,048$); mientras que las que iniciaron el tratamiento como “pacientes severas” aún mostraron importantes diferencias antropométricas

con respecto al control grupo ($p < 0,001$). Por otro lado, se observó que en esta etapa final del estudio, el 76,6% de los pacientes (36 del total de 47 pacientes) había alcanzado un percentil de IMC acorde con un estado saludable (percentil de $IMC > 15$) (188,198).

4.3.3 Parámetros hormonales, bioquímicos, inmunológicos y adipocitoquinas. Marcadores de enfermedad y severidad

La Tabla 19 muestra los valores, medidos en ambos momentos del estudio, de un total de 13 biomarcadores sanguíneos. En el punto inicial, en ambos subgrupos, y en todas las variables (salvo la proteína hepática albúmina y el cortisol en el subgrupo leve) se observaron diferencias respecto del grupo control (lo que hemos denominado como marcadores de enfermedad). Durante esta fase inicial también se encontraron diferencias entre los subgrupos de gravedad establecidos (marcadores de severidad) en las siguientes variables: ferritina ($p = 0,37$), proteína del complemento C3 ($p = 0,009$), cortisol ($p = 0,090$), leptina ($p < 0,001$), sObR ($p = 0,014$) y el índice FLI ($p = 0,027$). Transferrina, T3 y estradiol presentan una tendencia a la significación ($p = 0,059$, $p = 0,073$, $p = 0,059$ respectivamente). Contrariamente, en el punto final del estudio no se encontraron marcadores de severidad, pero sí se continuó observando, tanto en hormonas como en adipocitoquinas, diferencias frente al grupo control, en pacientes provenientes de ambos subgrupos.

4.3.4 Parámetros bioquímicos e inmunológicos

En T0, la proteína hepática ferritina se encontró elevada en ambos subgrupos, al comparar con el grupo control. En particular, el aumento fue más acentuado en el subgrupo grave, con valores un 312% mayores que los del grupo control. Durante esta fase inicial, la ferritina, además de ser un marcador de enfermedad

para ambos subgrupos lo fue también de severidad ($p=0,037$). Pasados los doce meses de tratamiento, los valores de ferritina permanecieron elevados en el subgrupo grave ($p = 0,049$). A diferencia de lo que sucedió con la ferritina en T0, los valores plasmáticos de transferrina fueron más bajos que los del grupo control, en ambos subgrupos ($p < 0,001$). Al cabo de doce meses de tratamiento, los valores de transferrina no mostraron diferencias con respecto al grupo control. Por otro lado, los niveles de albúmina tampoco mostraron diferencias vs. control en ninguna de las dos fases del estudio.

En relación a la proteína del complemento C3, se observó que, en T0, los valores fueron más bajos que los de los controles en ambos subgrupos leve y grave ($p = 0,006$ y $p < 0,001$ respectivamente). Además, en este momento del estudio, la comparación entre subgrupos severo y leve reveló diferencias significativas ($p = 0.009$), mostrándose esta proteína como marcador de severidad durante el T0. Tras doce meses de tratamiento los valores aumentaron significativamente y no presentaron diferencias con el grupo control.

Se observó una correlación negativa entre ferritina y Z score de IMC en pacientes durante la fase inicial ($p=0,023$; $r= -0,281$) y tendencia a la correlación negativa ($p=0,076$; $r= -0,281$) en T12. Sin embargo, es importante destacar que en el grupo de individuos sanos no se observó esta correlación entre Z score de IMC y los niveles de ferritina ($p=0,953$).

4.3.5 Parámetros hormonales

La T3, el cortisol y el estradiol mostraron amplias diferencias durante la fase inicial con respecto al grupo control. Los niveles plasmáticos de T3 y estradiol resultaron más bajos que los de los controles, en contraste con el cortisol, que

mostró valores elevados vs. control (únicamente en el subgrupo grave). Además, en T0, los tres parámetros operan como indicadores de severidad mostrando diferencias significativas entre ambos subgrupos (T3 y estradiol como tendencia: $p = 0,073$, $p = 0,058$, respectivamente). Tras doce meses de tratamiento, los valores de cortisol se normalizaron con respecto al grupo control, pero los niveles de T3 y de estradiol aún resultaron significativamente inferiores (incluso en aquellas pacientes que venían del grupo leve), aunque ya no mostraron diferencias en cuanto a severidad entre grupos. En relación a la prohormona 25-OH vitamina D se encontraron valores elevados en el T0 para ambos subgrupos, una elevación con respecto al grupo control que permaneció tras los 12 meses en el subgrupo leve ($p=0,014$).

Por último, los niveles plasmáticos de PYY en suero no mostraron diferencias respecto del grupo control en ningún subgrupo y en ninguno de los dos momentos de estudio.

4.3.6 Adipocitoquinas

Durante la fase inicial, los valores de leptina fueron notablemente más bajos en ambos subgrupos ($p < 0,001$) al comparar con controles y por el contrario, la adiponectina se encontró elevada en ambos subgrupos vs. control ($p < 0,001$) (Tabla 19). Después de 12 meses de tratamiento, los valores de leptina continuaron siendo significativamente inferiores a los de controles en ambos subgrupos, mientras que los de adiponectina permanecieron elevados también en ambos subgrupos.

En T0, el sObR mostró valores superiores a los de los controles en ambos subgrupos ($p < 0,001$). De igual modo, después de 12 meses de tratamiento los valores siguieron siendo más elevados que los de los controles. En relación al

FLI, este índice presentó valores más bajos que los controles en ambos subgrupos, tanto al inicio como al final del estudio. Además, los valores de FLI y de leptina se mostraron un 93% y 87% más bajos que los de controles al inicio del estudio en el subgrupo grave. La leptina, sObR y FLI aparecieron como marcadores de severidad en T0, mostrando diferencias significativas al comparar entre subgrupos ($p < 0,001$, $p = 0,014$ y $p = 0,027$ respectivamente). Después de 12 meses de tratamiento, estas diferencias entre subgrupos desaparecieron, pero las tres variables continuaron como marcadores de enfermedad en pacientes provenientes de ambos subgrupos.

4.3.7 Comparaciones entre pacientes con IMC “saludable” y controles

La Tabla 20 muestra los valores al final del tratamiento de los marcadores sanguíneos analizados en el subgrupo de pacientes que presentaron un peso “saludable”, y las comparaciones con el grupo de control.

Se encontraron correlaciones significativas en las pacientes en T0 y en el grupo control, entre Z score IMC y las variables C3, leptina, sObR y FLI (Tabla 21), y para dichas variables se utilizó la corrección por el Z score de IMC en la comparativa entre el grupo de “saludables” y controles.

A pesar de haber seleccionado únicamente aquellos individuos que presentaban un Z score del IMC considerado como saludable, se continuaron observando diferencias muy significativas en relación al Z score IMC del grupo control ($p < 0,001$).

Controlando para esta variable en los casos necesarios, se encontraron diferencias al comparar con controles en los siguientes parámetros: ferritina ($p = 0,04$), estradiol ($p < 0,001$), sObR ($p < 0,001$), y adiponectina ($p < 0,001$). Las diferencias en relación al FLI mostraron una tendencia a la significación ($p =$

0,087). Como consecuencia de la corrección, la comparación de leptina entre controles y pacientes con IMC saludable perdió su significación.

Tabla 18. Edad y características antropométricas en pacientes adolescentes con anorexia nerviosa comparado con grupo control. Estudio tercero.

	T0						T12				
	Control N=45	Leve AN N=41	Grave AN N=25	p valor*	Leve-Control p#	Grave-Control p#	Leve N=30	Grave N=17	P valor [§]	Leve-Control p#	Grave-Control p#
Edad (años)	14,61±1,24	14,37±1,30	15,04±1,43	0,047	0,280	0,116	15,37±1,30	16,04±1,43	0,341	0,368	0,097
IMC (kg/m²)	21,43±2,12	16,95±1,59	14,59±1,18	<0,001	<0,001	<0,001	19,38±1,99	18,38±1,58	0,542	<0,001	<0,001
Z score IMC	0,22±0,82	-1,27±0,59	-2,41±0,29	<0,001	<0,001	<0,001	-0,66±0,73	-0,98±0,47	0,926	0,048	<0,001

Los valores se expresan como media ± DE. AN: Anorexia nerviosa.

* AN leve vs grave: Modelo lineal general univariado, que incluye "severidad" como factor fijo y la edad basal como covariable, o modelo lineal generalizado, con distribución Tweedie como modelo, que incluye "severidad" como predictor; y "Edad en T0" como covariable, utilizando el estadístico Chi-cuadrado de Wald cuando fue necesario.

Prueba t de Student o prueba no paramétrica U de Mann Whitney, según corresponda.

§ AN leve-grave: Modelo lineal general univariado, incluyendo "severidad" como factor fijo y "edad en T12" y "variable dependiente en T0" como covariables, o modelo lineal generalizado, con distribución Tweedie como modelo, incluyendo "severidad" como predictor "edad en T12" y "valor de la variable dependiente en T0" como covariables, usando el estadístico Chi-cuadrado de Wald cuando fue necesario.

Tabla 19. Biomarcadores sanguíneos en pacientes adolescentes con AN (leves y graves) en comparación con controles sanos, en estadio basal y tras doce meses de tratamiento.

	T0						T12				
	Control N=45	Leve AN N=41	Grave AN N=25	p*	Leve- Control p#	Grave- Control p#	Leve AN N=30	Grave AN N=17	p valor [§]	Leve- Control p#	Grave- Control p#
Ferritina (ng/mL)	29,03±22,10	69,56±51,47	90,68±51,79	0,037	<0,001	<0,001	38,27±25,69	46,92±31,62	0,774	0,053	0,049
Transferrina (mg/dL)	276,18±39,81	237,00±39,76	216,96±38,30	0,059	<0,001	<0,001	270,84±37,39	278,64±35,87	0,153	0,574	0,866
Albumina (ng/mL)	4,27±0,28	4,35±0,38	4,38±0,47	0,601	0,401	0,292	4,18±0,32	4,26±0,49	0,567	0,249	0,482
25-OH vit D (ng/mL)	23,97±7,16	29,65±10,65	30,33±9,11	0,894	0,013	0,006	29,08±9,39	26,84±10,16	0,025	0,014	0,247
C3 (mg/dL)	98,20±16,30	88,09±16,69	75,82±13,27	0,009	0,006	<0,001	99,51±19,80	106,26±26,65	0,119	0,837	0,430
T3 (ng/mL)	1,27±0,17	1,01±0,20	0,91±0,16	0,073	<0,001	<0,001	1,16±0,20	1,18±0,23	0,400	0,024	0,189
Cortisol (µg/dL)	14,64±4,68	15,84±5,40	18,81±4,91	0,090	0,264	0,001	13,71±4,96	15,98±2,78	0,373	0,474	0,335
Estradiol	81,32±66,92	28,96±43,84	13,87±10,64	0,059	<0,001	<0,001	41,50±34,97	30,94±31,16	0,538	0,003	0,001
Leptina (pg/mL)	7498,76±4903,02	2581,01±2696,45	996,38±829,28	<0,001	<0,001	<0,001	5271,43±3643,42	3894,42±3307,79	0,819	0,017	0,004
sObR (ng/mL)	13,52±3,16	27,89±9,48	37,24±18,97	0,014	<0,001	<0,001	21,63±7,56	22,67±10,08	0,804	<0,001	0,037
FLI (ng/mL)	0,6720±0,6644	0,1200±0,1552	0,044±0,057	0,027	<0,001	<0,001	0,3024±0,2330	0,274±0,374	0,923	0,006	0,008
Adiponectina (µg/mL)	19,80±6,29	37,73±20,96	37,19±13,10	0,985	<0,001	<0,001	35,78±15,60	51,50±47,04	0,286	<0,001	0,019
PYY (pg/mL)	61,83±56,89	79,47±38,19	80,80±46,69	0,394	0,073	0,156	69,29±32,13	65,02±44,44	0,971	0,340	0,671

Los valores se expresan como media ± DE. AN: Anorexia nerviosa.

25-OH vit D: 25 Hidroxi-vitamina D. T3: Triyodotironina. sObR: receptor soluble de leptina, FLI: Índice de leptina libre

* AN (Leve vs graves). Modelo lineal general univariado, que incluye "severidad" como factor fijo y "edad basal" como covariable, o modelo lineal generalizado con distribución Tweedie como modelo, que incluye "severidad" como predictor y "edad en T0" como covariable, utilizando el estadístico de la Chi-cuadrado de Wald cuando fue necesario.

Prueba t de Student o prueba no paramétrica U de Mann Whitney, según corresponda.

§ AN leve vs grave: Modelo lineal general univariado, incluyendo "severidad" como factor fijo y "edad en T12 y "variable dependiente en T0" como covariables. O modelo lineal generalizado, con distribución Tweedie como modelo, e incluyendo "severidad" como predictor; "edad en T12" y "valor de la variable dependiente en T0" como covariables, usando el estadístico de la Chi-cuadrado de Wald cuando sea necesario.

Tabla 20. Biomarcadores en el grupo “saludable” tras doce meses de tratamiento en comparación con el grupo control.

	Controles N=45	IMC “Saludable” T12 N=36	P# IMC “Saludable” T12 vs Control
Z score IMC	0,22±0,82	-0,58±0,62	<0,001
Ferritina (ng/mL)	29,03±22,10	38,19±25,98	0,044
Transferrina (mg/dL)	276,18±39,81	274,11±38,07	0,849
Albúmina (ng/mL)	4,27±0,28	4,14±0,36	0,023
25-OH vit D (ng/mL)	23,97±7,16	27,39±9,61	0,085
C3 (mg/dL)	98,20±16,30	102,06±22,56	0,175*
T3 (ng/mL)	1,27±0,17	1,20±0,21	0,181
Cortisol (µg/dL)	14,64±4,68	13,74±4,47	0,446
Estradiol	81,32±66,92	35,72±27,37	<0,001
Leptin (pg/mL)	7498,76±4903,02	5737,41±3555,73	0,554*
sObR (ng/mL)	13,52±3,16	20,10±6,87	<0,001*
FLI (ng/mL)	0,672±0,664	0,351±0,28	0,087*
Adiponectina (µg/mL)	19,80±6,29	34,84±14,80	<0,001
PYY (pg/mL)	61,83±56,89	62,33±30,04	0,420

Los valores se expresan como media ± DE, AN: Anorexia nerviosa,

25-OH vit D: 25 Hidroxi-vitamina D, T3: Triyodotironina, sObR: receptor soluble de leptina, FLI: Índice de leptina libre

Prueba t de Student o prueba no paramétrica U de Mann Whitney, según corresponda,

*Modelo lineal general univariado corregido para el Z score IMC en las variables que tienen correlación con Z-Score de IMC en controles (C3, leptina, sObR y FLI).

Tabla 21. Correlaciones significativas con Z score de IMC en grupo control.

	Correlación Pearson	Significación bilateral
C3	0,335	0,034
Leptina	0,460	0,002
SOBR	-0,401	0,009
FLI	0,428	0,005

5. DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 Estado del sistema inmunológico

5.1.1 Células blancas y subpoblaciones linfocitarias

En el primer estudio de esta tesis exploramos las alteraciones en los glóbulos blancos y en el perfil de subpoblaciones linfocitarias de pacientes con AN de subtipo restrictivo o atracón/purga, así como en un grupo de pacientes con OTAIE, todos en su primer episodio del trastorno y con un corto período de evolución.

De acuerdo con nuestra hipótesis, las variaciones observadas en las distintas subpoblaciones linfocitarias se vieron influenciadas de forma diferente por la pérdida de masa corporal en los pacientes con AN. Entre todas las subpoblaciones linfocitarias analizadas las asociaciones con el Z score del IMC fueron significativas para el número de células naïve CD4 y para los linfocitos B, lo que parece reflejar un mecanismo con finalidad adaptativa para preservar la respuesta inmune específica (o adaptativa) en las condiciones autoimpuestas de restricción energética.

Nuestros resultados están de acuerdo con los trabajos anteriores que describen la leucopenia con linfocitosis relativa como la anomalía inmunitaria más frecuente en la AN (53,65,70) así como un recuento bajo de neutrófilos, monocitos y basófilos en relación con el grupo de control (121,199–201). Estos hallazgos son frecuentes y sería de considerar si están más o menos relacionados con las anomalías que a veces presenta, en su composición y función, la médula ósea de estos pacientes, siendo la principal alteración la

presencia de médula hipoplásica con depósito gelatinoso y atrofia de la grasa serosa (57,202).

El descenso del porcentaje y del número absoluto de linfocitos T CD8+ observada en las pacientes parece explicarse por la disminución significativa de los linfocitos T CD8+ de memoria. Varios autores han descrito previamente hallazgos similares en las células CD8+ en pacientes con AN (65,66,70,71); y particularmente Mustafa et al. (66) también reportaron una población disminuida de células CD8+ de memoria. Una disminución en la capacidad de las células dendríticas para expandir clones de células T de memoria podría explicar este hallazgo, según los resultados que también se han observado en modelos animales de inanición (203).

En contraste con la disminución de CD8 + y como hallazgo principal del primer estudio, se encontró un aumento en el porcentaje de CD4 + en nuestros pacientes, aumento que también se ha descrito en otros estudios de pacientes con AN (66,71,204). Este suceso podría considerarse como un intento exitoso de preservar el número absoluto de células CD4 + en condiciones de ingestas restringidas y reducido número de leucocitos. Así, el mantenimiento de los niveles de linfocitos CD4 + (en número de células) podría entenderse como un aspecto fundamental dentro del proceso de adaptación a bajas ingestas. En este sentido, Paszthy et al. también apuntaron en uno de sus estudios que determinados mecanismos reguladores competitivos en relación a las células CD4+ parecían contrarrestar el efecto de la restricción en AN (205).

Por otro lado, el mantenimiento de los niveles de linfocitos CD4+ podría también actuar como un factor clave que explica por qué los pacientes no sufren un mayor riesgo de infección como en las formas clásicas de desnutrición proteico-energética. Revisando la literatura vemos que también otros autores

en el pasado plantearon el hecho de que algún mecanismo compensatorio, concretamente un cambio cualitativo en la población de linfocitos, funcionaba en estas pacientes con anorexia nerviosa protegiéndolas de complicaciones infecciosas(69,204).

El aumento de los recuentos de células B en nuestras pacientes concuerda con la idea generalmente aceptada de que la inmunidad humoral está bien conservada en estas pacientes (53,206). Resulta importante destacar que este aumento solo se observó en el grupo ANR y parece estar relacionado con la pérdida de masa corporal, así como con el mecanismo adaptativo de linfocitosis relativa, ya que tanto los linfocitos totales como los linfocitos B se asocian negativamente con el Z score del IMC. Recordamos que en nuestro estudio no se encontró linfocitosis relativa en los grupos OTAIE o ANP, siendo el subtipo ANR el que presentaba menor IMC.

Del mismo modo, la relación negativa encontrada en nuestros pacientes entre el Z score de IMC y las células CD4 + CD45RA +, tanto en porcentaje como en número, sugiere que a medida que se reduce el peso corporal, la producción de linfocitos se prioriza sobre la de otras células inmunes y, en el caso de los linfocitos T, se da prioridad a las células T naïve colaboradoras. Esto podría ser un intento, como se comentaba al inicio, de preservar la eficacia de la respuesta inmune adaptativa en un estado de privación de alimentos.

Todo ello podría estar relacionado con el hallazgo de Omodei et al. (199) quienes observaron que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes con AN mostraban una menor actividad de sus principales vías de producción de energía que las de los controles. En este sentido sería interesante investigar si la prioridad en la producción de linfocitos tiene como objetivo compensar la disminución de la actividad metabólica.

Además, probamos la ocurrencia de este mecanismo de adaptación en las adolescentes más desnutridas comparando aquellas pacientes con valores de Z score de IMC $<-2DE$ ($n = 13$) con aquellas que mostraban el estado menos desnutrido (Z score de IMC $> -1DE$; $n = 12$). Este análisis mostró que las adolescentes más desnutridas tenían recuentos significativamente más altos de linfocitos y de células CD4 + CD45RA + que las adolescentes menos desnutridas (2438 ± 641 frente a 1928 ± 498 y 527 ± 286 frente a 338 ± 168 , respectivamente), y también se observó una tendencia hacia un mayor porcentaje de CD4 + CD45RA + ($P = 0,065$).

Considerando el aumento de los recuentos de células B y la linfocitosis relativa que se lleva a cabo sobre todo en los pacientes con bajo peso corroboramos el hecho que se ha propuesto con anterioridad en la literatura de que en estas pacientes con AN se llevan a cabo mecanismos de compensación particulares, que no se observan en las formas clásicas de malnutrición.

La desnutrición, malnutrición o deficiencias nutricionales individuales en sus formas típicas, son causas importantes del funcionamiento deficiente del sistema inmune y son las principales responsables de la disminución significativa de la inmunidad celular (51). Conduce a la desregulación de la respuesta del huésped a la infección, normalmente coordinada, y de ese modo aumenta la virulencia de los patógenos (207). Curiosamente, como se ha mencionado, los pacientes con AN parecen estar inesperadamente protegidos de infecciones incluso cuando existe leucopenia y a pesar de su estado de desnutrición (208,209). Todo ello llevó a pensar, ya tiempo atrás, que el sistema inmunológico en AN muestra características diferentes al de otras formas de inanición (68).

Está generalmente admitido que en ambas condiciones la inmunidad mediada por células está alterada mientras que, como vimos anteriormente, en pacientes con AN desnutridas las células B y la inmunidad humoral parecen conservarse mejor (55,63,66,68). Mientras que en la malnutrición típica suelen encontrarse niveles disminuidos de células B circulantes (210) en anorexia nerviosa los recuentos de células B se encuentran conservados (53,206) o aumentados como se ha observado en este estudio.

Por otro lado, en relación a la inmunidad mediada por células, parece que también existen algunas diferencias con la malnutrición clásica, como hemos podido probar en el presente trabajo. La proliferación de células T en anorexia nerviosa se ha descrito intacta (69)(50), incluso potencialmente mejorada en relación a controles (211). La priorización en la producción de linfocitos CD4 sobre los CD8 conlleva un aumento de las proporciones de CD4 / CD8 en la anorexia nerviosa en comparación con la desnutrición primaria. El *ratio CD4/CD8*, es aceptado como un indicador del estado nutricional que se ha encontrado disminuido en niños desnutridos con kwashiorkor (212) y otros casos de malnutrición (213,214).

En resumen, la priorización en la producción de linfocitos T colaboradores naïve junto con el aumento en el recuento de células B son dos ejemplos que reflejan el estado atípico de malnutrición y los mecanismos de compensación que se llevan a cabo en estas pacientes para preservar el número de linfocitos y, probablemente, en un intento por preservar la eficacia del sistema inmunológico adaptativo.

5.1.1.1 *Diferencias por subtipos diagnósticos*

En nuestro trabajo ANP y ANR mostraron mecanismos adaptativos similares en relación a las subpoblaciones linfocitarias en el contexto de la disminución de leucocitos. Del mismo modo que en ANR, sólo las células NK y las células T citotóxicas de memoria disminuyeron en ANP; sin embargo, la disminución del número de células citotóxicas de memoria fue más significativa en ANP que en ANR. Asimismo, Nagata et al. (71) encontraron una disminución significativa de los recuentos de CD8+ en 6 pacientes con ANP en comparación con los controles y una tendencia similar no significativa en 7 pacientes con AN de tipo restrictivo.

Es importante recordar que estamos tratando de enfermedades mentales, en las cuales los patrones de conducta alimentaria están alterados de modo diferente según el subtipo diagnóstico. Las manifestaciones clínicas y los efectos producidos sobre el peso corporal y el estado nutricional dependen ampliamente de si la forma es restrictiva o purgativa (106).

El efecto del vómito en las subpoblaciones linfocitarias también ha sido analizado, demostrando que los vómitos como estrategia de purga se asocian con un efecto más deletéreo sobre las células T (72). La adquisición de hábitos compensatorios de purga podría estar funcionando como una tensión añadida en un organismo ya sometido a un fuerte estrés físico y mental (206).

Las células NK de los pacientes con OTAIE están menos significativamente disminuidas que las de ambos subtipos de AN, sin embargo, al no detectarse en ellas la linfocitosis relativa, se observa un menor número de células totales CD45+CD3+ (linfocitos T maduros) frente a controles, que podría deberse a que son pacientes con una sintomatología menos definitiva.

La gravedad de la desnutrición, así como el tiempo de evolución de la enfermedad podrían ser factores importantes que expliquen la variabilidad observada, ya que los OTAIE son, en nuestra muestra, pacientes que presentan periodos de evolución relativamente más cortos que el resto de grupos, sin embargo, no es fácil establecer conclusiones al tratarse de un grupo de reducido tamaño y heterogéneo.

De manera similar, el bajo número de pacientes con ANP en comparación con ANR podría considerarse como otra limitación en este estudio; sin embargo, ésta fue una muestra de conveniencia y refleja la disparidad en la incidencia de ambos subtipos en el primer episodio. A pesar de ello, los resultados que muestran una prioridad en la producción de células T naïve fueron comunes a ambos subtipos de TCA, y surge la pregunta de si este mecanismo destinado a preservar la respuesta inmune adaptativa se mantiene en aquellos pacientes con mayor duración de la enfermedad y tratamientos fallidos. Es de esperar que futuros trabajos con los datos de seguimiento de las evaluaciones inmunitarias realizadas en esta población de estudio resuelvan esta limitación y añadan información sobre la utilidad de estos parámetros inmunológicos como biomarcadores de la evolución de la enfermedad.

No se observó influencia del Z score del IMC en la subpoblación de células NK en nuestro estudio, ni tampoco se observó en el porcentaje de eosinófilos. Sin embargo, el porcentaje de eosinófilos sí que parece estar influenciado por el subtipo diagnóstico. ANP mostró valores superiores a ANR, pero no está claro si esto podría relacionarse con la prevalencia de alergia por grupos, que fue del 33%, 18% y 17% en los subtipos OTAIE, ANP y ANR, respectivamente.

5.1.2 Citoquinas

Algunos autores han señalado la importancia de la participación de las citoquinas en la patogenia de los TCA (74), sin embargo, los resultados descritos en la bibliografía no muestran total consistencia, como ya ha quedado descrito anteriormente, por lo que uno de los objetivos planteados fue analizar diversas de estas citoquinas en pacientes de primer episodio, concibiendo como resultado más probable, el encontrarlas alteradas, a semejanza de lo descrito en otros grupos de AN estudiados por otros autores. Sin embargo, los resultados de las citoquinas en nuestro segundo estudio no apoyan un estado proinflamatorio basal en las pacientes estudiadas, lo que contrasta con algunos hallazgos previos que describían niveles plasmáticos elevados de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α) en pacientes con AN (75,76,215).

En el presente trabajo encontramos valores más bajos de TNF α en pacientes que en controles. Por el contrario, la activación del eje del TNF- α y una correlación negativa con el IMC y la duración de la enfermedad se han observado en un grupo heterogéneo de pacientes con AN (216). Por ello, sugerimos que la regulación precisa de las citoquinas proinflamatorias al inicio de la enfermedad y durante el primer episodio es diferente en comparación con su estado en pacientes con enfermedad de mayor duración. Sin embargo, el grupo estudiado de pacientes con AN es de pequeño tamaño, si se tiene en cuenta la gran variabilidad interindividual de las citoquinas plasmáticas. Así, un análisis de potencia posterior mostró solo una potencia estadística del 63% (error $1-\beta = 0,63$) para las diferencias observadas en TNF- α , por lo que este resultado no pudo tomarse como definitivo y sería necesario un estudio de confirmación.

En cuanto a la IL-2, los resultados apuntan hacia una producción conservada, lo que contrasta con otros resultados de la literatura que describen niveles séricos disminuidos (217) o una respuesta disminuida a un estímulo (218). Nuestros resultados podrían estar relacionados con el hecho de que, a pesar del menor número de leucocitos, los linfocitos T CD4 + en este grupo de pacientes con enfermedad de corta duración no fueron menores que en los controles (219).

La tendencia hacia IL-1 β elevada podría ser un signo temprano de la alteración de la regulación del eje suprarrenal. La comunicación entre el eje HPA y la inmunidad mediada por células parece estar alterada en estos pacientes (220). En este sentido, sabemos que el funcionamiento del sistema inmunológico está controlado por el sistema neuroendocrino. Durante el curso de la AN los pacientes experimentan importantes cambios endocrinos, desequilibrios hormonales graves en particular en lo que respecta a la secreción de hormonas sexuales y cortisol, junto con otras alteraciones en la producción de neurotransmisores que provoca en su conjunto cambios incontrolados en el sistema inmunológico (49,221,222).

Además, se sabe que algunos problemas que con frecuencia coexisten con la AN, como la depresión, el estrés o la existencia de acontecimientos vitales estresantes (100,223–225), tienen un impacto adverso en la función inmunitaria, y es difícil separar sus efectos. Es probable que el impacto de estos procesos, u otros, derivados del ajuste fisiológico secundario al trastorno de alimentación, confunda la evaluación de las anomalías en el sistema inmune.

Vemos pues, como los factores inmunoendocrinológicos parecen jugar un papel importante en la etiopatogenia y el curso de la enfermedad. La comunicación entre el sistema nervioso, endocrino e inmunológico estaría alterada y la

implicación de mediadores como cortisol, leptina, adiponectina y citoquinas en la comunicación entre sistemas parece tener mucha relevancia en la AN (49).

5.2 Otros mediadores:

5.2.1 Cortisol

En relación al cortisol, en este trabajo se ha observado una concentración elevada en la etapa aguda del trastorno, hecho que otros autores han observado también previamente en pacientes adolescentes con AN (83,114), y ha sido recogido también en una revisión actual (226). El estado hipercortisolémico de nuestros pacientes podría también estar evidenciando las alteraciones en la regulación del eje suprarrenal. En este sentido, Limone et al, encontraron al estudiar un grupo de pacientes con AN una correlación positiva entre la producción de IL-1 β y el cortisol, lo cual ponía de manifiesto que el sistema de retroalimentación entre las citoquinas y el cortisol podría estar alterado en estos pacientes (83).

Por otro lado, la relación inversa entre el cortisol y el Z-Score IMC encontrada en nuestro segundo estudio, sugiere una respuesta del cortisol a la desnutrición, que también fue observada por Misra et al. (114). Como señalan estos y otros autores, se ha podido observar que en pacientes desnutridas con AN, las elevadas tasas de secreción del cortisol y reducidas tasas metabólicas determinan un aumento de la vida media del cortisol. Todo ello se puede considerar como un mecanismo adaptativo para mantener la euglucemia y movilizar energía para funciones vitales en un estado de baja disponibilidad energética (7,101,114).

Finalmente resulta importante recalcar el papel del cortisol como mediador en la respuesta al estrés. La hipercortisolemia está asociada con el miedo excesivo y en este sentido, algunos autores piensan que el miedo intenso observado en pacientes con AN podría en cierto modo explicarse por los elevados niveles de cortisol (227,228).

5.2.2 Adipocitoquinas

En pacientes con anorexia nerviosa la grave pérdida de peso, principalmente a expensas del tejido adiposo, viene acompañada de profundas alteraciones en las adipocitoquinas (144).

La leptina es una ya bien conocida hormona anorexigénica, que correlaciona estrechamente con el IMC (130) y que actúa como uno de los principales indicadores de las reservas de energía existentes (229). Como era de esperar, la concentración sérica de leptina se encontró muy alterada en los pacientes estudiados con AN. En el segundo estudio, los resultados mostraron valores de leptina 81% más bajos que en sus controles emparejados, de modo similar a la reducción observada en el tercer estudio (66% en el subgrupo leve y 86% en el subgrupo grave). Lo que está de acuerdo con los resultados basales de numerosos estudios realizados en AN (127,131–135,230).

En AN, la concentración de leptina juega un papel clave a nivel neuroendocrino en el proceso de adaptación a la desnutrición, siendo de un modo determinante responsable de los cambios producidos en estos ejes (136). La reducción del tejido adiposo produce un descenso en los niveles de leptina, de forma que cuando descienden por debajo de un umbral crítico actúan a modo de gatillo endocrino desencadenando una serie de respuestas encaminadas a disminuir el

gasto energético y movilizar las reservas de energía necesarias (133,229,231–233).

En este sentido, cabe mencionar también el papel del sObR en la homeostasis energética mediante la regulación de la biodisponibilidad de la leptina (234). Los estudios *in vivo* (235) e *in vitro* (236) han demostrado que el sObR inhibe la unión de la leptina a los receptores de la superficie celular, neutralizando la señalización de STAT3 mediada por leptina y las respuestas anorexígenas *in vivo*.

El FLI definido como la proporción de leptina respecto a sObR (237) proporciona una medida más certera de la leptina libre. Los niveles de sObR son indicadores de la biodisponibilidad de la leptina (238), y el FLI es un determinante más preciso de la acción final de la misma (131). El aumento de sObR y la disminución de FLI concuerdan con estudios previos (131,239–241).

Resulta interesante destacar la correlación altamente significativa encontrada en nuestro segundo estudio entre cortisol y sObR, que está de acuerdo con los hallazgos de Misra et al. , en su estudio longitudinal realizado en un grupo de adolescentes de media de 16 años que partían de un IMC medio de 16,7 kg/m². También encontraron que el cortisol fue el predictor más importante de los niveles de sObR en un análisis de regresión múltiple realizado con el grupo de pacientes con AN (131). Chan et al. hallaron una correlación positiva entre el cortisol y los niveles de sObR en adultos sanos sugiriendo que el eje adrenal y la secreción de leptina están interrelacionados (242). En este sentido, Koutkia et al. observaron en su estudio sincronidad en la dinámica de los pulsos de secreción de leptina y cortisol en hombres sanos, lo cual según los autores sugería una relación entre estas dos hormonas, que en su estudio resulta independiente de los cambios de la grasa corporal (242,243). Todo lo descrito refuerza la necesidad de desentrañar el papel del sObR en la regulación de la

función de la leptina y en las interacciones entre las secreciones de leptina y cortisol en pacientes con AN.

Otra importante adipocitoquina que fue analizada en nuestro segundo y tercer estudio fue la adiponectina. Se trata de una hormona derivada de los adipocitos, que aumenta notablemente la sensibilidad a la insulina y que tiene propiedades antiaterogénicas y antiinflamatorias (244). A pesar de ser una hormona bien estudiada en pacientes con AN los datos publicados muestran elevada variedad en los resultados, siendo a veces contradictorios (137,139,245). En nuestro segundo estudio encontramos que los niveles de adiponectina fueron significativamente más altos (65% más altos) en el grupo AN en comparación con los controles emparejados y 80% más altos en el estado basal de nuestro tercer estudio. Estos resultados están de acuerdo con la mayoría de los trabajos hechos en pacientes con AN (127,143,145,246–250). Contrariamente, otros autores encontraron en estudios realizados en mujeres con AN extremadamente desnutridas niveles de adiponectina más bajos (141) o iguales (131,140,251) que los de controles.

Cuando se consideraron por separado los subtipos de AN, encontramos que los niveles de adiponectina eran más altos en el subtipo restrictivo (ANR) en comparación con los controles; sin embargo, la diferencia no fue significativa entre los pacientes del subtipo de purgativo (ANP) y su grupo de controles emparejados, probablemente debido al pequeño número de pacientes en este grupo. Dos estudios anteriores encontraron niveles más altos de adiponectina en ambos subgrupos en comparación con los controles, pero resultados discrepantes en relación a los niveles séricos de adiponectina entre el subtipo restrictivo y el purgativo. Mientras que Housová et al. encontraron mayores niveles de adiponectina en el subgrupo restrictivo comparado tanto con controles como con el subgrupo purgativo, Nogueira et al. reportaron niveles de

adiponectina más elevados en el subgrupo purgativo. Probablemente las discrepancias entre estos dos estudios estén relacionadas con el alto nivel de malnutrición que presentaban las pacientes del subgrupo purgativo en este último estudio, con un IMC de media de 13,8 kg/m² (246,251).

A pesar de que el papel fisiológico y la relevancia de los altos niveles de adiponectina en AN aún no se han establecido por completo, la hiperadiponectinemia parece jugar un papel importante en el uso eficiente de energía y en el mantenimiento de la homeostasis energética (147,252). La concentración de adiponectina está inversamente relacionada con la cantidad de grasa corporal y en AN, la extrema reducción del tejido adiposo parece ser la causa principal del aumento en los niveles de adiponectina (137,253). Sin embargo, la disminución del tono simpático y el aumento que se produce en situaciones de déficit energético de tejido adiposo proveniente de la médula ósea parecen influir también en el aumento de la concentración de adiponectina. A diferencia de lo que sucede con el tejido adiposo blanco el tejido adiposo de la médula ósea aumenta durante la restricción calórica. Cawthorn et al. observaron que en situaciones de restricción calórica la secreción de adiponectina producida por el tejido adiposo proveniente de la médula ósea era mayor que del tejido adiposo blanco, sugiriendo que el tejido adiposo de la médula ósea podía identificarse como un órgano endocrino que contribuía significativamente al aumento de adiponectina sérica en periodos de restricción calórica (144,202,254,255) Por otro lado, solo en determinadas circunstancias se han encontrado correlaciones negativas significativas entre la adiponectina y el IMC (127,145) que parecen surgir en grupos de pacientes con AN que presentan alta heterogeneidad interindividual en términos de IMC, duración de la enfermedad, etc. Así, en nuestras pacientes no hemos encontrado correlación entre Z score del IMC y adiponectina. Se ha sugerido

que una combinación de factores, que incluyen la masa grasa y los retrasos temporales en la respuesta de la adiponectina a los cambios en la composición corporal, podría explicar la variabilidad de la adiponectina (248). La etapa temprana de diferenciación y desarrollo de los adipocitos se caracteriza por un aumento en la expresión del gen de la adiponectina, mientras que los adipocitos envejecidos muestran una expresión reducida. Parece ser que el aumento de peso inicial en los pacientes con AN podría estar asociado con una mayor proporción de adipocitos jóvenes frente a los viejos, lo que resulta en un aumento de la adiponectina, mientras que los aumentos posteriores de peso se asociarían con una hipertrofia de los adipocitos que llevaría a una disminución de los niveles de adiponectina (256)

5.2.3 Limitaciones del segundo estudio

Este estudio tiene algunas limitaciones que deben tenerse en cuenta. En primer lugar, el número de pacientes es pequeño y, sobre todo, insuficiente para sacar conclusiones en el grupo de pacientes con AN tipo purgativo. Dado que las pacientes fueron incluidas tal como fueron remitidas a la unidad de TCA del hospital, la muestra refleja la disparidad que normalmente se encuentra en la incidencia de subtipos en el primer diagnóstico de AN. La utilidad de los resultados que se muestran aquí también está limitada por la naturaleza transversal del estudio, por ello el tercer estudio de esta tesis se desarrolló teniendo entre sus objetivos la intención de abarcar este aspecto y poder investigar la evolución de estos y otros parámetros en respuesta al tratamiento. Otra limitación de este estudio es la acción que algunos de los fármacos indicados a las pacientes ejercen sobre el sistema inmune, especialmente en el caso de las citoquinas. Futuros análisis incluyendo la presencia o no de medicación podrían solventar esta limitación.

5.3 Biomarcadores en el análisis longitudinal

En el segundo trabajo se analizaron citoquinas, mediadores del eje HPA y adipocitoquinas en T0. En este tercer trabajo se ha llevado a cabo un estudio de la evolución longitudinal de algunos de los mencionados parámetros, estudiados en T0 y de otros nuevos, con la intención de evaluar su posible papel como biomarcadores del curso de la patología, adicionales al IMC.

A día de hoy existe un destacado interés en el contexto de la AN por identificar nuevos parámetros que complementen al IMC como principal biomarcador. Profesionales que trabajan con pacientes con AN señalan el hecho de que en múltiples ocasiones pacientes que todavía muestran importantes alteraciones orgánicas y psiquiátricas, presentan analíticas normales (96,153). Los parámetros antropométricos en muchas ocasiones no evidencian desnutriciones subclínicas o importantes alteraciones orgánicas. A todo esto se añaden las dudas que varios autores plantean sobre la idoneidad del uso de IMC como único biomarcador a la hora de estratificar el riesgo. En este sentido, varios estudios sugieren que el IMC por sí solo puede no ser una medida ideal de la gravedad de la enfermedad para la anorexia nerviosa, y proponen que otras variables clínicas y funcionales sean probadas para determinar su utilidad pronóstica durante el curso de la enfermedad (162)(169) (166).

En relación con esta necesidad, en el tercer estudio de esta tesis investigamos los parámetros bioquímicos, inmunológicos y hormonales, así como las adipocitoquinas que hemos considerado más relevantes, estableciendo grupos de severidad en las pacientes (leves-graves), y a la vez estudiamos su evolución tras doce meses de tratamiento.

Todos los parámetros evaluados en el estudio actuaron como marcadores de enfermedad en la fase inicial (con excepción de la albúmina) y en ambos grupos de gravedad. La evolución de estos marcadores fue diferente a lo largo de los doce meses de tratamiento. Mientras que el grupo de marcadores bioquímicos e inmunológicos (excepto la ferritina) parecen recuperarse y tomar valores normales después del tratamiento, los marcadores hormonales, adipocitoquinas y otros péptidos reguladores continúan presentando importantes diferencias respecto del grupo control a pesar de la importante recuperación ponderal que se llevó a cabo (77% de las pacientes al final del tratamiento presentan $P > 15$). Estas importantes diferencias respecto a controles en T12 en relación a los marcadores indicados son muy semejantes en pacientes provenientes de ambos grupos de severidad, a pesar de que las pacientes con origen leve en T12 presentan una mayor recuperación ponderal y están cerca de dejar de mostrar diferencias en cuanto al Z score del IMC respecto de controles, lo cual parece poner de manifiesto la persistencia de alteraciones nutricionales y metabólicas en pacientes provenientes de este grupo.

La ferritina, el complemento C3, el cortisol, la leptina, el sObR y el FLI fueron identificados como marcadores de severidad en T0, momento en el cual las diferencias ponderales entre grupos fueron mayores.

5.3.1 Indicadores bioquímicos del estado nutricional

La ferritina y el factor C3, importantes indicadores del estado nutricional, muestran diferente evolución longitudinal. Mientras que los valores de la proteína de complemento C3 parecen recuperarse muy bien y asemejarse a los de los controles en T12, la ferritina continúa siendo elevada, especialmente en aquellos pacientes que provenían del grupo severo.

Varios trabajos realizados en pacientes con AN han encontrado, al igual que nosotros, bajos niveles basales de la proteína C3 (54,95,96,177,257,258). Entre las causas que se barajan para explicar la baja concentración de esta proteína se destaca la deficiente producción por parte del hígado, y el descenso por activación crónica debido a infecciones recurrentes (95,259).

Mas allá de su papel clave en la inmunidad, este factor también ha sido propuesto como un buen marcador del estado nutricional. De hecho, en varios estudios longitudinales realizados en pacientes con AN se ha observado que los niveles de proteína C3 correlacionaban con el estado nutricional de las pacientes, aumentando con la recuperación de peso (96,258). Así mismo, se ha visto que los cambios en los depósitos de tejido adiposo afectan a las concentraciones de C3 en pacientes con AN. En nuestro caso, no pudimos estudiar la correlación al no disponer de medida o estimación del porcentaje de masa grasa, pero pudimos observar que la recuperación ponderal que llevaron a cabo nuestras pacientes (77% de pacientes con IMC en $P > 15$) fue suficiente para normalizar los valores de C3. Varios autores han propuesto esta proteína como biomarcador, no solo del estado nutricional de las pacientes al ingresar para tratamiento, sino también para el posterior seguimiento de su evolución (94,96). En este sentido, Nova et al. sugieren que el descenso de los valores de C3 y C4 que observaron en su estudio durante el seguimiento tendría que ver con una vuelta a los hábitos restrictivos en algunas pacientes (94).

Resulta interesante considerar también el papel que ha pasado a tomar la proteína C3 como agente multifactorial, debido a su participación en multitud de funciones metabólicas complejas (260,261), (95). En este sentido, ya White et al. en 1992 comenzaron a sugerir la existencia de un importante vínculo entre metabolismo e inmunidad al observar que el tejido adiposo es un destacado lugar de producción de algunos de los componentes del complemento (260). En

los últimos años se está investigando activamente el papel que el complemento puede tener en procesos de homeostasis, degeneración y regeneración de tejidos (262,263). Por ejemplo, en el tejido óseo, además de participar en los procesos inflamatorios y la degeneración del hueso en enfermedades como artritis reumatoide y osteoartritis, el complemento participa en el desarrollo, crecimiento y homeostasis normal del hueso (264). El tejido óseo está afectado de forma importante en AN, y frecuentemente presenta alteraciones que pueden llegar a ser permanentes ((101,265,266).

Todo ello podría añadir valor a este parámetro como biomarcador a la hora de monitorizar el éxito del tratamiento o la progresión de la enfermedad en AN, aunque la relevancia de los niveles de C3 en suero para las funciones de homeostasis de tejidos no ha sido aún establecida.

Contrariamente a lo que sucede con el factor C3, los valores de la proteína ferritina se mostraron todavía alterados pasados doce meses. Este marcador de severidad en T0 presentaba valores marcadamente elevados en ambos grupos, con una elevación del 312% en el grupo grave. Coincidiendo con nuestras observaciones, otros trabajos también encontraron niveles elevados de esta proteína en pacientes con AN (170,171). Varias son las teorías que explican el aumento de los niveles de ferritina en pacientes con AN y desnutrición. Algunos trabajos proponen que la disfunción de los hepatocitos inducida por la desnutrición sea la causante del aumento en los niveles de ferritina (170,173,174). Hearnshaw et al. apuntaban a la supresión de la actividad de la médula ósea con el consiguiente aumento de los depósitos de hierro (267). Sin embargo la teoría más aceptada parece ser la que señala el contexto catabólico como responsable del aumento de los valores de ferritina (172,268,269).

El IMC parece ser muy influyente en la variación de los niveles de ferritina. En este sentido, varios estudios muestran disminución de los valores de esta proteína tras la recuperación ponderal y nutricional (94,153,172–174), coincidiendo con las observaciones del presente trabajo. Sin embargo, a pesar del descenso en los niveles, nuestras pacientes siguen mostrando diferencias frente al grupo control en T12 en aquellas que provenían del subgrupo grave. En nuestra opinión y de acuerdo con otros autores, esto evidencia el papel de la ferritina como un buen marcador de desnutrición, además de potencial indicador de la persistencia de alteraciones metabólicas y nutricionales en casos graves de la enfermedad (94,170,172,268).

Es de destacar que otros trabajos también han resaltado la sensibilidad de este parámetro para mostrar su elevación en casos no especialmente graves, lo cual también se aprecia en nuestros resultados. Esta proteína parece mostrarse alterada en analíticas de rutina, en las que el resto de valores presenta valores medios dentro del rango de referencia (153,171). Es preciso tener en cuenta a la hora de interpretar resultados en relación a esta proteína, que se trata de un reactante de fase aguda que se encuentra elevado en condiciones tales como: daño hepático, neoplasia, infección, inflamación e insuficiencia renal (270); situaciones que pueden ser comunes en pacientes con AN (173) y han de tenerse en consideración.

La transferrina, un indicador bioquímico clásico del estado nutricional que se encuentra normalmente disminuido en pacientes con AN (258,271) también destacó en T0 como marcador de enfermedad en ambos grupos de estudio; sin embargo, únicamente muestra una tendencia a la significación como marcador de severidad. De acuerdo con la literatura, los valores se normalizan con la renutrición y recuperación del peso (65,94). En nuestro caso, a diferencia de lo hallado con la ferritina, éste parece comportarse como un marcador de menor

sensibilidad para indicar las posibles alteraciones nutricionales que pueden aún estar presentes tras 12 meses de tratamiento.

5.3.2 Hormonas

El cortisol, hormona que aparece como marcador de severidad en T0, muestra altos valores en el grupo de pacientes graves, coincidiendo con los más bajos IMCs, de igual modo que observaron Misra et al. en su trabajo (114). Los altos valores de cortisol y la desregulación del eje hipófisis adrenal (272) podrían suponer un intento por mantener la euglicemia y movilizar energía para funciones vitales (273), aunque podrían explicarse también por la influencia de otros factores como el estrés presente en pacientes graves y las consiguientes anomalías en los neurotransmisores centrales. Tras los doce meses de tratamiento integral, la recuperación nutricional y ponderal, así como la estabilización de otros parámetros anteriormente mencionados produce una normalización de los valores del cortisol en aquellas pacientes que provenían del grupo grave.

Los otros dos parámetros hormonales evaluados son T3 y estradiol. La hormona tiroidea tiene un papel fundamental en la regulación del gasto metabólico, y los niveles de T3 en suero correlacionan con el gasto energético en reposo (GER) (274). En este sentido, niveles bajos de T3 son interpretados en individuos con bajo peso como una adaptación a esta situación de desnutrición (275). Nuestros resultados muestran, en línea con estudios anteriores, niveles bajos de T3 comparado con controles en T0 (110,115). Los valores son inferiores en el grupo grave, aunque la diferencia no es significativa.

En AN, el GER parece inferior a lo esperado en función del peso (276), lo que parece indicar que la reducción del GER forma parte de los mecanismos de

adaptación al estado de malnutrición. De forma interesante, Onur et al. mostraron, en un grupo de pacientes con AN, cómo el aumento del GER tras un periodo de renutrición de cuatro meses era explicado fundamentalmente por el aumento en los niveles de T3, independientemente del aumento en peso magro, que es el principal determinante del GER (277). Igualmente, Aschettino-Manevitz et al. observaron importantes correlaciones entre T3 y el GER medido a través del porcentaje del gasto energético esperado en reposo (% GEER), destacando su posible utilidad como biomarcador en el contexto clínico a la hora de evaluar la supresión y recuperación metabólica (178).

En el estudio de Onur et al. (2005) (277), los valores tanto de T3 como de gasto metabólico basal aumentaron con la renutrición sin llegar a los niveles de T3 del grupo control. Kiyohara et al. también observaron un aumento de T3 con la renutrición que tampoco alcanzaba los niveles de controles (278). De manera similar, nuestros resultados muestran cómo en T12, los niveles de T3 permanecen bajos en comparación con los valores normales del grupo control. Estadísticamente, la diferencia es significativa sólo para el grupo leve, pero los valores de leves y graves son muy similares, por lo que parece que el hecho de que el grupo leve muestre diferencias significativas con controles y el grave no se debe fundamentalmente al mayor número de muestra de este grupo. Es interesante señalar que en el subgrupo de pacientes con un IMC saludable en T12, los niveles de T3 corregidos por el IMC dejan de mostrar diferencias con el grupo control, lo que indica que la función tiroidea en este subgrupo de pacientes parece haberse normalizado.

En pacientes con AN la baja disponibilidad de nutrientes comúnmente resulta en hipogonadismo-hipogonadotrófico de origen hipotalámico, que a su vez deriva en bajos niveles de estradiol (103,279). Varios autores describen bajos niveles de esta hormona en pacientes con AN en comparación con controles

(110,121,280), resultados que coinciden con lo observado en nuestro estudio a nivel basal.

Tras doce meses de tratamiento, en nuestro estudio, los valores en T12 se recuperan hacia valores normales, pero siguen estando por debajo de los niveles de controles en pacientes provenientes de ambos grupos, con una diferencia entre los grupos que deja de ser significativa contrariamente a lo que sucede en T0. Además, en el caso del estradiol, a diferencia de lo que ocurre con T3, la comparación llevada a cabo entre el grupo control y el grupo de pacientes que habían alcanzado un IMC “saludable” sigue mostrando diferencias muy significativas, lo cual sugiere que podrían persistir factores asociados a la enfermedad a pesar de la importante recuperación ponderal. Estos factores podrían estar relacionados con mecanismos adaptativos puestos en marcha en un estado de baja disponibilidad de energía, como consecuencia de la pérdida de peso y la inanición, y tendrían como fin disminuir la tasa metabólica y optimizar el gasto energético para conservar la energía para las funciones vitales (112,281).

En línea con nuestro trabajo Van Binsbergen et al. tampoco describieron una recuperación en los niveles de estradiol tras un tiempo variable de renutrición de 8 a 20 meses en un grupo de 20 mujeres que mostraban muy bajos niveles de estradiol al inicio del estudio (108).

Aparte de su papel en el eje hipotálamo hipófisis gonadal la literatura describe importantes influencias de esta hormona sobre otros sistemas, siendo el estradiol un ejemplo claro de las complejas interacciones que se llevan a cabo en AN. Esta hormona juega un papel fundamental en el mantenimiento del músculo y de la masa ósea. Pacientes con AN con frecuencia padecen problemas asociados a una reducción de la DMO (114). Además, se sabe que el estradiol

modula procesos centrales de péptidos tanto saciantes como orexigénicos (282). Por último, la deficiencia de esta hormona se relaciona también con el empeoramiento de síntomas como la ansiedad y la depresión, características bien conocidas de la AN (283,284).

5.3.3 Leptina, sObR y FLI

Los marcadores de severidad en TO, leptina, sObR e índice FLI muestran valores alterados al comparar con controles en ambos grupos y ambos momentos del estudio a pesar de la considerable recuperación ponderal.

Diferentes estudios longitudinales realizados en pacientes con AN han querido investigar cómo varían los niveles de leptina y sObR con la renutrición. En varios de ellos se ha observado, coincidiendo con lo encontrado en el presente trabajo, que con el aumento del IMC se producía una disminución de los niveles de sObR (131,239) y un aumento de los valores de leptina (131,132,160,233,285).

Kratzch et al. observaron en un grupo reducido de 13 adolescentes con AN que tras aproximadamente 7 meses de tratamiento y después de una recuperación de peso de una media de 6 kg se producía un aumento significativo de los valores de leptina y un descenso también significativo en los valores de sObR respecto de los valores iniciales (239). Los cambios en ambos parámetros resultaron especialmente obvios en aquellos pacientes que presentaban una marcada desnutrición al inicio del estudio. De modo similar, Misra et al. describieron en un estudio longitudinal de doce meses de duración, niveles basales altos y bajos de sObR y leptina, respectivamente, en un grupo de 23 adolescentes frente a controles. Tras el periodo de renutrición aquellas pacientes que habían aumentado un 10% su IMC mostraban valores normales frente a controles en ambos parámetros mientras que aquellas que no habían

recuperado el 10% del IMC continuaban mostrando diferencias respecto a controles en ambas variables (131). En nuestro caso, tras doce meses de tratamiento continuamos observando niveles bajos de leptina y FLI así como altos niveles de sObR al comparar con controles.

Resulta esencial considerar al hablar de la evolución de estos tres parámetros, la importante asociación que presentan con el IMC. De hecho, en el caso de la leptina, el IMC y la proporción de grasa corporal son los principales predictores de su concentración (131). La existencia de importantes diferencias entre el IMC de las pacientes y los controles tanto en tiempo inicial como al cabo de 12 meses constituye un hecho fundamental a la hora de interpretar las diferencias entre grupos y con controles ya que sabemos que una proporción relevante de las diferencias observadas son debidas a las diferencias en el IMC.

Stroe-Kunold et al. en su trabajo con pacientes con AN también explicaron de este modo las diferencias observadas en la concentración de leptina respecto al grupo control, pues tras el tratamiento y la renutrición el IMC continuaba siendo significativamente menor que en el control a pesar de que también se había producido una importante recuperación de peso (160).

En nuestro caso quisimos profundizar en la evaluación de la influencia del IMC sobre la leptina, sObR y FLI y para ello realizamos una comparación al final del tratamiento entre pacientes con IMC “saludable” vs. grupo control corrigiendo el efecto del IMC. Como resultado, tras la corrección, los niveles de leptina no mostraron diferencias con el grupo control. Este hecho nos llevó a interpretar que las diferencias observadas en la concentración de leptina eran debidas principalmente a las diferencias en el IMC entre pacientes y controles.

Contrariamente, y como uno de los principales hallazgos de este tercer estudio, la comparación de los niveles de sObR entre pacientes “saludables” y controles

sí mostró diferencias tras la corrección por el IMC, lo que nos induce a pensar que otros factores diferentes del IMC pueden ser responsables de las diferencias observadas.

En el caso del sObR sabemos que la composición corporal y los niveles de leptina son sus principales predictores (242,286,287). Sin embargo, aunque la masa grasa tiene un papel importante, no parece ser tan determinante como en el caso de la leptina. En este sentido, Misra et al. 2004 observaron en un grupo de jóvenes adolescentes con AN que los cambios en la masa grasa contribuían en un pequeño grado, (únicamente al 20%) a la variabilidad de sObR. Esto ponía de manifiesto que otros factores distintos de la masa grasa, particularmente el cortisol, resultaban ser determinantes de los niveles de sObR; hecho que va en línea con los resultados obtenidos en nuestro segundo estudio, que mostraban una importante correlación entre los valores de sObR y cortisol. En este sentido, actualmente existe un interés creciente por mejorar la comprensión a cerca de los mecanismos reguladores de la producción del sObR así como de los factores distintos del IMC que pueden resultar determinantes en su regulación (288).

El sObR regula la biodisponibilidad de la leptina determinando su acción final. Variaciones en los niveles de este parámetro influyen directamente en la acción final de la leptina, ya que como se ha descrito más arriba, el sObR inhibe la unión de la leptina a los receptores de la superficie celular, neutralizando la señalización intracelular por leptina y las respuestas anorexígenas in vivo (234–236), con lo que se convierte en un paso más de control de estas respuestas, además de la producción de la propia hormona. En este trabajo hemos podido comprobar como en la fase inicial el descenso frente a controles de los valores del FLI era mayor que el observado en los niveles de leptina (93% y 88% respectivamente), de modo similar a lo que observaron Misra et al. en su grupo de pacientes con AN (84% de disminución del FLI vs 72% en leptina total) (131).

Así pues, el sObR parece estar mediando en los procesos de adaptación a la desnutrición y en los cambios neuroendocrinos poniendo de manifiesto la persistencia, después de 12 meses de tratamiento, de mecanismos de compensación en los ejes neuroendocrinos a pesar de presentar las pacientes valores de IMC “saludables”.

Para finalizar, resulta importante añadir que la leptina, a pesar de su estrecha asociación con el IMC, ha sido propuesta en varios trabajos como un útil biomarcador de diagnóstico y pronóstico a largo plazo en pacientes con AN (132–134,137,160). Holtkamp et al. observaron, en un estudio que tenía como objetivo investigar la evolución tras el alta durante un año, que niveles elevados de leptina al alta (ajustando por IMC y porcentaje de grasa corporal para comparar con controles) podían ser predictivos de una recaída en lo que se refiere a una nueva pérdida de peso durante el año siguiente al alta (289). Esto podría tener relación con el establecimiento de un ritmo adecuado de ganancia de peso, de forma que se produzca acompasadamente con la necesaria aceptación de cambios que persigue la terapia psicológica, principalmente cognitiva y conductual. Además, otro estudio reciente encontró resultados contrarios, puesto que una mayor leptina al alta tras la renutrición, así como la leptina ajustada por la grasa corporal y el porcentaje de grasa corporal al alta eran predictores del mantenimiento de peso transcurrido un año desde el alta (290). Por su parte, Terra et al. encontraron en sus resultados que los niveles más altos de leptina, medidos a las tres semanas de iniciado el tratamiento, se relacionaron con una mayor duración de la enfermedad en pacientes con edad más avanzada (27 años de media) y mayor duración de la enfermedad (8 años de media), lo que sugiere que la dinámica del aumento de los niveles plasmáticos de leptina durante el aumento de peso podría tener un significado crucial para el pronóstico a largo plazo (132).

La medida de los niveles plasmáticos de leptina y sObR parecen tener un significado importante en el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de pacientes con AN. Por tanto, sería muy interesante para futuras investigaciones contar con las medidas de la composición corporal de las pacientes y concretamente con el porcentaje de masa grasa, además de la historia de pérdida o de fluctuación ponderal previa al inicio de la renutrición, para poder estudiar en detalle las asociaciones entre parámetros.

5.3.4 Adiponectina

Los resultados obtenidos en relación a la evolución longitudinal de este parámetro han mostrado ciertas particularidades que pasamos a describir en el marco de las evidencias publicadas previamente por otros investigadores.

Como ya mencionamos en el segundo estudio, los resultados en relación a los valores de adiponectina en pacientes con AN no parecen ser consistentes en la literatura y, por ende, son poco concluyentes. De modo similar, la etiología de la secreción de adiponectina durante la renutrición y el curso del tratamiento tampoco parece estar clara y los resultados de estudios longitudinales al respecto presentan muchas discrepancias. En nuestro trabajo hemos observado al inicio del tratamiento elevados valores de adiponectina en ambos grupos que se mantenían elevados al cabo de doce meses, mostrando incluso una tendencia al aumento en valores en el grupo grave.

La literatura existente muestra tres escenarios diferentes. Por un lado se muestran grupos de pacientes con desnutrición grave y un acentuado estado de hipoadiponectinemia que revertía con la recuperación de peso (140,142). Por otro lado existen trabajos que describen grupos de pacientes con tasas altas de adiponectina al inicio del tratamiento que con el aumento de peso presentaban

una disminución de los niveles hasta valores similares a los de la población control (132,248) y por último y coincidiendo con nuestro trabajo, se han descrito grupos de pacientes en los cuales no se observaba tal caída de los niveles de adiponectina con el aumento del IMC (291,292).

Iwahashi et al. en su trabajo identificaron un patrón que sugería que la respuesta de la adiponectina a la realimentación podría depender de la existencia de un cierto umbral de masa grasa y propuso específicamente que los niveles de adiponectina aumentarían al inicio de la realimentación hasta lograr un IMC de 16 y luego disminuirían gradualmente con nuevos aumentos en el IMC (140). Otros autores no encontraron tal umbral, sin embargo, encontraron una correlación inversa entre la adiponectina y la masa grasa, que solo era significativa cuando se combinaron pacientes y controles y que se perdía cuando consideraban únicamente el grupo de pacientes, lo que podría deberse a ese patrón de comportamiento no lineal en relación a la masa corporal (145). Considerando la alta variación en los niveles de adiponectina en los pacientes y el hecho de que los valores parecían no estar relacionados con los depósitos de masa grasa, los autores sugirieron que otros determinantes no identificados debían explicar la variación de adiponectina en estas pacientes. Tanto la falta de correlación entre el Z score del IMC y los niveles de adiponectina como la alta variabilidad en los valores de esta adipocitoquina coinciden con nuestros resultados. Por el contrario, Dostalova et al. sí encontraron una correlación inversamente significativa entre la adiponectina y ambos, el IMC y la masa grasa, pero la edad media de los diez pacientes que estudiaron era significativamente mayor en comparación con el estudio actual y el mencionado anteriormente (145) y quizás la variabilidad en el estado nutricional fue mayor entre sus pacientes ya que, además, la toma de muestra de sangre se realizó tras las dos primeras semanas de hospitalización (127).

Terra et al. propusieron que la adiponectina podía actuar como un buen biomarcador durante el tratamiento basándose en la relación que encontraron entre la adiponectina y el IMC en su grupo de pacientes, a lo largo del proceso de renutrición (132). El IMC parece ser un factor determinante de los niveles de adiponectina, especialmente al inicio del tratamiento (291), sin embargo la recuperación parcial de peso no siempre es suficiente para normalizar los valores de adiponectina, lo cual sugiere que hay otros factores involucrados (292). Entre estos factores destacamos: la gravedad de la AN (291), la duración de la enfermedad (132), la gravedad de la desnutrición al ingreso (248) y la ingesta energética (146).

Como apuntamos al discutir los resultados del segundo trabajo, es importante destacar la influencia que el estado de diferenciación y desarrollo de los adipocitos puede tener sobre la expresión de adiponectina (248). Así, cuando las pacientes comienzan a ganar peso, este se asociaría con una mayor proporción de adipocitos jóvenes y en diferenciación, siendo mayor en ellos la tasa de síntesis de adiponectina (256). Un mayor conocimiento de la influencia de todos estos factores resulta fundamental para esclarecer tanto la etiología de la secreción de adiponectina en la paciente con AN como su uso como biomarcador.

CONSIDERACIONES FINALES Y LÍNEAS DE FUTURO

La AN es una enfermedad mental grave, compleja y de difícil abordaje. Los tratamientos no son del todo exitosos y presentan una elevada tasa de cronificación y una de las más altas tasas de mortalidad dentro de las enfermedades mentales. El curso clínico suele ser largo y complicado debido a la necesidad de incluir en el mismo protocolo terapéutico diferentes niveles de intervención que incluyen la normalización biológica, recuperación ponderal,

rehabilitación nutricional, psicoterapia e intervenciones familiares. Además, existen multitud de factores que condicionan el curso de su evolución como son la alternancia de episodios de recaída y remisión (incluso en los casos más controlados), migraciones entre los distintos subtipos diagnósticos e importantes comorbilidades psiquiátricas.

Los estudios realizados en poblaciones de AN deberían considerar estos factores, así como otros relacionados con la heterogeneidad entre pacientes en cuanto al sexo, edad, duración de la enfermedad o nivel de malnutrición; de tal modo que permitan separar los efectos de la AN en cada contexto y al margen de otros factores que no son controlados. Un aspecto importante de este estudio es la selección del grupo de pacientes que se ha llevado a cabo, pues partiendo de una población que acude al hospital en situaciones muy heterogéneas, los criterios aplicados para formar parte del estudio han permitido reunir un grupo con características definidas, todas ellas pacientes de sexo femenino, adolescentes y en su primer episodio de la enfermedad. Concretamente el hecho de que todas las pacientes se encontraran en el primer episodio de la enfermedad nos ha permitido controlar en cierto modo el efecto de otras condiciones patológicas que puedan ser consecuencia del curso de la enfermedad.

Algunos resultados obtenidos en nuestro estudio parecen confirmar hallazgos previos y otros han sido destacados como más novedosos al haber encontrado limitados estudios al respecto. El primer estudio, que tenía como objetivo profundizar en las alteraciones del estado inmunológico mostró resultados especialmente interesantes que ponen de manifiesto alteraciones específicas de AN en relación a otras formas de malnutrición, como es el aumento del porcentaje de células T colaboradoras y el descenso de las células T citotóxicas de memoria, que más allá de aportar en el conocimiento de las alteraciones

producidas en la enfermedad podrían tener un destacado valor como biomarcador para el seguimiento de la evolución.

Los parámetros fueron estudiados de forma independiente pero siempre teniendo en mente las complejas interacciones que sabemos se producen entre el sistema inmune, el eje HPA y adipocitoquinas como leptina y adiponectina que regulan la homeostasis y el metabolismo. Nuestros resultados apuntaron estas posibles interacciones entre algunos de los parámetros estudiados. Así, en el segundo estudio se puso de manifiesto una importante asociación entre el cortisol, Z score del IMC y leptina; asociación sobre la que sería muy interesante profundizar en el futuro.

La etiopatogénesis de esta enfermedad es compleja y poco comprendida. Estudios que profundicen en el conocimiento de las alteraciones que se producen durante la enfermedad, sus causas y mecanismos resultan esenciales a día de hoy, así como estudios que trabajen en la identificación de biomarcadores. Es necesario disponer de variables clínicas y funcionales que acompañen al IMC, puesto que en muchas ocasiones la normalización del peso en las pacientes no significa que la enfermedad esté resuelta. En el tercer estudio de esta tesis hemos propuesto algunos de los parámetros estudiados (ferritina, estradiol y receptor soluble de leptina) como posibles biomarcadores que evidencian la persistencia de alteraciones metabólicas a pesar de haberse llevado a cabo una importante recuperación ponderal. En el contexto clínico, disponer de adecuados biomarcadores puede contribuir al establecimiento de mejores diagnósticos, a poder estratificar adecuadamente el riesgo identificando a aquellas pacientes que sean de alto riesgo y ayudar en la monitorización de la enfermedad, incorporando protocolos con algoritmos más complejos que se apoyen más en la característica predictiva de los

biomarcadores. Todo ello con el fin de poder proporcionar a los pacientes intervenciones clínicas más eficaces y mejorar el pronóstico.

Los resultados obtenidos en los tres estudios presentados sientan las bases para futuras investigaciones, que podrían realizarse con los datos recogidos en el proyecto ANABEL que no han sido aún abordados pormenorizadamente, entre los que podríamos mencionar el estudio de la relación de los biomarcadores más relevantes señalados en estas páginas y la evolución de variables clínicas como son la amenorrea o las puntuaciones de los test psicológicos.

Sería interesante también para futuros estudios poder incluir y disponer de datos detallados en relación a las medidas de composición corporal, datos correspondientes al GER de las pacientes, así como los datos relativos al momento del ciclo menstrual en que se realiza la toma de muestra, de tal modo que nos permitan evaluar mejor las asociaciones entre variables para una mejor comprensión de los procesos que subyacen.

También se justifican otros trabajos en este grupo homogéneo de pacientes que tuvieran como fin averiguar si las medidas durante el seguimiento pueden predecir una buena o mala respuesta al tratamiento y utilizarse como factores pronósticos. Estas aproximaciones podrían ser de interés para encontrar marcadores predictores de riesgo que ayuden a personalizar en cierta medida los protocolos y a evitar las recaídas.

En cuanto al sistema inmune sería interesante la profundización en el estudio no solo en relación a las alteraciones que se producen como consecuencia de la enfermedad, sino también su posible participación en el desarrollo y mantenimiento de la misma. Esta relación es bien conocida en el caso de otras enfermedades como la depresión, y estudios actuales reconocen también su participación en TCA (293).

En AN, otro aspecto interesante a estudiar es la relación entre el sistema inmune y el sistema gastrointestinal, donde la microbiota tiene una influencia conocida en la regulación del peso corporal y en la homeostasis a través del eje intestino-cerebro. Existen evidencias de alteraciones en estos procesos en pacientes con AN. Las alteraciones en el microbioma intestinal en AN pueden aumentar la permeabilidad intestinal a través de la disminución de las mucinas intestinales, el adelgazamiento de las paredes intestinales y la alteración de las uniones estrechas entre las células del intestino. Todo ello facilita la difusión de subproductos bacterianos, incluso bacterias completas hacia el torrente sanguíneo activando a las células inmunitarias y desencadenando procesos inflamatorios periféricos (294).

Futuros estudios en esta línea probablemente aportarán información interesante acerca de la etiología y los mecanismos que subyacen en los TCA. Asimismo, tanto el análisis de la composición de la microbiota intestinal como el empleo de ciertas cepas de bacterias probióticas podrían convertirse en herramientas para el diagnóstico y el tratamiento, respectivamente, de esta patología.

6. CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

Estudio primero

En el grupo estudiado de pacientes con AN y OTAIE durante su primer episodio se aprecia una linfocitosis relativa, consecuencia de una mayor producción relativa de linfocitos T y linfocitos B a medida que avanza la pérdida de masa corporal. Esto parece ser un mecanismo de adaptación para mantener el número de linfocitos y en particular la subpoblación T CD4+ naïve, probablemente para salvaguardar la respuesta inmune adaptativa.

Estudio segundo

Nuestro grupo de pacientes adolescentes en etapa temprana del desarrollo de la AN muestra cambios significativos en los niveles de las adipocitoquinas leptina y adiponectina, así como en el cortisol, en comparación con sus pares controles, confirmando las alteraciones descritas en la literatura en estudios con grupos de pacientes con AN de características variables.

No se confirmó la alteración de las citoquinas proinflamatorias, lo que sugiere que el aumento de estas citoquinas podría ocurrir en pacientes con una mayor duración de la enfermedad.

Las asociaciones encontradas para el cortisol con el Z score del IMC y el sObR apuntan hacia una interacción entre el eje HPA y la función de la leptina que impulsa las adaptaciones tempranas a la restricción energética.

Estudio tercero

Tras doce meses de tratamiento y a pesar de una importante recuperación ponderal, pacientes que iniciaron tratamiento con distinto grado de severidad

de acuerdo a su IMC, continúan presentando importantes alteraciones en varios de los parámetros estudiados.

Estas alteraciones que persisten tras doce meses de tratamiento, incluso en pacientes con valores saludables de IMC, parecen poner de manifiesto la permanencia de los mecanismos de adaptación a la malnutrición.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. American Psychiatric Association. DSM 5: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington. 2013.
2. J.A. Cabranes, I. Gil, C. Gómez Candela, P. Gual, R. Julián, C. Ponce de León et al. Protocolo de atención a pacientes con trastorno del comportamiento alimentario dirigido a médicos de atención primaria, 2000 [Internet]. Ministerio de Sanidad y Consumo. Secretaría General Técnica. Centro de Publicaciones, Madrid. 2000. Available from: [https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Protocolo de atención a pacientes con trastorno del comportamiento alimentario dirigido a médicos de atención primaria&publication_year=2000&author=J.A. Cabranes&author=I. Gil&author=C. Gómez Candela&author=](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Protocolo+de+atención+a+pacientes+con+trastorno+del+comportamiento+alimentario+dirigido+a+médicos+de+atención+primaria&publication_year=2000&author=J.A.+Cabranes&author=I.+Gil&author=C.+Gómez+Candela&author=)
3. Turón Gil V. Evolución de los TCA. ¿Es posible la curación? In: Controversias sobre los trastornos alimentarios. 2012. p. 119–30.
4. Treasure J, Campbell I. The case for biology in the aetiology of anorexia nervosa 1. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1017/S0033291700026775>
5. Faya Barrios M. La intervención de los agentes sanitarios en la prevención de los trastornos alimentarios. In: Controversias sobre los trastornos alimentarios. 2012. p. 105–17.
6. J.Toro Trallero. Etiopatogenia. In: Trastornos de la Conducta Alimentaria y Obesidad Un enfoque integral (1a ed). 2014. p. 17.
7. Mehler PS, Brown C. Anorexia nervosa - medical complications. J Eat Disord [Internet]. 2015 Mar 31;3(1):11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25834735>
8. E.Martínez Mallén MTPT y JC-F. Adolescencia. In: Trastornos de la conducta alimentaria y obesidad. 2014. p. 133–4.
9. Hernandez. Factores de crecimiento en la AN y la obesidad. Bol pediatria. 1999;39(169):181–5.
10. American Psychiatric Association practice guidelines. Treatment of patients with eating disorders. 2006.

11. D. Madruga MRQ. Tratamiento nutricional. In: Trastornos de la conducta alimentaria y obesidad. 2014. p. 395–407.
12. Madruga, D., Leis, R. y Lambruschini N. Trastornos del comportamiento alimentario: anorexia nerviosa y bulimia nerviosa. In: SEGHNPA-AEP. Ergon., editor. Protocolos diagnósticos y terapéuticos de gastroenterología, hepatología y nutrición pediátrica Madrid. 2010. p. 325–36.
13. Lor L, Jaimes L, Cabrera-Raine Jaimes A, Cabrera-W W A, Wrooman WW, Rooman A V, et al. Péptidos anorexigénicos y su participación en la conducta alimentaria. Vol. 13, Revista de Endocrinología y Nutrición. 2005.
14. M.J.Martínez Gómez y R.Muñoz Codoceo. Respuesta digestiva a la malnutrición. In: Trastornos de la Conducta Alimentaria y Obesidad Un enfoque integral (1a ed). 2014. p. 87–90.
15. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, et al. Gut hormone PYY3-36 physiologically inhibits food intake. *Nature* [Internet]. 2002 Aug 8;418(6898):650–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12167864/>
16. Misra M, Miller KK, Tsai P, Gallagher K, Lin A, Lee N, et al. Elevated Peptide YY Levels in Adolescent Girls with Anorexia Nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2006 Mar 1;91:1027–33. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/91/3/1027/2843529>
17. Lawson EA, Eddy KT, Donoho D, Misra M, Miller KK, Meenaghan E, et al. Appetite-regulating hormones cortisol and peptide YY are associated with disordered eating psychopathology, independent of body mass index. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2011 Feb 1;164(2):253–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21098684/>
18. Germain N, Galusca B, Grouselle D, Frere D, Billard S, Epelbaum J, et al. Ghrelin and Obestatin Circadian Levels Differentiate Bingeing-Purging from Restrictive Anorexia Nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2010 Jun 1;95(6):3057–62. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/95/6/3057/2598937>
19. Eddy KT, Lawson EA, Meade C, Meenaghan E, Horton SE, Misra M, et al. Appetite regulatory hormones in women with anorexia nervosa: Binge-eating/purging versus restricting type. *J Clin Psychiatry* [Internet]. 2015

- Jan 1;76(1):19–24. Available from:
<https://www.psychiatrist.com/jcp/mental/women/appetite-regulatory-hormones-women-anorexia-nervosa>
20. Germain N, Galusca B, Le Roux CW, Bossu C, Ghatei MA, Lang F, et al. Constitutional thinness and lean anorexia nervosa display opposite concentrations of peptide YY, glucagon-like peptide 1, ghrelin, and leptin. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2007 Apr 1;85(4):967–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17413094/>
 21. Nova E, Montero A, Gómez S MA. La Estrecha Relación entre la Nutrición y el Sistema Inmunitario. In: Squibb B-M, editor. *Soporte Nutricional en el Paciente Oncológico 2ª Edición* Gómez Candela C, Sastre Gallego A. Madrid: You & Us S.A; 2004. p. 9–21.
 22. De La Fuente M. Funcionamiento del sistema inmunitario. In: Editorial médica Panamericana SA, editor. *Inmunonutrición Estilo de vida Segunda Edición* Marcos, A. Madrid; 2020. p. 5–24.
 23. Romeo J, Pérez de Heredia F, Gómez-Martínez S, Díaz LE, Pozo- Rubio T MA. Food Supplements and Immune Function in Humans. In: Watson R, Preedy V E, editor. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*. San Diego, CA, USA.; 2013. p. 145–56.
 24. Calder PC. Immunological parameters: what do they mean? *J Nutr* [Internet]. 2007 Mar;137(3 Suppl 2):773S-80S. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17311974/>
 25. Childs CE, Calder PC, Miles EA. Diet and Immune Function. *Nutrients* [Internet]. 2019 Aug 1;11(8). Available from: </pmc/articles/PMC6723551/>
 26. Monserrat Sanz J, Martín M, Reyes E, Prieto Martín A. Células presentadoras de antígeno. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. 2013 Mar 1;11(28):1720–7.
 27. Lopez J. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood and David E. Bruns (eds): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis (5th edition)*: Elsevier, St. Louis, USA, 2012, 2238 pp, 909 illustrations. ISBN: 978-1-4160-6164-9. *Indian J Clin Biochem* [Internet]. 2013 Jan;28(1):104. Available from: </pmc/articles/PMC3547451/>

28. Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function [Internet]. Vol. 51, *Annals of Nutrition and Metabolism*. *Ann Nutr Metab*; 2007. p. 301–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17726308/>
29. Díaz Martín D, Úbeda Cantera M, López Suárez A, Álvarez de Mon Soto M. Respuesta inmune innata y sus implicaciones fisiopatológicas. *Med*. 2017 Jan 1;12(24):1388–97.
30. Hannigan B. Immunity. Physiological aspects. In: Sadler MJ, Strain JJ, Caballero B E, editor. *Encyclopedia of Human Nutrition Vol 2*. San Diego, CA; 1999. p. 1074–81.
31. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Adv Sci* [Internet]. 2021 Aug 1;8(15):2004433. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adv.202004433>
32. Glaudemans AW, Dierckx RA, Kallenberg CG FK. The role of radiolabelled anti- TNF α monoclonal antibodies for diagnostic purposes and therapy evaluation. *J Nucl Med Mol Imagin* [Internet]. 2010;54(6):639–53. Available from: <https://research.rug.nl/en/publications/the-role-of-radiolabelled-anti-tnf-alpha-monoclonal-antibodies-fo>
33. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A Y-FJ. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2008 Jul 21;14(27):4280–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18666314/>
34. Coico R SG. Immunology; A short course. (6th edition) [Internet]. Vol. 82, *The Yale Journal of Biology and Medicine*. *Yale Journal of Biology and Medicine*; 2009. 232 p. Available from: </pmc/articles/PMC2794500/>
35. Gonzalez-Santiago AE, Mendoza-Topete LA, Sánchez-Llamas F, Troyo-Sanromán R G-DM. TGF- β 1 serum concentration as a complementary diagnostic biomarker of lung cancer: establishment of a cut-point value. *J Clin Lab Anal* [Internet]. 2011;25(4):238–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21786325/>
36. Packard RR LP. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* [Internet]. 2008;54(1):24–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18160725/>

37. Oikonomou E, Tousoulis D, Siasos G, Zaromitidou M, Papavassiliou AG SC. The role of inflammation in heart failure: new therapeutic approaches - PubMed. *Hell J Cardiol* [Internet]. 2011;52(1):30–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21292605/>
38. Monastero R, Pentylala S. Cytokines as Biomarkers and Their Respective Clinical Cutoff Levels. *Int J Inflam* [Internet]. 2017;2017. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28487810/>
39. Milioglou I, Kalaitzidou I, Ladomenou F. Interpretation of lymphocyte subset counts by the general pediatrician. *Pediatr Int* [Internet]. 2019 Jan 1;61(1):16–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30248214/>
40. Marcos A, Nova E, Perdigón G de MA. Nutrición e inmunidad. In: Serra Majem L, Aranceta J E, editor. *Nutrición y salud pública Métodos, bases científicas y aplicaciones 2ª edición*. Barcelona; 2006. p. 482–90.
41. Shen Y, Pang C, Wu Y, Li D, Wan C, Liao Z, et al. Diagnostic Performance of Bronchoalveolar Lavage Fluid CD4/CD8 Ratio for Sarcoidosis: A Meta-analysis. *EBioMedicine* [Internet]. 2016 Jun 1;8:302–8. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2352396416301608/fulltext>
42. Frew AJ, St-Pierre J, Teran LM, Trefilieff A, Madden J, Peroni D, et al. Cellular and mediator responses twenty-four hours after local endobronchial allergen challenge of asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 1996 Jul 1;98(1):133–43. Available from: <http://www.jacionline.org/article/S009167499670235X/fulltext>
43. Elena A Jones, Anne English, Karen Henshaw, Sally E Kinsey, Alex F Markham, Paul Emery DM. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2004 Mar;50(3):817–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15022324/>
44. Carmen Arango Prado M. Caracterización de los inmunofenotipos linfocitarios de sangre periférica en pacientes con cáncer. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 2020;36(2). Available from: <https://orcid.org/0000-0002-8307-4296>
45. Chandra R. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1997;66(2). Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9250133/>
46. Segurola H, Cárdenas G. Nutrientes e inmunidad. *Nutr clínica en Med.* 2016;10(1):1–19.
 47. Albers R, Antoine J-M, Calder PC. Markers to measure immunomodulation in human nutrition intervention studies. *Br J Nutr.* 2005;94:452–81.
 48. E.Nova Rebato SG-M y AMS. Respuesta inmunitaria en la malnutrición. In: *Trastornos de la conducta alimentaria y obesidad Un enfoque integral.* 2014. p. 97.
 49. Nova E MA. Immunity in Anorexia nervosa. In: Philip C. Calder, Anil D. Kulkarni E, editor. *Nutrition, Immunity, and Infection.* 2017. p. 111–24.
 50. Silber TJ, Chan M. Immunologic cytofluorometric studies in adolescents with anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* [Internet]. 1996;19(4):415–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8859401/>
 51. Grimble RF. Modification of inflammatory aspects of immune function by nutrients. *Nutr Res.* 1998;18(7):1297-1317.
 52. Marcos A, Varela P, Santacruz I, Muñoz-Velez A MG. Nutritional status and immunocompetence in eating disorders. A comparative study. *Eur J Clin Nutr.* (47)::787–793.
 53. Nova E, Marcos A. Immunocompetence to assess nutritional status in eating disorders. *Expert Rev Clin Immunol.* 2006;2(3):433–44.
 54. Marcos A, Varela P, Santacruz I, Muñoz-Velez A. Evaluation of immunocompetence and nutritional status in patients with bulimia nervosa. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1993;57(1):65–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8416667/>
 55. Marcos A, Varela P, Toro O, López-Vidriero I, Nova E, Madruga D, et al. Interactions between nutrition and immunity in anorexia nervosa: a 1-y follow-up study. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1997 Aug;66(2):485S-490S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9250136>
 56. Nova E, Gómez-Martínez S, Morandé G, Marcos A.* A. Cytokine production by blood mononuclear cells from in-patients with anorexia nervosa. *Br J Nutr* [Internet]. 2002 Aug 1;88(2):183–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12144721>

57. Nishio S, Yamada H, Yamada K, Okabe H, Okuya T, Yonekawa O, et al. Severe neutropenia with gelatinous bone marrow transformation in anorexia nervosa: A case report. *Int J Eat Disord*. 2003 Apr;33(3):360–3.
58. Kay J, Stricker RB. Hematologic and Immunologic Abnormalities in Anorexia Nervosa. *South Med J* [Internet]. 1983;76(8):1008–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6348960/>
59. FM G. Reversible granulocyte killing defect in anorexia nervosa - PubMed [Internet]. 1975. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1102164/>
60. Palmblad J, Fohlin L, Lundstrom M. Anorexia Nervosa and Polymorphonuclear (PMN) Granulocyte Reactions. *Scand J Haematol* [Internet]. 1977;19(4):334–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/918561/>
61. Erhabor & Adiaso. *Haematology Made Easy*. AuthorHouse, editor. Bloomington: AuthorHouse; 2013. 278 p.
62. Allende LM, Corell A, Manzanares J, Madruga D, Marcos A, Madroño A, et al. Immunodeficiency associated with anorexia nervosa is secondary and improves after refeeding. *Immunology* [Internet]. 1998 Aug;94(4):543–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767443>
63. Cason J, Ainley CC, Wolstencroft RA, Norton KR, Thompson RP. Cell-mediated immunity in anorexia nervosa. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1986 May;64(2):370–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3742879>
64. do Carmo I, Palma-Carlos ML, Melo A, Jorge Z, Macedo A, Nunes S, et al. [Characterization of leukocytes, lymphocytes and lymphocyte subsets in eating disorders]. *Allerg Immunol (Paris)* [Internet]. 1997 Nov;29(9):261–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9580038>
65. Fink S, Eckert E, Mitchell J, Crosby R, Pomeroy C. T-lymphocyte subsets in patients with abnormal body weight: longitudinal studies. in anorexia nervosa and obesity. *Int J Eat Disord* [Internet]. 1996 Nov;20(3):295–305. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291098-108X%28199611%2920%3A3%3C295%3A%3AAID-EAT9%3E3.0.CO%3B2-J>

66. Mustafa A, Ward A, Treasure J, Peakman M. T lymphocyte subpopulations in anorexia nervosa and refeeding. *Clin Immunol Immunopathol* [Internet]. 1997 Mar;82(3):282–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9073552>
67. Nova E, Toro O, Varela P, López-Vidriero I, Morandé G, Marcos A. Effects of a nutritional intervention with yogurt on lymphocyte subsets and cytokine production capacity in anorexia nervosa patients. *Eur J Nutr* [Internet]. 2006 Jun;45(4):225–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16525751/>
68. Marcos A. Eating disorders: A situation of malnutrition with peculiar changes in the immune system. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2000;54:S61–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10805041/>
69. Nagata T, Kiriike N, Tobitani W, Kawarada Y, Matsunaga H, Yamagami S. Lymphocyte subset, lymphocyte proliferative response, and soluble interleukin-2 receptor in anorexic patients. *Biol Psychiatry* [Internet]. 1999 Feb 15;45(4):471–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10071720>
70. Marcos A, Varela P, Santacruz I, Muñoz-Velez A, Morande G. Nutritional status and immunocompetence in eating disorders. A comparative study. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 1993 Nov 1;47(11):787–93. Available from: <https://europepmc.org/article/med/8287848>
71. Nagata T, Tobitani W, Kiriike N, Iketani T, Yamagami S. Capacity to produce cytokines during weight restoration in patients with anorexia nervosa. *Psychosom Med* [Internet]. 1999;61(3):371–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10367619>
72. Marcos A, Varela P, Toro O, Nova E, López-Vidriero I, Morandé G. Evaluation of nutritional status by immunologic assessment in bulimia nervosa: influence of body mass index and vomiting episodes. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1997 Aug;66(2):491S-497S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9250137>
73. Gómez González B, Izquierdo AE. La psiconeuroinmunología: bases de la relación entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune. Vol. 45, *Rev Fac Med UNAM*. 2002.
74. Guilbaud O, Chaouat G, Corcos M, Guilbaud O, Chaouat G, Cayol V, et al. Cytokines and anorexia nervosa. *Psychosom Med* [Internet].

- 2001;63(3):502–4. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11382279>
75. Nakai Y, Hamagaki S, Takagi R, Taniguchi A, Kurimoto F. Plasma Concentrations of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and Soluble TNF Receptors in Patients with Anorexia Nervosa ¹. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1999 Apr;84(4):1226–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10199758>
 76. Solmi M, Veronese N, Favaro A, Santonastaso P, Manzato E, Sergi G, et al. Inflammatory cytokines and anorexia nervosa: A meta-analysis of cross-sectional and longitudinal studies. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 2015 Jan;51:237–52. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306453014003795>
 77. Dalton B, Bartholdy S, Robinson L, Solmi M, Ibrahim MAA, Breen G, et al. A meta-analysis of cytokine concentrations in eating disorders. Vol. 103, *Journal of Psychiatric Research*. 2018.
 78. Brambilla F, Monti D, Franceschi C. Plasma concentrations of interleukin-1-beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha, and of their soluble receptors and receptor antagonist in anorexia nervosa. *Psychiatry Res* [Internet]. 2001 Sep 20;103(2–3):107–14. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11549399>
 79. Brambilla F, Bellodi L, Brunetta M, Perna G. Plasma concentrations of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in anorexia and bulimia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 1998 Jul;23(5):439–47. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9802119>
 80. Holden RJ, Pakula IS. The role of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of anorexia and bulimia nervosa, cancer cachexia and obesity. *Med Hypotheses* [Internet]. 1996 Dec;47(6):423–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8961238>
 81. Emeric-Sauval E, Polack E BM et al. Anorexia nervosa and bulimia: a model for the study of immune-neuroendocrine interactions in response to human CRH. 1989;
 82. Turnbull A V., Rivier CL. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanisms of Action ANDREW [Internet]. American Physiological Society; Jan, 1999 p. 1–71. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922367>

83. Limone P, Biglino A, Bottino F, Forno B, Calvelli P, Berardi C. Evidence for a positive correlation between serum cortisol levels and IL-1 p production by peripheral mononuclear cells In anorexia nervosa. 2000;422–7.
84. Gwosdow AR, Kumar MSA, Bode HH. Interleukin 1 stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* [Internet]. 1990;258(1 21-1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2154118/>
85. Malek H, Ebadzadeh MM, Safabakhsh R, Razavi A, Zaringhalam J. Dynamics of the HPA axis and inflammatory cytokines: Insights from mathematical modeling. *Comput Biol Med* [Internet]. 2015 Dec 1;67:1–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26476562/>
86. Nova E, Marcos A. Nutritional Status and Immunocompetence in Eating Disorders. In: *Eating Disorders and the Skin* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 37–46. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-29136-4_5
87. Corcos M, Guilbaud O, Paterniti S, Moussa M, Chambry J, Chaouat G, et al. Involvement of cytokines in eating disorders: A critical review of the human literature [Internet]. Vol. 28, *Psychoneuroendocrinology*. Elsevier Ltd; 2003. p. 229–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12573293/>
88. Shintani F, Kanba S, Nakaki T, Nibuya M, Kinoshita N, Suzuki E, et al. Interleukin-1 β augments release of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the rat anterior hypothalamus. 1993 Aug;13(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8393485/>
89. Koonsman JP, Dantzer R. How the immune and nervous systems interact during disease-associated anorexia. In: *Nutrition* [Internet]. Nutrition; 2001. p. 664–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11448593/>
90. Nogueiras R, Romero-Picó A, Vazquez MJ, Novelle MG, López M, Diéguez C. The opioid system and food intake: Homeostatic and hedonic mechanisms [Internet]. Vol. 5, *Obesity Facts*. S. Karger AG; 2012. p. 196–207. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22647302/>

91. Connor TJ, Leonard BE. Depression, stress and immunological activation: The role of cytokines in depressive disorders [Internet]. Vol. 62, Life Sciences. Elsevier Inc.; 1998. p. 583–606. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9472719/>
92. Teraiza Mesa Rodríguez. Importancia de las citoquinas proinflamatorias en la fisiopatología de los trastorno depresivos. In 2013. Available from: <https://psiquiatria.com/bibliopsiquis/volumen.php?wurl=importancia-de-las-citoquinas-proinflamatorias-en-la-fisiopatologia-de-los-trastorno-depresivos-articulo-de-revision>
93. Inui A. Eating behavior in anorexia nervosa - An excess of both orexigenic and anorexigenic signalling? Mol Psychiatry [Internet]. 2001;6(6):620–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11673789/>
94. Nova E, Lopez-Vidriero I, Varela P, Toro O, Casas JJ, Marcos AA. Indicators of nutritional status in restricting-type anorexia nervosa patients: a 1-year follow-up study. Clin Nutr [Internet]. 2004 Dec;23(6):1353–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026156140400086X>
95. Pomeroy C, Mitchell J, Eckert E, Raymond N, Crosby R, Dalmaso AP. Effect of body weight and caloric restriction on serum complement proteins, including factor D/adipsin: Studies in anorexia nervosa and obesity. Clin Exp Immunol. 1997;108(3):507–15.
96. Flierl MA, Gaudiani JL, Sabel AL, Long CS, Stahel PF, Mehler PS. Complement C3 serum levels in anorexia nervosa: a potential biomarker for the severity of disease? Ann Gen Psychiatry [Internet]. 2011 May 4;10:16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21542928>
97. Nova E, Varela P, López-Vidriero I, Toro O, Ceñal MJ, Casas J, et al. A one-year follow-up study in anorexia nervosa. Dietary pattern and anthropometrical evolution. Eur J Clin Nutr [Internet]. 2001 Jul 1;55(7):547–54. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.ejcn.1601181>
98. Lawson EA, Miller KK, Blum JI, Meenaghan E, Misra M, Eddy KT, et al. Leptin Levels Are Associated With Decreased Depressive Symptoms in Women Across the Weight Spectrum, Independent of Body Fat. 2012 Apr;76(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21781144>

99. De Filippo E, Marra M, Alfinito F, Di Guglielmo ML, Majorano P, Cerciello G, et al. No Title. 2016 Nov;70(11):1305–8. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ejcn.2016.115>
100. Brambilla F. Social stress in anorexia nervosa: a review of immuno-endocrine relationships. *Physiol Behav* [Internet]. 2001 Jun;73(3):365–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438363>
101. Singhal V, Misra M, Klibanski A. Endocrinology of anorexia nervosa in young people: recent insights. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* [Internet]. 2014 Feb;21(1):64–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275621>
102. Støving RK. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Anorexia nervosa and endocrinology: a clinical update. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2019 Jan 1;180(1):R9–27. Available from: <https://eje.bioscientifica.com/view/journals/eje/180/1/EJE-18-0596.xml>
103. Muñoz MT AJ. New concepts in anorexia nervosa. *J Pediatr Endocrinol Metab* [Internet]. 2004;Mar;17 Sup. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15134310/>
104. Støving RK, Hangaard J, Hagen C. Update on endocrine disturbances in anorexia nervosa [Internet]. Vol. 14, *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. Freund Publishing House Ltd; 2001. p. 459–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11393567/>
105. Donaldson AA, Gordon CM. Skeletal complications of eating disorders [Internet]. Vol. 64, *Metabolism: Clinical and Experimental*. W.B. Saunders; 2015. p. 943–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26166318/>
106. Muñoz Calvo M y FJC. Respuesta endocrina a la malnutrición. In: *Trastornos de la conducta alimentaria y obesidad*. 2014. p. 90–3.
107. Støving RK. Anorexia nervosa and endocrinology: A clinical update [Internet]. Vol. 180, *European Journal of Endocrinology*. BioScientifica Ltd.; 2019. p. R9–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30400050>
108. Van Binsbergen CJM, Coelingh Bennink HJT, Odink J, Haspels AA, Koppeschaar HPF. A Comparative and Longitudinal Study on Endocrine Changes Related to Ovarian Function in Patients with Anorexia Nervosa. *J*

- Clin Endocrinol Metab [Internet]. 1990;71(3):705–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2203799/>
109. Schorr M, Miller KK. The endocrine manifestations of anorexia nervosa: Mechanisms and management [Internet]. Vol. 13, Nature Reviews Endocrinology. Nature Publishing Group; 2017. p. 174–86. Available from: [/pmc/articles/PMC5998335/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3598335/)
 110. Ohwada R, Hotta M, Sato K, Shibasaki T, Takano K. The relationship between serum levels of estradiol and osteoprotegerin in patients with anorexia nervosa. Endocr J [Internet]. 2007 Dec;54(6):953–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998762>
 111. Krishnan S, Tryon RR, Horn WF, Welch L, Keim NL. Estradiol, SHBG and leptin interplay with food craving and intake across the menstrual cycle. Physiol Behav [Internet]. 2016 Oct 15;165:304–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27527001/>
 112. Misra M, Klibanski A. Anorexia Nervosa and Its Associated Endocrinopathy in Young People. Horm Res Paediatr [Internet]. 2016;85(3):147–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26863308>
 113. Misra M, Miller KK, Kuo K, Griffin K, Stewart V, Hunter E, et al. Secretory dynamics of ghrelin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. Am J Physiol - Endocrinol Metab [Internet]. 2005 Aug;289(2 52-2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15755766/>
 114. Misra M, Miller KK, Almazan C, Ramaswamy K, Lapcharoensap W, Worley M, et al. Alterations in Cortisol Secretory Dynamics in Adolescent Girls with Anorexia Nervosa and Effects on Bone Metabolism. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2004 Oct;89(10):4972–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15472193>
 115. Estour B, Germain N, Diconne E, Frere D, Cottet-Emard JM, Carrot G, et al. Hormonal profile heterogeneity and short-term physical risk in restrictive anorexia nervosa. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2010;95(5):2203–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20305007/>
 116. Silva JE. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance [Internet]. Vol. 5, Thyroid. Mary Ann Liebert Inc.; 1995. p. 481–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8808101/>

117. Leslie RDG, Isaacs AJ, Gomez J, Raggatt PR, Bayliss R. Hypothalamo-pituitary-thyroid function in anorexia nervosa: Influence of weight gain. *Br Med J* [Internet]. 1978 Aug 19;2(6136):526–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/698555/>
118. Lawson EA, Klibanski A. Endocrine abnormalities in anorexia nervosa. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* [Internet]. 2008 Jul 10;4(7):407–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18542109>
119. Lo Sauro C, Raval di C, Cabras PL, Faravelli C, Ricca V. Stress, hypothalamic-pituitary-adrenal axis and eating disorders [Internet]. Vol. 57, *Neuropsychobiology*. *Neuropsychobiology*; 2008. p. 95–115. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18552511/>
120. Misra M, Prabhakaran R, Miller KK, Tsai P, Lin A, Lee N, et al. Role of cortisol in menstrual recovery in adolescent girls with anorexia nervosa. *Pediatr Res* [Internet]. 2006 Apr;59(4 PART 1):598–603. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16549537/>
121. Misra M, Aggarwal A, Miller KK, Almazan C, Worley M, Soyka LA, et al. Effects of anorexia nervosa on clinical, hematologic, biochemical, and bone density parameters in community-dwelling adolescent girls. *Pediatrics* [Internet]. 2004 Dec 1;114(6):1574–83. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2004-0540>
122. Lawson EA, Misra M, Meenaghan E, Rosenblum L, Donoho DA, Herzog D, et al. Adrenal glucocorticoid and androgen precursor dissociation in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2009;94(4):1367–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19158192/>
123. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake [Internet]. Vol. 404, *Nature*. Macmillan Magazines Ltd; 2000. p. 661–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10766253/>
124. Calzada-León R. Neuroendocrine and gastrointestinal modulators of appetite and satiety. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2008;65(6).
125. Mitchell CS, Begg DP. The regulation of food intake by insulin in the central nervous system [Internet]. Vol. 33, *Journal of Neuroendocrinology*. Blackwell Publishing Ltd; 2021. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33656205/>

126. Kaye WH, Berrettini WH, Gwirtsman HE, Gold PW, George DT, Jimerson DC, et al. Affective and eating disorders: Appetite, weigh regulation, and Neuroendocrine function: Contribution of CNS Neuropeptide (NPY, CRH, and beta-endorphin) alterations to psychophysiological abnormalities in anorexia nervosa. In: *Psychopharmacology Bulletin* [Internet]. 1989. p. 433–8. Available from: <https://europepmc.org/article/med/2533990>
127. Dostálová I, Smitka K, Papežová H, Kvasničková H, Nedvídková J. Increased insulin sensitivity in patients with anorexia nervosa: The role of adipocytokines. *Physiol Res* [Internet]. 2007 Oct;56(5):587–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17184143/>
128. Ahima RS. Central actions of adipocyte hormones [Internet]. Vol. 16, *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Trends Endocrinol Metab; 2005. p. 307–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16098759/>
129. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* [Internet]. 1994 Dec 1;372(6505):425–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7984236/>
130. Considine R V., Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. *N Engl J Med* [Internet]. 1996 Feb;334(5):292–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8532024/>
131. Misra M, Miller KK, Almazan C, Ramaswamy K, Aggarwal A, Herzog DB, et al. Hormonal and body composition predictors of soluble leptin receptor, leptin, and free leptin index in adolescent girls with anorexia nervosa and controls and relation to insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2004 Jul;89(7):3486–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15240636/>
132. Terra X, Auguet T, Agüera Z, Quesada IM, Orellana-Gavaldà JM, Aguilar C, et al. Adipocytokine levels in women with anorexia nervosa. Relationship with weight restoration and disease duration. *Int J Eat Disord* [Internet]. 2013 Dec;46(8):855–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23881663/>
133. Hebebrand J, Blum WF, Barth N, Coners H, Englaro P, Juul A, et al. Leptin levels in patients with anorexia nervosa are reduced in the acute stage

- and elevated upon short-term weight restoration. *Mol Psychiatry* [Internet]. 1997;2(4):330–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9246674/>
134. Föcker M, Timmesfeld N, Scherag S, Bühren K, Langkamp M, Dempfle A, et al. Screening for anorexia nervosa via measurement of serum leptin levels. *J Neural Transm* [Internet]. 2011 Apr;118(4):571–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21258826/>
135. Eckert ED, Pomeroy C, Raymond N, Kohler PF, Thuras P, Bowers CY. Leptin in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1998 Mar;83(3):791–5. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.83.3.4661>
136. Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest* [Internet]. 2003 May 1;111(9):1409–21. Available from: </pmc/articles/PMC154448/?report=abstract>
137. Kowalska I, Karczewska-Kupczewska M, Strączkowski M, Strączkowski M. Adipocytokines, gut hormones and growth factors in anorexia nervosa [Internet]. *Clinica Chimica Acta Clin Chim Acta*; Sep 18, 2011 p. 1702–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21699889/>
138. Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease [Internet]. Vol. 148, *European Journal of Endocrinology*. *Eur J Endocrinol*; 2003. p. 293–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12611609/>
139. Bou Khalil R, El Hachem C, Bou R, Charline K, Hachem E, Bou Khalil R, et al. Adiponectin in eating disorders [Internet]. *Eating and Weight Disorders Springer International Publishing*; 2014 p. 3–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24374725/>
140. Iwahashi H, Funahashi T, Kurokawa N, Sayama K, Fukuda E, Okita K, et al. Plasma Adiponectin Levels in Women with Anorexia Nervosa. *Horm Metab Res* [Internet]. 2003 Sep 1;35(9):537–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14517770/>
141. Amitani H, Asakawa A, Ogiso K, Nakahara T, Ushikai M, Haruta I, et al. The role of adiponectin multimers in anorexia nervosa. *Nutrition*

- [Internet]. 2013 Jan;29(1):203–6. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23237649/>
142. Tagami T, Satoh N, Usui T, Yamada K, Shimatsu A, Kuzuya H. Adiponectin in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2004 Apr;89(4):1833–7. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15070952/>
 143. Pannacciulli N, Vettor R, Milan G, Granzotto M, Catucci A, Federspil G, et al. Anorexia nervosa is characterized by increased adiponectin plasma levels and reduced nonoxidative glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2003 Apr 1;88(4):1748–52. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12679468/>
 144. Brichard SM, Delporte ML, Lambert M. Adipocytokines in anorexia nervosa: A review focusing on leptin and adiponectin [Internet]. Vol. 35, *Hormone and Metabolic Research. Horm Metab Res*; 2003. p. 337–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12920654/>
 145. Bosy-Westphal A, Brabant G, Haas V, Onur S, Paul T, Nutzinger D, et al. Determinants of plasma adiponectin levels in patients with anorexia nervosa examined before and after weight gain. *Eur J Nutr* [Internet]. 2005 Sep;44(6):355–9. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15793670/>
 146. Qiao L, Lee B, Kinney B, Yoo HS, Shao J. Energy intake and adiponectin gene expression. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* [Internet]. 2011 May;300(5). Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21325106/>
 147. Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, et al. Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. *Cell Metab* [Internet]. 2007 Jul 11;6(1):55–68. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17618856/>
 148. Christo K, Cord J, Mendes N, Miller KK, Goldstein MA, Klibanski A, et al. Acylated ghrelin and leptin in adolescent athletes with amenorrhea, eumenorrheic athletes and controls: A cross-sectional study. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2008 Oct;69(4):628–33. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18331605/>
 149. Schneider LF, Warren MP. Functional hypothalamic amenorrhea is

- associated with elevated ghrelin and disordered eating. *Fertil Steril* [Internet]. 2006 Dec;86(6):1744–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17074331/>
150. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011 Feb 21;11(2):85–97. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri2921>
 151. Pisetsky DS, Trace SE, Brownley KA, Hamer RM, Zucker NL, Roux-Lombard P, et al. The expression of cytokines and chemokines in the blood of patients with severe weight loss from anorexia nervosa: An exploratory study. *Cytokine* [Internet]. 2014 Sep;69(1):110–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466614001513>
 152. Cerasa A, Castiglioni I, Salvatore C, Funaro A, Martino I, Alfano S, et al. Biomarkers of Eating Disorders Using Support Vector Machine Analysis of Structural Neuroimaging Data: Preliminary Results. *Behav Neurol* [Internet]. 2015;2015. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26648660/>
 153. Pereira Pires SA, Soares JC, da Luz AMB, Moleiro P. Outpatient analytic assessment of anorexia nervosa — The importance of venous blood gases. *Rev Paul Pediatr* [Internet]. 2020;38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31939517/>
 154. MJ B, AA P, LA E. The Role of the Gut Microbiome, Immunity, and Neuroinflammation in the Pathophysiology of Eating Disorders. *Nutrients* [Internet]. 2021 Feb 1;13(2):1–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33546416/>
 155. Baskaran C, Misra M, Klibanski A. Effects of anorexia nervosa on the endocrine system. *Pediatr Endocrinol Rev* [Internet]. 2017 Mar 1;14(3):302–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28508601/>
 156. Lian Q, Zuo X, Mao Y, Luo S, Zhang S, Tu X, et al. Anorexia nervosa, depression and suicidal thoughts among Chinese adolescents: A national school-based cross-sectional study. *Environ Health Prev Med*. 2017;22(1).
 157. Coniglio KA, Becker KR, Franko DL, Zayas L V., Plessow F, Eddy KT, et al. Won't stop or can't stop? Food restriction as a habitual behavior among individuals with anorexia nervosa or atypical anorexia nervosa. *Eat Behav*

- [Internet]. 2017 Aug 1;26:144–7. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28388511/>
158. Brockmeyer T, Holtforth MG, Bents H, Kämmerer A, Herzog W, Friederich H-C. Starvation and emotion regulation in anorexia nervosa. *Compr Psychiatry* [Internet]. 2012 Jul;53(5):496–501. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22036318>
 159. Wild B, Wesche D, Schultz J-H, Stroe-Kunold E, Herzog W, Rudofsky G, et al. Trajectories of the cortisol awakening responses during weight gain in anorexia nervosa patients with severe and less severe symptoms. *Int J Psychophysiol* [Internet]. 2014 Dec;94(3):272–7. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167876014016225>
 160. Stroe-Kunold E, Buckert M, Friederich HC, Wesche D, Kopf S, Herzog W, et al. Time course of leptin in patients with anorexia nervosa during inpatient treatment: Longitudinal relationships to BMI and psychological factors. *PLoS One* [Internet]. 2016 Dec 1;11(12). Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28030575/>
 161. Rosling AM, Sparén P, Norring C, Von Knorring AL. Mortality of eating disorders: A follow-up study of treatment in a specialist unit 1974-2000. *Int J Eat Disord*. 2011 May;44(4):304–10.
 162. Mustelin L, Silén Y, Raevuori A, Hoek HW, Kaprio J, Keski-Rahkonen A. The DSM-5 diagnostic criteria for anorexia nervosa may change its population prevalence and prognostic value. *J Psychiatr Res*. 2016 Jun 1;77:85–91.
 163. Steinhausen HC. The outcome of anorexia nervosa in the 20th century. Vol. 159, *American Journal of Psychiatry*. 2002. p. 1284–93.
 164. Maguire S, Le Grange D, Surgenor L, Marks P, Lacey H, Touyz S. Staging anorexia nervosa: Conceptualizing illness severity. Vol. 2, *Early Intervention in Psychiatry*. 2008. p. 3–10.
 165. Machado PPP, Grilo CM, Crosby RD. Evaluation of the DSM-5 Severity Indicator for Anorexia Nervosa. *Eur Eat Disord Rev* [Internet]. 2017 May;25(3):221–3. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1002/erv.2508>
 166. Gianini L, Roberto CA, Attia E, Timothy Walsh B, Thomas JJ, Eddy KT, et al. Mild, Moderate, Meaningful? Examining the Psychological and

- Functioning Correlates of DSM-5 Eating Disorder Severity Specifiers HHS Public Access. *Int J Eat Disord* [Internet]. 2017;50(8):906–16. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5538916/pdf/nihms871417.pdf>
167. Smith KE, Ellison JM, Crosby RD, Engel SG, Mitchell JE, Crow SJ, et al. The validity of DSM-5 severity specifiers for anorexia nervosa, bulimia nervosa, and binge-eating disorder. *Int J Eat Disord*. 2017 Sep 1;50(9):1109–13.
168. Dakanalis A, Alix Timko C, Colmegna F, Riva G, Clerici M. Evaluation of the DSM-5 severity ratings for anorexia nervosa in a clinical sample. *Psychiatry Res* [Internet]. 2018 Apr 1;262:124–8. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29428775/>
169. Nakai Y, Nin K, Noma S, Teramukai S, Fujikawa K, Wonderlich SA. The impact of DSM-5 on the diagnosis and severity indicator of eating disorders in a treatment-seeking sample. *Int J Eat Disord* [Internet]. 2017 Nov;50(11):1247–54. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28857236>
170. Wanby P, Berglund J, Brudin L, Hedberg D, Carlsson M. Increased ferritin levels in patients with anorexia nervosa: impact of weight gain. *Eat Weight Disord* [Internet]. 2016 Sep 1;21(3):411–7. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26830429/>
171. De Filippo E, Marra M, Alfinito F, Di Guglielmo ML, Majorano P, Cerciello G, et al. Hematological complications in anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2016 Nov 1;70(11):1305–8. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27436150/>
172. Kennedy A, Kohn M, Lammi A, Clarke S. Iron status and haematological changes in adolescent female inpatients with anorexia nervosa. *J Paediatr Child Health* [Internet]. 2004 Aug;40(8):430–2. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15265182/>
173. Papillard-Marechal S, Sznajder M, Hurtado-Nedelec M, Alibay Y, Martin-Schmitt C, Dehoux M, et al. Iron metabolism in patients with anorexia nervosa: Elevated serum hepcidin concentrations in the absence of inflammation. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2012 Mar 1;95(3):548–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22301927>

174. Nemba K, Lewis B, Watson H, Hoiles K, Zhang G, Forbes D. Serum ferritin and nutritional status: insights from an eating disorders clinic population. *Arch Dis Child* [Internet]. 2014 Mar;99(3):221–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24288135>
175. Tran J, Story C, Moore D, Metz M. Unexpected increased ferritin concentration in patients with anorexia nervosa. Vol. 50, *Annals of Clinical Biochemistry*. 2013. p. 504–6.
176. Matsubara M, Koyanagawa Y, Odagaki E, Nakagawa K. Plasma transferrin levels in abnormal endocrine states. II. The changes in various endocrine states. *Horm Metab Res* [Internet]. 1989 Jun;21(6):334–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2777192>
177. Sigal LH, Snyder BK. Low Serum Complement Levels in Anorexia Nervosa [Internet]. Vol. 143, *American Journal of Diseases of Children*. *Am J Dis Child*; 1989. p. 1391–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2589267/>
178. Aschettino-Manevitz DL, Ornstein RM, Sterling WM, Kohn N, Fisher M. Triiodothyronine (T3) and metabolic rate in adolescents with eating disorders: Is there a correlation? *Eat Weight Disord* [Internet]. 2012 Dec;17(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23221424/>
179. Morandé G. Trastornos de la conducta alimentaria en adolescentes. ¿Una epidemia? EDITORIAL Tabla I Prevalencia de TCA en adolescentes. Vol. 48, Hospital «Niño Jesús». Avda. Menéndez Pelayo. 1998.
180. Sepúlveda AR, Moreno Encinas A, Nova E, Gómez S, Carrobles JA, Graell M. Correlatos biológicos, psicológicos y familiares específicos en el inicio de los trastornos alimentarios: Estudio caso-control (ANOBAS) in press. *Actas Españolas Psiquiatr*.
181. Veiga OL, Gámez-Martínez S, Martínez-Gámez D, Villagra A, Calle ME, Marcos A. Physical activity as a preventive measure against overweight, obesity, infections, allergies and cardiovascular disease risk factors in adolescents: AFINOS Study protocol. *BMC Public Health* [Internet]. 2009;9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20021690/>
182. Gibson D, Mehler PS. Anorexia Nervosa and the Immune System—A Narrative Review. *J Clin Med*. 2019 Nov 8;8(11):1915.
183. Baranowska B KJ. Neuroendocrine aspects of anorexia nervosa and

- bulimia nervosa. *Neuro Endocrinol Lett.* 2018;39(3):172–8.
184. Graell M, de Andrés P, Sepúlveda AR, Moreno A, Villaseñor Á, Faya M, et al. The adolescent onset anorexia nervosa study (ANABEL): Design and baseline results. *Int J Methods Psychiatr Res* [Internet]. 2018 Sep 1;27(3):e1739. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30133037/>
185. Graell M. Hospital care programme for school children and adolescents with eating disorders. *Interpsiquis 2011 12º Congr Virtual Psiquiatr y Neurociencias* [Internet]. 2011;1-feb. Available from: <http://www.psiquiatria.com/bibliopsiquis/handle/10401/2203>. <http://hdl.handle.net/10401/2203>
186. Villaseñor A. Anorexia nervosa. Hospital care at home (HCH). An adolescents parent training programme. *Interpsiquis 2011 12º Congr Virtual Psiquiatr y Neurociencias* [Internet]. 2011;1-feb. Available from: <http://www.psiquiatria.com/bibliopsiquis/handle/10401/2202>; <http://hdl.handle.net/10401/2202>
187. American Psychiatric Association. *DSM IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th editio. Washington, DC.; 1994.
188. Herpertz-Dahlmann B, van Elburg A, Castro-Fornieles J, Schmidt U. ESCAP Expert Paper: New developments in the diagnosis and treatment of adolescent anorexia nervosa—a European perspective [Internet]. Vol. 24, *European Child and Adolescent Psychiatry*. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG; 2015. p. 1153–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26226918/>
189. Fairburn CG, Bohn K. Eating disorder NOS (EDNOS): an example of the troublesome "not otherwise specified" (NOS) category in DSM-IV. *Behav Res Ther* [Internet]. 2005 Jun;43(6):691–701. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000579670400138X>
190. Sobradillo B, Aguirre A, Aresti U, Bilbao A, Fernández Ramos C, Lizárraga A et al. *Curvas y tablas de Crecimiento y Desarrollo (Estudio Longitudinal y Transversal)*. Orbeagozo FF, editor. Bilbao; 2004.
191. Hollingshead AB. *Hollingshead index. Four-factor index of social status*. Yale Unive. 1975.
192. *Web pediátrica española* [Internet]. 2021. Available from:

- <http://www.webpediatria.com/endocrinoped/antropometria.php>
193. Sysko R, Glasofer DR, Hildebrandt T, Klimek P, Mitchell JE, Berg KC, et al. The eating disorder assessment for DSM-5 (EDA-5): Development and validation of a structured interview for feeding and eating disorders. *Int J Eat Disord* [Internet]. 2015 Jul 1;48(5):452–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25639562/>
 194. Brown TA, Holland LA, Keel PK. Comparing operational definitions of DSM-5 anorexia nervosa for research contexts. In: *International Journal of Eating Disorders* [Internet]. *Int J Eat Disord*; 2014. p. 76–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24013875/>
 195. Blanco M, Veiga OL, Sepúlveda AR, Izquierdo-Gomez R, Román FJ, López S, et al. Family environment, physical activity and sedentarism in preadolescents with childhood obesity: ANOBAS case-control study. *Aten Primaria* [Internet]. 2020 Apr 1;52(4):250–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30898477/>
 196. Pérez de Heredia F, Garaulet M, Gómez-Martínez S, Díaz LE, Wärnberg J, Androutsos O, et al. Self-reported sleep duration, white blood cell counts and cytokine profiles in European adolescents: The HELENA study. *Sleep Med* [Internet]. 2014;15(10):1251–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25156749/>
 197. Marugán de Miguelsanz JM. Valoración del estado nutricional. *Gastroenterol y Nutr Integr* [Internet]. 2015;XIX(4):289.e1-289.e6. Available from: <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2015-05/valoracion-del-estado-nutricional/>
 198. Dempfle A, Herpertz-Dahlmann B, Timmesfeld N, Schwarte R, Egberts KM, Pfeiffer E, et al. Predictors of the resumption of menses in adolescent anorexia nervosa [Internet]. *BMC Psychiatry* *BMC Psychiatry*; Nov 15, 2013. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24238469/>
 199. Omodei D, Pucino V, Labruna G, Procaccini C, Galgani M, Perna F, et al. Immune-metabolic profiling of anorexic patients reveals an anti-oxidant and anti-inflammatory phenotype. *Metabolism* [Internet]. 2015 Mar;64(3):396–405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25500208>
 200. Hütter G, Ganepola S, Hofmann W-K. The hematology of anorexia

- nervosa. *Int J Eat Disord* [Internet]. 2009 May;42(4):293–300. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eat.20610>
201. Cleary BS, Gaudiani JL, Mehler PS. Interpreting the Complete Blood Count in Anorexia Nervosa. *Eat Disord* [Internet]. 2010 Mar 2;18(2):132–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10640260903585540>
202. Abella E, Feliu E, Granada I, Millá F, Oriol A, Ribera JM, et al. Bone marrow changes in anorexia nervosa are correlated with the amount of weight loss and not with other clinical findings. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2002 Oct;118(4):582–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12375646/>
203. Abe M, Akbar F, Matsuura B, Horiike N, Onji M. Defective antigen-presenting capacity of murine dendritic cells during starvation. *Nutrition* [Internet]. 2003 Mar;19(3):265–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620532>
204. Saito H, Nomura K, Hotta M, Takano K. Malnutrition induces dissociated changes in lymphocyte count and subset proportion in patients with anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* [Internet]. 2007 Sep;40(6):575–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eat.20417>
205. Pászthy B, Švec P, Vászárhelyi B, Túry F, Mazzag J, Tulassay T, et al. Investigation of regulatory T cells in anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2007 Nov 7;61(11):1245–9. Available from: www.nature.com/ejcn
206. Marcos A, Nova E, Montero A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2003 Sep;57:66–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/sj.ejcn.1601819>
207. Calder PC, Jackson AA. Undernutrition, infection and immune function. *Nutr Res Rev* [Internet]. 2000 Jun;13(1):3–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19087431/>
208. Eckert E. Leukopenia in anorexia nervosa: lack of risk of increased infection. 1978;
209. Nova E, Samartín S, Gómez S, Morandé G, Marcos A. The adaptive response of the immune system to the particular malnutrition of eating

- disorders. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2002 Jul 30;56(3):S34–7. Available from: www.nature.com/ejcn
210. Rytter MJH, Kolte L, Briend A, Friis H, Christensen VB. The immune system in children with malnutrition - A systematic review [Internet]. Vol. 9, *PLoS ONE*. *PLoS One*; 2014. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25153531/>
 211. Golla JA, Larson LA, Anderson CF, Lucas AR, Wilson WR, Tomasi TB. An immunological assessment of patients with anorexia nervosa. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1981;34(12):2756–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6797290/>
 212. Chandra R. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. 1991;
 213. Chandra R. Numerical and functional deficiency in T helper cells in protein energy malnutrition. 1983;
 214. Nájera O, González C, Cortés E, Toledo G, Ortiz R. Effector T lymphocytes in well-nourished and malnourished infected children. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2007 Jun 1;148(3):501–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2249.2007.03369.x>
 215. B D, J L, IC C, R C, G B, U S, et al. A longitudinal analysis of cytokines in anorexia nervosa. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2020 Mar 1;85:88–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31077775/>
 216. Agnello E, Malfi G, Costantino AM, Massarenti P, Pugliese M, Fortunati N, et al. Tumour necrosis factor alpha and oxidative stress as maintaining factors in the evolution of anorexia nervosa. *Eat Weight Disord* [Internet]. 2012 Sep;17(3):e194-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23086255>
 217. Licinio J. Circulating levels of interleukin-2 in patients with anorexia nervosa. No Title. 1991;
 218. Pászthy B, Svec P, Túry F, Kovács L, Vásárhelyi B, Tulassay T TA. Impact of anorexia nervosa on activation characteristics of lymphocytes - *PubMed*. 2007; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17693974/>
 219. Esther Nova Rebato, Ana Elegido LEDP, Patricia Andrés³, Ana Rosa Sepúlveda MG, Ascensión Marcos. Impact of Anorexia Nervosa on

- Immunological Biomarkers. In: *Ann Nutr Metab* [Internet]. 2017. p. 31–79. Available from: www.karger.com/doi/10.1159/000478672
220. Chiappelli F, Gwirtsman HE, Lowy M, Gormley G, Nguyen LD, Nguyen L, et al. Pituitary-adrenal-immune system in normal subjects and in patients with anorexia nervosa: the number of circulating helper T lymphocytes (CD4) expressing the homing receptor Leu8 is regulated in part by pituitary-adrenal products. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 1991;16(5):423–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1725219>
221. Galusca B, Prévost G, Germain N, Dubuc I, Ling Y, Anouar Y, et al. Neuropeptide Y and α -MSH Circadian Levels in Two Populations with Low Body Weight: Anorexia Nervosa and Constitutional Thinness. Challet E, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Mar 23;10(3):e0122040. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0122040>
222. Slotwinska SM, Slotwinski R. Immune disorders in anorexia [Internet]. Vol. 42, *Central European Journal of Immunology*. Termedia Publishing House Ltd.; 2017. p. 294–300. Available from: [/pmc/articles/PMC5708211/](http://pmc/articles/PMC5708211/)
223. Blinder BJ, Cumella EJ, Sanathara VA. Psychiatric comorbidities of female inpatients with eating disorders. *Psychosom Med* [Internet]. 2006 May;68(3):454–62. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006842-200605000-00016>
224. Strober M, Johnson C. The need for complex ideas in anorexia nervosa: Why biology, environment, and psyche all matter, why therapists make mistakes, and why clinical benchmarks are needed for managing weight correction. *Int J Eat Disord* [Internet]. 2012 Mar;45(2):155–78. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eat.22005>
225. Lasselin J, Alvarez-Salas E, Grigoleit J-S. Well-being and immune response: a multi-system perspective. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2016 Aug;29:34–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489216300479>
226. Luz Neto LM da, Vasconcelos FMN de, Silva JE da, Pinto TCC, Sougey ÉB, Ximenes RCC. Differences in cortisol concentrations in adolescents with eating disorders: a systematic review. Vol. 95, *Jornal de Pediatria*. Elsevier Editora Ltda; 2019. p. 18–26.

227. Hasan TF, Hunaid H. Anorexia nervosa: A unified neurological perspective. *Int J Med Sci* [Internet]. 2011;8(8):679–703. Available from: [/pmc/articles/PMC3204438/](#)
228. Claes S. Corticotropin-releasing hormone (CRH) in psychiatry: from stress to psychopathology. *Ann Med*. 2004;36(1):50–61.
229. Chan JL, Mantzoros CS. Role of leptin in energy-deprivation states: Normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa [Internet]. Vol. 366, *Lancet*. Elsevier B.V.; 2005. p. 74–85. Available from: <https://europepmc.org/article/med/15993236>
230. Licinio J, Mantzoros C, Negrão AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB, et al. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med* [Internet]. 1997 May;3(5):575–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142131>
231. Ahlma RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* [Internet]. 1996;382(6588):250–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8717038/>
232. Hebebrand J, Muller TD, Holtkamp K, Herpertz-Dahlmann B. No Title [Internet]. *Molecular Psychiatry Mol Psychiatry*; Jan, 2007 p. 23–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17060920/>
233. Holtkamp K, Mika C, Grzella I, Heer M, Pak H, Hebebrand J, et al. Reproductive function during weight gain in anorexia nervosa. Leptin represents a metabolic gate to gonadotropin secretion. *J Neural Transm* [Internet]. 2003 Apr 1;110(4):427–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12658369/>
234. Gavrilova O, Barr V, Marcus-Samuels B, Reitman M. Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Nov 28;272(48):30546–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9374549/>
235. Zhang J, Matheny MK, Tümer N, Mitchell MK, Scarpace PJ. Leptin antagonist reveals that the normalization of caloric intake and the thermic effect of food after high-fat feeding are leptin dependent. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2007 Feb 28;292(2):R868–74. Available from:

- <http://ajpregu.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpregu.00213.2006>
236. Huang L, Wang Z, Li C. Modulation of Circulating Leptin Levels by Its Soluble Receptor. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Mar 2;276(9):6343–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102451>
237. Yannakoulia M, Yiannakouris N, Blüher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. No Title [Internet]. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism J Clin Endocrinol Metab*; Apr 1, 2003 p. 1730–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12679465/>
238. Liu C, Liu X-J, Barry G, Ling N, Maki RA, De Souza EB. Expression and Characterization of a Putative High Affinity Human Soluble Leptin Receptor. *Endocrinology* [Internet]. 1997 Aug;138(8):3548–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9231810>
239. Kratzsch J, Lammert A, Bottner A, Seidel B, Mueller G, Thiery J, et al. Circulating soluble leptin receptor and free leptin index during childhood, puberty, and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2002 Oct 1;87(10):4587–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12364439/>
240. Krizova J, Papezova H, Haluzikova D, Parizkova J, Jiskra J, Kotrlíkova E, et al. Soluble leptin receptor levels in patients with anorexia nervosa. *Endocr Res* [Internet]. 2002 Aug;28(3):199–205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12489569>
241. Niedźwiedzka B, Jagielska G, Bartoszewicz Z, Kondracka A, Brzozowska A, Karowicz-Bilińska A. [Assessment of neuropeptide Y, leptin and leptin-receptor concentrations in teenagers suffering from anorexia nervosa]. *Ginekol Pol* [Internet]. 2013 Apr;84(4):268–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23700859>
242. Chan JL, Blüher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin observational and interventional studies in humans. *Diabetes* [Internet]. 2002;51(7):2105–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12086939/>
243. Koutkia P, Canavan B, Johnson ML, DePaoli A, Grinspoon S. Characterization of leptin pulse dynamics and relationship to fat mass, growth hormone, cortisol, and insulin. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* [Internet]. 2003 Aug 1;285(2 48-2). Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12721156/>
244. Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: Action, regulation and association to insulin sensitivity [Internet]. Vol. 6, Obesity Reviews. *Obes Rev*; 2005. p. 13–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15655035/>
245. Legroux-Gérot I, Vignau J, Viltart O, Hardouin P, Chauveau C, Cortet B. Adipokines and bone status in a cohort of anorexic patients. *Jt Bone Spine* [Internet]. 2019 Jan 1;86(1):95–101. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29653285/>
246. Housová J, Kiziová J, Anderlova K, Papezová H, Haluzík M. [Serum concentrations of adiponectin in patients with restrictive and purgative subtype of mental anorexia]. *Cas Lek Cesk* [Internet]. 2005;144(4):278–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15945489>
247. Karczewska-Kupczewska M, Strackowski M, Adamska A, Nikořajuk A, Oziomek E, Górska M, et al. Insulin sensitivity, metabolic flexibility, and serum adiponectin concentration in women with anorexia nervosa. *Metabolism* [Internet]. 2010 Apr;59(4):473–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19846178/>
248. Modan-Moses D, Stein D, Pariente C, Yaroslavsky A, Ram A, Faigin M, et al. Modulation of adiponectin and leptin during refeeding of female anorexia nervosa patients. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2007;92(5):1843–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17327386/>
249. Delporte ML, Brichard SM, Hermans MP, Beguin C, Lambert M. No Title. 2003 Jan;58(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12519408/>
250. Delporte ML, Brichard SM, Hermans MP, Beguin C, Lambert M. Hyperadiponectinaemia in anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2003;58(1):22–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12519408/>
251. Nogueira JP, Maraninchi M, Lorec AM, Corroller ABL, Nicolay A, Gaudart J, et al. Specific adipocytokines profiles in patients with hyperactive and/or binge/purge form of anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2010 Aug 19;64(8):840–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20485307/>

252. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: An adipokine regulating glucose and lipid metabolism [Internet]. Vol. 13, Trends in Endocrinology and Metabolism. Trends Endocrinol Metab; 2002. p. 84–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11854024/>
253. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. [Internet]. Vol. 14 Suppl 5, Obesity (Silver Spring, Md.). Obesity (Silver Spring); 2006. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17021375/>
254. Cawthorn WP, Scheller EL, Learman BS, Parlee SD, Simon BR, Mori H, et al. Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. Cell Metab [Internet]. 2014 Aug 5;20(2):368–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24998914/>
255. Bredella MA, Fazeli PK, Miller KK, Misra M, Torriani M, Thomas BJ, et al. Increased bone marrow fat in anorexia nervosa. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2009;94(6):2129–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19318450/>
256. Yu YH, Zhu H. Chronological changes in metabolism and functions of cultured adipocytes: A hypothesis for cell aging in mature adipocytes. Am J Physiol - Endocrinol Metab [Internet]. 2004;286(3 49-3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14625202/>
257. Kim Y, Michael AF. Hypocomplementemia in anorexia nervosa. J Pediatr [Internet]. 1975;87(4):582–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1159589/>
258. Wyatt RJ, Farrell M, Berry PL, Forristal J, Maloney MJ, West CD. Reduced alternative complement pathway control protein levels in anorexia nervosa: response to parenteral alimentation. Am J Clin Nutr [Internet]. 1982;35(5):973–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6805290/>
259. Keusch GT, Torun B, Johnston RB, Urrutia JJ. Impairment of hemolytic complement activation by both classical and alternative pathways in serum from patients with kwashiorkor. J Pediatr [Internet]. 1984;105(3):434–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6470864/>
260. White RT, Damm D, Hancock N, Rosen BS, Lowell BB, Usher P, et al. Human adipisin is identical to complement factor D and is expressed at

- high levels in adipose tissue [Internet]. *Journal of Biological Chemistry J Biol Chem*; 1992 p. 9210–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1374388/>
261. Phieler J, Garcia-Martin R, Lambris JD, Chavakis T. The role of the complement system in metabolic organs and metabolic diseases [Internet]. Vol. 25, *Seminars in Immunology*. *Semin Immunol*; 2013. p. 47–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23684628/>
 262. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis [Internet]. Vol. 11, *Nature Immunology*. *Nat Immunol*; 2010. p. 785–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20720586/>
 263. Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation [Internet]. Vol. 9, *Nature Reviews Drug Discovery*. *Nat Rev Drug Discov*; 2010. p. 43–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19960015/>
 264. Mödinger Y, Löffler B, Huber-Lang M, Ignatius A. Complement involvement in bone homeostasis and bone disorders [Internet]. Vol. 37, *Seminars in Immunology*. Academic Press; 2018. p. 53–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29395681/>
 265. Fazeli PK, Klibanski A. Effects of Anorexia Nervosa on Bone Metabolism [Internet]. Vol. 39, *Endocrine Reviews*. Oxford University Press; 2018. p. 895–910. Available from: </pmc/articles/PMC6226604/>
 266. Misra M, Klibanski A. Anorexia nervosa and bone [Internet]. Vol. 221, *Journal of Endocrinology*. BioScientifica Ltd.; 2014. p. R163–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24898127/>
 267. Hearnshaw S, Thompson NP, McGill A. The Epidemiology of hyperferritinaemia. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2006 Sep 28;12(36):5866–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17007054/>
 268. Maltos AL, Portari GV ME and da CD. Increased Serum Ferritin and Decreased Serum Haptoglobin Levels Developing in a 40y Old Healthy Man Fasting for 3-Weeks [Internet]. 2016. Available from: <http://anncaserep.com/>
 269. Swenne I. Haematological changes and iron status in teenage girls with

- eating disorders and weight loss - The importance of menstrual status. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2007 Apr;96(4):530–3.
270. Moore C, Ormseth M, Fuchs H. Causes and significance of markedly elevated serum ferritin levels in an academic medical center. *J Clin Rheumatol*. 2013 Sep;19(6):324–8.
271. Russell DM, Prendergast PJ, Darby PL, Garfinkel PE, Whitwell J, Jeejeebhoy KN. A comparison between muscle function and body composition in anorexia nervosa: The effect of refeeding. *Am J Clin Nutr*. 1983;38(2):229–37.
272. Licinio J, Wong ML, Gold PW. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anorexia nervosa. In: *Psychiatry Research*. Elsevier Ireland Ltd; 1996. p. 75–83.
273. Misra M, Klibanski A. Endocrine consequences of anorexia nervosa. *Lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. 2014 Jul;2(7):581–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24731664>
274. Wimpfheimer C, Saville E, Voirol MJ, Danforth E, Burger AG. Starvation-induced decreased sensitivity of resting metabolic rate to triiodothyronine. *Science (80-)* [Internet]. 1979;205(4412):1272–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/224460/>
275. Gardner DF, Kaplan MM, Stanley CA, Utiger RD. Effect of Tri-iodothyronine Replacement on the Metabolic and Pituitary Responses to Starvation. *N Engl J Med* [Internet]. 1979 Mar 15;300(11):579–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/105290/>
276. Schebendach JE, Golden NH, Jacobson MS, Hertz S, Shenker IR. The metabolic responses to starvation and refeeding in adolescents with anorexia nervosa. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1997 May;817(1 Adolescent Nu):110–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1997.tb48200.x>
277. Onur S, Haas V, Bosy-Westphal A, Hauer M, Paul T, Nutzinger D, et al. L-tri-iodothyronine is a major determinant of resting energy expenditure in underweight patients with anorexia nervosa and during weight gain. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2005 Feb;152(2):179–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15745923/>
278. Kiyohara K, Tamai H, Takaichi Y, Nakagawa T, Kumagai LF. Decreased

- thyroidal triiodothyronine secretion in patients with anorexia nervosa: Influence of weight recovery. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1989;50(4):767–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2508460/>
279. Boyar RM, Katz J, Finkelstein JW, Kapen S, Weiner H, Weitzman ED, et al. Anorexia Nervosa: Immaturity of the 24-Hour Luteinizing Hormone Secretory Pattern. *N Engl J Med* [Internet]. 1974;291(17):861–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4412035/>
280. Monteleone P, Di Lieto A, Tortorella A, Longobardi N, Maj M. Circulating leptin in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa or binge-eating disorder: Relationship to body weight, eating patterns, psychopathology and endocrine changes. *Psychiatry Res* [Internet]. 2000 May 15;94(2):121–9. Available from: <https://europepmc.org/article/med/10808037>
281. Miller KK. Endocrine dysregulation in anorexia nervosa update [Internet]. *J Clin Endocrinol Metab*; Oct, 2011. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21976742/>
282. Butera PC. Estradiol and the control of food intake. *Physiol Behav* [Internet]. 2010 Feb 9;99(2):175–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19555704/>
283. Miller KK, Wexler TL, Zha AM, Lawson EA, Meenaghan EM, Misra M, et al. Androgen Deficiency: Association With Increased Anxiety and Depression Symptom Severity in Anorexia Nervosa. *J Clin Psychiatry* [Internet]. 2007 Jun 15;68(6):0–0. Available from: <https://www.psychiatrist.com/jcp/eating/androgen-deficiency-association-increased-anxiety>
284. Misra M, Katzman DK, Estella NM, Eddy KT, Weigel T, Goldstein MA, et al. Impact of physiologic estrogen replacement on anxiety symptoms, body shape perception, and eating attitudes in adolescent girls with anorexia nervosa: Data from a randomized controlled trial [Internet]. Vol. 74, *Journal of Clinical Psychiatry*. Physicians Postgraduate Press Inc.; 2013. p. 0–0. Available from: <https://www.psychiatrist.com/jcp/mental/child/impact-physiologic-estrogen-replacement-anxiety-symptoms>
285. Haas V, Onur S, Paul T, Nutzinger DO, Bosy-Westphal A, Hauer M, et al. Leptin and body weight regulation in patients with anorexia nervosa before and during weight recovery. *Am J Clin Nutr* [Internet].

- 2005;81(4):889–96. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15817868/>
286. Baskin DG, Seeley RJ, Kuijper JL, Lok S, Weigle DS, Erickson JC, et al. Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting. *Diabetes* [Internet]. 1998;47(4):538–43. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9568684/>
287. Bennett PA, Lindell K, Karlsson C, Robinson ICAF, Carlsson LMS, Carlsson B. Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: Effects of fasting and oestrogen. *Neuroendocrinology* [Internet]. 1998;67(1):29–36. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9485166/>
288. Yamada R, Odamaki S, Araki M, Watanabe T, Matsuo K, Uchida K, et al. Dietary protein restriction increases hepatic leptin receptor mRNA and plasma soluble leptin receptor in male rodents. *PLoS One*. 2019 Jul 1;14(7).
289. Holtkamp K, Hebebrand J, Mika C, Heer M, Heussen N, Herpertz-Dahlmann B. High serum leptin levels subsequent to weight gain predict renewed weight loss in patients with anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 2004 Jul;29(6):791–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15110928/>
290. Kim Y, Hersch J, Bodell LP, Schebendach J, Hildebrandt T, Walsh BT, et al. The association between leptin and weight maintenance outcome in anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* [Internet]. 2021 Apr 1;54(4):527–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33185933/>
291. Buckert M, Stroe-Kunold E, Friederich HC, Wesche D, Walter C, Kopf S, et al. Time course of adiponectin and its relationship to psychological aspects in patients with anorexia nervosa during inpatient treatment. *PLoS One* [Internet]. 2017 Dec 1;12(12). Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29261731/>
292. Tyszkiewicz-Nwafor M, Slopian A, Dmitrzak-Węglarz M, Rybakowski F. Adiponectin and resistin in acutely ill and weight-recovered adolescent anorexia nervosa: Association with psychiatric symptoms. *World J Biol Psychiatry*. 2019 Oct 21;20(9):723–31.
293. Rantala MJ, Luoto S, Krama T, Krams I. *Eating Disorders: An Evolutionary*

- Psychoneuroimmunological Approach. *Front Psychol.* 2019;0(OCT):2200.
294. JR K, PJ K, JF C, TG D, G C, NP H. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015 Oct 14;9(OCT). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26528128/>

ANEXOS

ANEXOS

**Anexo 1- Modelo de consentimiento informado entregado a
participantes**

Anexo 2- Permisos de las imágenes

Anexo 3- Publicaciones

Hoja de información al paciente

CURSO CLÍNICO Y VARIABLES PREDICTORAS DE EVOLUCIÓN EN LOS TRASTORNOS DE ALIMENTACIÓN DE INICIO EN LA ADOLESCENCIA

Antes de que accedas a tomar parte en este estudio, es importante que comprendas en qué consiste. Esta hoja de información explica las características del estudio. Si no comprendieras alguna palabra, frase o expresión de estas páginas, por favor, pídele al médico del estudio que explique la información que no entiendes. Es importante que preguntes todas las dudas que puedas tener. Cuando hayas comprendido toda la información, se te pedirá a ti y a tus padres o tutores que firméis un documento de consentimiento informado, que es necesario para participar en el estudio.

Propósito y objetivo del estudio:

Los trastornos de alimentación son enfermedades mentales que se inician y afectan a la población adolescente. La aparición de la enfermedad está asociada a alteraciones en el desarrollo físico, psicológico, social y familiar de estos pacientes.

Así en este estudio, intentamos analizar los factores que están asociados al inicio y evolución de los trastornos de alimentación. Este estudio tendrá una duración de 2 años lo que permitirá evaluar los factores predictores de la enfermedad en los pacientes diagnosticados de anorexia nerviosa o trastorno de alimentación no especificado durante este periodo. Es importante el estudio de estos factores para mejorar los programas de tratamiento y conocer el curso clínico del trastorno.

Los objetivos específicos del estudio son la evaluación de:

- la psicopatología específica alimentaria (síntomas de la enfermedad)
 - la psicopatología comórbida (síntomas relacionados como ansiedad, depresión)
 - los factores familiares (crianza, organización familiar, hábitos...)
 - los factores neurobiológicos (peso, hormonas),
- y su posible papel predictor de la evolución del trastorno.

Estos factores serán evaluados mediante las siguientes exploraciones (historia clínica, medidas antropométricas, entrevistas y cuestionarios, analítica sanguínea, densitometría, electrocardiograma).

Procedimientos y explicación del estudio:

En este estudio pretendemos evaluar 100 pacientes entre 12 y 17 años que cumplan criterios de inclusión y decidan participar en el estudio. Las evaluaciones se llevarán a cabo en distintos momentos a lo largo de 2 años: al inicio y a los 6, 12, 18 y 24 meses. En estas visitas se recogerán:

- En la *Sección de Psiquiatría y Psicología* del Hospital Niño Jesús se realizará: la historia clínica (datos sociodemográficos, antecedentes médicos y psiquiátricos), entrevistas psiquiátricas y cuestionarios y las mediciones antropométricas (peso, talla, Índice de Masa Corporal, pliegue tricípital y subescapular, circunferencia media del brazo y circunferencia media muscular del brazo). A los familiares se les realizarán entrevistas psiquiátricas y cuestionarios.
- Se realizará una analítica sanguínea que será procesada:
 - o En el *Servicio de Análisis Clínicos* del Hospital Niño Jesús (hemograma, bioquímica, hormonas)(5 ml de sangre venosa)

- En el *Departamento de Metabolismo y Nutrición*. Instituto del Frío. CSIC (para determinación de adipocitokinas) (5 ml de sangre venosa)
- En la *Sección de Cardiología* del Hospital Niño Jesús se realizará: Electrocardiograma (ECG) que es un procedimiento sencillo y rápido que registra la actividad eléctrica del corazón.
- En el *Servicio de Radiología*, del Hospital Santa Cristina se realizará una densitometría (DEXA)(como es habitual en el protocolo de Trastornos de Alimentación de nuestro hospital). Es un sistema de Rx de baja potencia con el que se puede medir la densidad de calcio de los huesos. Nos ofrece datos sobre la posible presencia de osteoporosis y el riesgo de fracturas óseas.

Tanto el ECG como la densitometría no producen ninguna molestia. La persona permanece tumbada y debe mantenerse relajada, respirando normalmente, sin hacer movimientos con los brazos o las piernas y procurando no hablar.

Las pruebas a realizar en los distintos momentos aparecen en la tabla, siendo importante la participación en todas las fases del estudio.

	INICIO	MES 6	MES 12	MES 18	MES 24
PACIENTE	<ul style="list-style-type: none"> - Variables clínicas - Entrevistas diagnósticas - Evaluación antropométrica - Determinaciones analíticas - Densitometría - ECG 	<ul style="list-style-type: none"> - Variables clínicas - Evaluación psicométrica - Evaluación antropométrica - Determinaciones analíticas - ECG 	<ul style="list-style-type: none"> - Variables clínicas - Entrevistas diagnósticas - Evaluación antropométrica - Determinaciones analíticas - ECG 	<ul style="list-style-type: none"> - Variables clínicas - Evaluación psicométrica - Evaluación antropométrica - Determinaciones analíticas - ECG 	<ul style="list-style-type: none"> - Variables clínicas - Entrevistas diagnósticas - Evaluación antropométrica - Determinaciones analíticas - Densitometría - ECG
FAMILIA	<ul style="list-style-type: none"> - Entrevistas diagnósticas - Evaluación psicométrica 				<ul style="list-style-type: none"> - Entrevistas diagnósticas - Evaluación psicométrica

Riesgos y beneficios:

Se considera un estudio de mínimo riesgo ya que las pruebas que en él se realizan (cuestionarios, análisis de sangre, electrocardiograma, densitometría) conllevan un riesgo de complicaciones mínimo.

La extracción sanguínea podría tener como consecuencia la formación de un pequeño hematoma en el antebrazo que se reabsorbería en uno o dos días.

Te beneficiarás de un seguimiento cercano, con la posibilidad de estar informada en todo momento tanto tu como tu familia de los resultados de las pruebas realizadas.

Confidencialidad:

Sólo los médicos investigadores tendrán acceso a los datos obtenidos de cada paciente. La comunicación de los resultados no irá acompañada en ningún momento de tu nombre ni de ningún otro dato que pueda conducir a tu identificación.

Los datos serán protegidos según la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter Personal y el Real Decreto 223/2004.

Coste/ Compensación:

Las pruebas realizadas durante el estudio no te ocasionarán gasto alguno. No percibirás compensación económica por participar en este estudio.

Alternativas a la participación:

Tu participación en este estudio es completamente voluntaria, y la no participación no supondrá ningún cambio en la calidad de la atención sanitaria que recibas.

Derecho al abandono del estudio:

Tienes derecho a abandonar el estudio en cualquier momento sin que suponga cambio alguno en el tratamiento o cuidados recibidos. Tu familia y tú seréis informados sobre cualquier dato relevante del estudio que pudiera condicionar tu permanencia o abandono del mismo.

Preguntas e información:

Si deseas recibir mayor información o necesitas de alguna aclaración, por favor, ponte en contacto con:

Dra. Montserrat Graell Berna
Sección de Psiquiatría y Psicología
Hospital Infantil Universitario Niño Jesús
Avda. Menéndez Pelayo, 65 28009 MADRID
Tfno: 91 5035925

FIRMA DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

**ESTUDIO: CURSO CLÍNICO Y VARIABLES PREDICTORAS DE EVOLUCIÓN EN
LOS TRASTORNOS DE ALIMENTACIÓN DE INICIO EN LA
ADOLESCENCIA**

INVESTIGADOR PRINCIPAL: MONTSERRAT GRAELL BERNA

**CENTRO: SECCIÓN DE PSIQUIATRÍA Y PSICOLOGÍA
HOSPITAL INFANTIL UNIVERSITARIO NIÑO JESÚS. MADRID
TFNO-91 5035925**

Por favor, lee detenidamente este apartado y, si estás conforme, firma y pon la fecha en la casilla preparada para ello más abajo.

1. Se me han facilitado los detalles y riesgos conocidos de los procedimientos del estudio que puedo realizar.
2. Comprendo que soy libre de acceder o negarme a participar y que puedo suspender mi participación en cualquier momento sin dar explicaciones y sin que ello afecte al seguimiento de mi tratamiento. Conservaré todos mis derechos a recibir tratamiento.
3. Accedo a que los datos recogidos en el estudio se utilicen con los fines descritos, incluida la transferencia de datos y su procesado con respeto del anonimato y de la confidencialidad de mis datos personales.
4. Accedo a que se permita el acceso directo a mis documentos médicos a personas autorizadas, así como a las autoridades competentes.
5. He leído y comprendido la información presentada en este documento. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido respondidas.
6. He recibido una copia de: la hoja de información al paciente (3 páginas mecanografiadas por una sola cara) y de este documento de consentimiento informado (1 página mecanografiada por una sola cara), firmada y fechada en la página 4.

ACCEDO LIBREMENTE A PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO

A firmar simultáneamente, es decir, en la misma fecha, por todas las partes:

NOMBRE DEL PARTICIPANTE (CON MAYÚSCULAS)	FECHA	FIRMA
---	-------	-------

NOMBRE DEL PADRE, MADRE O TUTOR (CON MAYÚSCULAS)	FECHA	FIRMA
---	-------	-------

NOMBRE DEL MÉDICO	FECHA	FIRMA
-------------------	-------	-------

Distribución: original para el médico del estudio, copia para el paciente

Permiso Figura afectación endocrina

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 02, 2021

This Agreement between Ana María Elegido ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number

5120920611497

License date

Aug 02, 2021

Licensed Content Publisher

Elsevier

Licensed Content Publication

Metabolism

Licensed Content Title

Skeletal complications of eating disorders

Licensed Content Author

Abigail A. Donaldson, Catherine M. Gordon

Licensed Content Date

Sep 1, 2015

Licensed Content Volume

64

Licensed Content Issue

9

Licensed Content Pages

9

Start Page

943

End Page

951

Type of Use

reuse in a thesis/dissertation

Portion

figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations

1

Format

electronic

Are you the author of this Elsevier article?

No

Will you be translating?

No

Title

Ana María Elegido Fluiters

Institution name

Universidad Europea Madrid. Spain

Expected presentation date

Sep 2021

Order reference number

335268213

Portions

fig 5

Requestor Location

Ana María Elegido
Calle Ferraz numero 30,
3 Izq

Madrid, Madrid 28008
Spain
Attn: Ana María Elegido

Publisher Tax ID

GB 494 6272 12

Total

0.00 EUR

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit -

"Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and

embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing.

Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US)
or +1-978-646-2777.

Permiso Figura Clasificación Sistema Inmunológico

KARGER PUBLISHERS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 30, 2021

This Agreement between Ana María Elegido ("You") and Karger Publishers ("Karger Publishers") consists of your license details and the terms and conditions provided by Karger Publishers and Copyright Clearance Center.

License Number 5118960578305

License date Jul 30, 2021

Licensed Content Publisher Karger Publishers

Licensed Content Publication Annals of Nutrition and Metabolism

Licensed Content Title Contribution of Selected Vitamins and Trace Elements to Immune Function

Licensed copyright line

Copyright © 2007, © 2007 S. Karger AG, Basel

Licensed Content Author

Wintergerst Eva S., Maggini Silvia, Hornig Dietrich H.

Licensed Content Date Aug 28, 2007

Licensed Content Volume 51

Licensed Content Issue 4

Type of Use Thesis/Dissertation

Requestor type editor/author of the requested content

Format Electronic

Portion figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations 1

Include Image file no

Rights for Main product

Duration of use Life of current edition/presentation

Creation of copies for the disabled no

With minor editing privileges no

In the following language(s) Original language of publication

The lifetime unit quantity of new product 100

Title Ana María Elegido Fluiters

Institution name Universidad Europea Madrid. Spain

Expected presentation date Jul 2021

Order reference number 33526821

Portions Fig 1

The requesting person/organization Ana Elegido Fluiters

Requestor Location

Ana María Elegido
Calle Ferraz numero 30,
3 Izq

Madrid, Madrid 28008
Spain
Attn: Ana María Elegido

Publisher Tax ID

980406204

Total

0.00 EUR

Terms and Conditions

STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL

Introduction

The Publisher for this copyrighted material is Karger Publishers. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your CCC account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>.

Limited License

Publisher hereby grants to you a non-exclusive license to use this material. Licenses are for one-time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process. It is explicitly forbidden to reuse and/or translate a complete book or journal issue by separately obtaining permission for each book chapter or journal article. Any further use, edition, translation or distribution, either in print or electronically requires written permission again and may be subject to another permission fee. This permission applies only to copyrighted content that Karger Publishers owns, and not to copyrighted content from other sources. If any material in our work appears with credit to another source, you must also obtain permission from the original source cited in our work. All content reproduced from copyrighted material owned by Karger Publishers remains the sole and exclusive property of Karger Publishers. The right to grant permission to a third party is reserved solely by Karger Publishers.

Geographic Rights

Licenses may be exercised anywhere in the world with particular exceptions in China.

Altering/Modifying Material

- You may not alter or modify the material in any manner (except that you may use, within the scope of the license granted, one or more excerpts from the copyrighted material, provided that the process of excerpting does not alter the meaning of the material or in any way reflect negatively on the Publisher or any writer of the material), nor may you translate the material into another language, unless your license specifically grants translation rights.
- Other minor editing modifications are allowed when reusing figures/tables and illustrations (e.g. redesigning, reformation, coloring/recoloring) and can be made at the Licensee's discretion.

Reservation of Rights

All rights reserved. Publisher hereby grants to you a non-exclusive license to use this material. Licenses are for one-time use exclusively. No part of this publication may be translated into other languages, reproduced or utilized in any form or by any means, electronically or mechanically, including photocopying, recording, micro-copying, or by any information storage and retrieval system, without permission in writing from the Publisher.

License Contingent on Payment

While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

Copyright Notice

- You must give full credit to the original source of the article/book chapter and include the following copyright notice in connection with any reproduction of the licensed material: "Copyright © 2012 (or other relevant year) Karger Publishers, Basel, Switzerland."
- In case of translations you must additionally include the following disclaimer: "The article/book chapter printed herein has been translated into (relevant language) from the original by (Name of Licensee). KARGER PUBLISHERS CANNOT BE HELD RESPONSIBLE FOR ANY ERRORS OR INACCURACIES THAT MAY HAVE OCCURRED DURING TRANSLATION. THIS ARTICLE/BOOK CHAPTER IS COPYRIGHT PROTECTED AND ANY FURTHER DISTRIBUTION REQUIRES A WRITTEN CONSENT FROM KARGER PUBLISHERS."

Warranties

Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material and adopts on its

own behalf the limitations and disclaimers established by CCC on its behalf in its Billing and Payment terms and conditions for this licensing transaction.

Indemnity

You hereby indemnify and agree to hold harmless Publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

No Transfer of License

This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without Publisher's written permission.

No Amendment Except in Writing

This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of Publisher, by CCC on Publisher's behalf).

Objection to Contrary Terms

Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and Publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

Content Delivery

- Content Delivery Requested content such as a figure/table/cover or PDF of a full article will be provided to you by the Publisher directly via e-mail in high resolution quality.
- Delivery will be processed within five (5) working days from the date of your purchase.
- Subsequent cancellations of content delivery orders cannot be considered and will not be refunded.

Excluded Grants

- Exclusivity.
- Reuse/Translation of a complete book or journal issue.
- Reuse in another or in a future Edition.
- Reuse beyond the limitations within the license's scope, such as e.g. beyond the granted number of copies, beyond the granted format, beyond the chosen foreign language.
- Reuse of contents copyrighted by a third party without obtaining permission from the third party.
- Make any data available and authorize others to reuse the materials.

Karger Publishers Open Access Policy

Karger Open Access articles can be read and shared for all noncommercial purposes on condition that the author and journal are properly acknowledged. For most Open Access articles, the [Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported license \(CC BY-NC\)](#) applies. For commercial use however permission needs to be obtained.

For research funded by the Wellcome Trust, Research Councils UK (RCUK) and other organizations with the same requirements, papers are published under the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported \(CC BY 3.0\) license](#). **Service Description for Content Services**

Subject to these terms of use, any terms set forth on the particular order, and payment of the applicable fee, you may make the following uses of the ordered materials:

- **Content Rental:** You may access and view a single electronic copy of the materials ordered for the time period designated at the time the order is placed. Access to the materials will be provided through a dedicated content viewer or other portal, and access will be discontinued upon expiration of the designated time period. An order for Content Rental does not include any rights to print, download, save, create additional copies, to distribute or to reuse in any way the full text or parts of the materials.

The materials may be accessed and used only by the person who placed the Order or the person on whose behalf the order was placed and only in accordance with the terms included in the particular order.

Other Terms and Conditions: v1.3

Permiso Figura Eje HPA

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Aug 02, 2021

This Agreement between Ana María Elegido ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number

5120911482742

License date

Aug 02, 2021

Licensed Content Publisher

Elsevier

Licensed Content Publication

Computers in Biology and Medicine

Licensed Content Title

Dynamics of the HPA axis and inflammatory cytokines: Insights from mathematical modeling

Licensed Content Author

Hamed Malek, Mohammad Mehdi Ebadzadeh, Reza Safabakhsh, Alireza Razavi, Jalal Zaringhalam

Licensed Content Date

Dec 1, 2015

Licensed Content Volume

67

Licensed Content Issue

n/a

Licensed Content Pages

12

Start Page

1

End Page

12

Type of Use

reuse in a thesis/dissertation

Portion

figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations

1

Format

electronic

Are you the author of this Elsevier article?

No

Will you be translating?

No

Title

Ana María Elegido Fluiters

Institution name

Universidad Europea Madrid. Spain

Expected presentation date

Sep 2021

Order reference number

335268212

Portions

figure 1

Requestor Location

Ana María Elegido
Calle Ferraz numero 30,
3 Izq

Madrid, Madrid 28008
Spain
Attn: Ana María Elegido

Publisher Tax ID

GB 494 6272 12

Total

0.00 EUR

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available

only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do

- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available

at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.nrjournal.com

Original Research

Increased naive CD4⁺ and B lymphocyte subsets are associated with body mass loss and drive relative lymphocytosis in anorexia nervosa patients



Ana Elegido^a, Montserrat Graell^{b,c}, Patricia Andrés^b, Alina Gheorghe^a, Ascensión Marcos^a, Esther Nova^{a,*}

^a Immunonutrition Research Group, Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN)–CSIC, C/José Antonio Novais 10, 28040, Madrid, Spain

^b Eating Disorders Unit, Child and Adolescent Psychiatry and Psychology Department, Children University Hospital Niño Jesús, Av Menéndez Pelayo, 65, 28009 Madrid, Spain

^c CIBERSAM, Biomedical Research Networking Centre for Mental Health, Ministry of Health, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2016

Revised 12 December 2016

Accepted 3 February 2017

Keywords:

Anorexia nervosa

Body mass loss

Lymphocyte subsets

Relative lymphocytosis

White blood cells

ABSTRACT

Anorexia nervosa (AN) is an atypical form of malnutrition with peculiar changes in the immune system. We hypothesized that different lymphocyte subsets are differentially affected by malnutrition in AN, and thus, our aim was to investigate the influence of body mass loss on the variability of lymphocyte subsets in AN patients. A group of 66 adolescent female patients, aged 12–17 years, referred for their first episode of either AN or feeding or eating disorders not elsewhere classified were studied upon admission (46 AN-restricting subtype, 11 AN-binge/purging subtype, and 9 feeding or eating disorders not elsewhere classified). Ninety healthy adolescents served as controls. White blood cells and lymphocyte subsets were analyzed by flow cytometry. Relationships with the body mass index (BMI) z score were assessed in linear models adjusted by diagnostic subtype and age. Leukocyte numbers were lower in AN patients than in controls, and relative lymphocytosis was observed in AN-restricting subtype. Lower CD8⁺, NK, and memory CD8⁺ counts were found in eating disorder patients compared with controls. No differences were found for CD4⁺ counts or naive and memory CD4⁺ subsets between the groups. Negative associations between lymphocyte percentage and the BMI z score, as well as between the B cell counts, naive CD4⁺ percentage and counts, and the BMI z score, were found. In conclusion, increased naive CD4⁺ and B lymphocyte subsets associated with body mass loss drive the relative lymphocytosis observed in AN patients, which reflects an adaptive mechanism to preserve the adaptive immune response.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: AN, anorexia nervosa; ANOVA, analysis of variance; ANP, anorexia nervosa binge/purging subtype; ANR, anorexia nervosa restricting subtype; BMI, body mass index; CD3⁺, mature T cells; CD4⁺, helper T cells; CD8⁺, cytotoxic T cells; CD19⁺, B cells; CD3⁺(CD16⁺56⁺), natural killer cells; CD45RA⁺, naive cells; CD45RO⁺, memory cells; DSM, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*; ED, eating disorder; FED-NEC, feeding or eating disorder not elsewhere classified; NK, natural killer; WBC, white blood cell.

* Corresponding author at: Institute of Food Science, Technology and Nutrition, ICTAN-CSIC, C/José Antonio Novais 10, 28040, Madrid, Spain. Tel.: +34 915492300; fax: +34 915493627.

E-mail address: enova@ictan.csic.es (E. Nova).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2017.02.006>

0271-5317/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Eating disorders (EDs) are mental disorders characterized by abnormal cognitions, attitudes, and behaviors toward food and body weight and shape. This results in severe physical and psychological complications. Studies on hematological and immune variables have disclosed some features of an impaired immune system status, including an increased frequency of leucopenia with relative lymphocytosis [1,2], delayed hypersensitivity skin test response [1,3], and an impaired cytokine production in response to a stimulus when compared with a control group [4]. *Relative lymphocytosis* refers to an increased percentage in peripheral lymphocytes among the white blood cells (WBCs) while absolute lymphocyte number is normal [5]. Regarding lymphocyte subsets in ED patients, a rather scarce number of studies have been published [1,6–12], and the findings are not consistent. Some of these studies have important drawbacks derived from the heterogeneity of the participating patients, including issues like age [7,8], duration of the disease [7], subtype of anorexia nervosa (AN) or ED categories [6–9], and history of dieting [13].

According to the diagnostic criteria established in the *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM) [14], AN is a disorder characterized by a persistent restriction of energy intake leading to significantly low body weight, an intense fear of fatness, and a disturbed perception of body image; in bulimia nervosa, the distinguishing feature is binge eating, accompanied with compensatory behaviors, and both syndromes differ in their effects on body weight and nutritional status. Besides, vomiting episodes can be considered to be one of the most common stress-inducing bulimic features that might have an influence on the immune system [15]. Feeding or eating disorders not elsewhere classified (FEDs-NEC) include patients that do not meet full criteria for a specific ED but still present some of their clinical features, although less severe or frequent. In addition, bulimia nervosa has recently been described as a continuum of the disease in former patients with AN [16], and for this reason, the mean age is superior compared with patients with AN. Within the AN disorder, 2 subtypes have been defined: the restricting type and the binge-purging type, the last one presenting binge-eating and/or purging behavior (eg, self-induced vomiting; misuse of laxatives, diuretics, or enemas).

In AN, immune disturbances are most likely the result of nutritional deprivation, and in this sense, normalization with refeeding and clinical recovery have been reported [9,13]. The extent of the immune and metabolic changes depends on the duration and severity of the reduced food intake and the amount of weight lost [11,12,17]. As a result, different WBC types might be differentially affected by the degree of malnutrition. Moreover, recent research suggests that other factors different from weight and linked with alterations in hormones and neuropeptides involved in appetite and satiety control may play an important role in explaining some of the immune system abnormalities [18]. Considering all of the above, we hypothesize that different immune cells and specifically lymphocyte subsets are differentially affected by the malnutrition severity. Thus, the aim of this study was to assess the influence of body mass loss on the variability of lymphocyte subsets in ED patients.

2. Methods and materials

2.1. Participants

The sample size for this study was calculated taking lymphocyte percentage as the main outcome, assuming a mean \pm standard deviation of 34.23 ± 8.96 (%) in healthy female adolescents [1], and considering a 12% mean change (4%) over the values in the population as relevant. For an unbalanced allocation ratio between control and patients groups (1.36), an estimated mean difference of 12% with equal variances, 80% statistical power, and an α error of .05, the minimum number of measures to perform is 156, distributed 90 to 66 in control and patients groups, respectively.

Sixty-six adolescent female patients diagnosed with EDs were recruited upon admission at the Eating Disorders Unit at Niño Jesús Children University Hospital in Madrid, Spain, to participate in a comprehensive study of clinical, family, and biological variables involved in prognosis of ED (Anorexia Nervosa en Adolescentes. Biomarcadores de Evolución Longitudinal study). The following inclusion criteria were taken into account: (1) female sex, (2) age range between 12 and 17 years, (3) first episode of ED, (4) first admission for ED treatment [19,20], and (5) acceptance to participate in the study. One hundred and five patients were first screened for inclusion in the study during the years of 2010 to 2012; twenty-six were excluded because they did not fulfill all inclusion criteria, and 13 patients rejected to participate in the study. The patients were classified as AN-restricting subtype (ANR; $n = 46$), AN-binge/purging subtype (ANP; $n = 11$), or FED-NEC ($N = 9$), according to the DSM-V criteria [14]. The patients were initially diagnosed according to DSM-IV-TR criteria [21] by clinical interview performed by clinical experts but were later reclassified according to the DSM-V [14,22] to be in line with current operational criteria. This fact allowed to reduce the number of patients with no otherwise specified category [23] from 17 to 9 patients. The control group consisted of 90 healthy adolescents, free of psychiatric or somatic disease as answered in autoadministered and parent's questionnaires, with the same sex, age, and socioeconomic status who participated in the AFINOS epidemiological study [24]. No patient included in the study had had any vaccine administered within the 6 weeks prior to the day of blood sampling, nor had they been hospitalized for infections or other illnesses. Most of the patients at study enrollment had been recently admitted for in-hospital treatment (75.76%), and a lower number were admitted to follow home care hospitalization (21.20%) and outpatient treatment (3.03%). Seventy-one percent of in-patients were at or below 10th body mass index (BMI) for age percentile [25]. Participants and parents gave their full and informed consent once the purpose and nature of the study had been explained. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, the rules of Good Clinical Practice, and the Spanish law 14/2007 on Biomedical Research. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Niño Jesús Children University Hospital.

2.2. Anthropometric measurements

All patients and controls underwent anthropometrical assessment by standard procedures (without shoes and with

underwear clothes) measured by a trained investigator. Patients' measurements were performed on their first day of admission or on the following day using a digital electronic weighing scale (Seca 780 [Hamburg, Deutschland]; 0.100-g precision) with an incorporated telescopic measuring rod (Seca 220), and the measurements were recorded to the nearest 0.5 cm. From these data, BMI (weight [kg]/height² [m²]) and z score of the BMI were calculated according to the Spanish growth reference charts [25].

2.3. Blood analyses

Venous blood samples were obtained from patients and controls between 8:00 and 9:00 AM, after overnight fasting, the next day after enrollment, and they were collected in EDTA-K3E Vacutainer (BD Biosciences, San José, CA, USA) tubes. WBC counts and differentials (percentages and absolute number of white cell types) were determined in patients and control subjects with an automated blood cell counter (ADVIA 120 [Siemens Healthcare, Madrid, España]) and an automatic counter (H1 Technicon [Bayer] Tarrytown, New York, USA), respectively. Blood samples from patients were diluted 1:1 with Cytochex Reagent (Streck Laboratories, Omaha, NE, USA), a preservative that was used to expand the number of suitable days for blood processing. Subsequently, immune phenotyping analysis of the samples was performed within 7 days from collection. Blood aliquots were incubated for 30 minutes at room temperature in the dark with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences) to differentially label those cells positive for the following surface markers: CD45 (pan-leukocyte marker), CD3 (T mature cells), CD4 (helper T cells), CD8 (cytotoxic T cells), CD19 (B cells), CD16⁺56 (natural killer [NK] cells), CD45RO (memory cells), and CD45RA (naive cells) [26]. A quadruple immunostaining procedure was performed with the following combinations: CD3/CD8/CD45/CD4, CD45RA/CD45RO/CD8/CD3, CD45RA/CD45RO/CD4/CD3, and CD3/CD16⁺56/CD45/CD19. The antibody in each position was marked with a fluorochrome as follows: FITC/PE/PerCP-Cy5.5/APC. After lysis of the red blood cells, the lymphocytes were analyzed by flow cytometry (FACScan Plus Dual Laser, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). The percentage of each lymphocyte subset was obtained, and absolute cell counts were calculated from the total lymphocyte numbers. The CD4⁺/CD8⁺ ratio was also calculated.

2.4. Statistical analyses

Prior to statistical analyses, all data were examined for normal distributions with the Kolmogorov-Smirnov test as well as for homogeneity of variances with the Levene test. When necessary, the normal distribution was obtained after logarithmic transformation of the variable. The differences between the whole group of ED patients (ED) and the control group, as well as the differences between each one of the different subtypes and the control group, were assessed by Student t test. Significant differences between ED diagnostic subtypes were calculated using one-way analysis of variance (ANOVA). When the analysis indicated a significant difference, the Tukey method was used for a pairwise comparison between the different diagnostic subtypes.

To assess the effect of the BMI z score on immunohematological variables, a basic linear regression model was used and corrected by age. In a second model, the diagnostic subtype was also included as a potential influential factor. Differences were considered statistically significant at $P < .05$. Statistical analysis was performed using the IBM SPSS (Armonk, NY, USA) statistical software version 22.

3. Results

The anthropometric measurements tested are summarized in Table 1. BMI and weight were significantly lower in the ED, ANR, ANP, and FED-NEC than in the control group. Among the different diagnostic groups, weight is significantly lower in the ANR and ANP compared with FED-NEC, and BMI is lower in ANR than in the other 2 groups.

Regarding WBCs, lower leukocyte counts were found in ED girls compared with healthy girls ($P = .019$) (Table 2). Both the percentages and total neutrophil, monocyte, and basophil cell numbers were significantly decreased in the ED group vs the control group. On the contrary, a significant increase was observed in the lymphocyte percentage, whereas lymphocyte counts were similar to those in the control group. Comparing the different diagnostic subtypes with the control group separately, a decreasing trend in leukocyte numbers was found in ANR ($P = .074$) and ANP ($P = .091$). The decrease in the monocyte and basophil percentages and counts was observed in all of the diagnostic subtypes, whereas the increase in the lymphocyte percentage was only significant in the ANR group ($P = .007$). In addition, the neutrophil percentage and counts were lower in both ANR and ANP than in the controls; however, in ANP, it did not reach statistical significance because of the small group size. The eosinophil population showed a higher percentage in FED-NEC and ANP ($P = .022$ and $P = .007$, respectively) vs controls, but no differences were found for the eosinophil counts. No relevant differences among ED groups were observed in the different WBC types except for higher eosinophil percentage in ANP compared with ANR.

The assessment of the different lymphocyte subsets (Table 3) showed only a few significant differences among diagnostic groups, whereas important differences were observed in relation to the control group. The whole group of ED patients showed higher CD4⁺ and CD19⁺ lymphocyte percentages and lower CD8⁺ and NK percentages compared with the controls. In relation to the naive and memory subsets percentage, ED patients showed significantly lower CD8RO⁺ and higher CD8RA⁺ percentages than the controls. No significant differences in CD4RA⁺ and CD4RO⁺ percentages were found when compared with controls. When focusing on the different diagnostic subtypes, the formerly described results are also observed in the ANR group. Referring to ANP, the higher CD4⁺ lymphocyte percentage observed in relation to controls is even higher than the one observed in the other 2 subtypes.

Regarding lymphocyte subset counts, it is remarkable that no differences in CD4⁺ and naive and memory CD4⁺ subset counts were observed between the ED subjects and controls. However, lower CD8⁺, NK, and memory CD8⁺ counts were found with an increase in CD19⁺ cell numbers in relation to the control group. By diagnostic subtypes, CD8⁺ cell counts were lower only in the FED-NEC, and CD19⁺ counts were higher only in ANR. The changes in CD4⁺ and CD8⁺ subsets in

Table 1 – Anthropometric parameters in controls and patients with EDs

	Control n = 90	ED n = 66	FED-NEC n = 9	ANP n = 11	ANR n = 46	P value [#]
Age (y)	14.86 ± 1.17	14.62 ± 1.38	14.44 ± 1.24	15.27 ± 1.42	14.50 ± 1.38	.230
Weight (kg)	56.98 ± 8.97	42.08 ± 6.45***	49.92 ± 5.65* ^a	43.92 ± 3.80*** ^b	40.11 ± 5.84*** ^b	<.001
Height (m)	1.63 ± 0.06	1.61 ± 0.07°	1.61 ± 0.05	1.63 ± 0.04	1.61 ± 0.08°	.850
BMI (kg/m ²)	21.29 ± 2.99	16.05 ± 1.84***	19.12 ± 1.23* ^a	16.45 ± 0.75*** ^b	15.36 ± 1.45*** ^c	<.001
Duration of disease (mo)		10.97 ± 8.16	7.11 ± 3.41	15.18 ± 8.85	10.72 ± 8.32	.110

Values are expressed as means ± SD.

Asterisks indicate differences vs control; Student t test: *P < .05, **P < .01, ***P < .001, °P < .1.

[#]ANOVA among ED groups.

Different letters indicate significant differences between ED groups. Tukey test; P < .05.

ED led to a significantly higher ratio of CD4⁺:CD8⁺ in the patients (and in all the different subtypes) than in the control group. ANP and ANR showed higher naive CD8⁺ percentage and significantly lower memory CD8⁺ percentage and counts than controls. Oppositely, no differences were found between ANP and ANR nor between any of this two groups compared with the controls for naive and memory CD4⁺ percentage and counts. On the contrary, the FED-NEC group showed lower naive CD4 percentage than controls and a trend toward lower naive CD8 counts compared with the controls and the other ED subtypes.

The results of the general linear model assessing the effect of age, BMI z score, and diagnostic subtype on leukocyte profile and lymphocyte subsets (Tables 4 and 5) showed a BMI z score influence in lymphocyte counts and percentage, which is diagnostic subtype independent. The BMI z score in the basic model showed a significantly positive relationship with the CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ and CD45⁺CD3⁻(CD56⁺16⁺)⁺ percentages and a negative relationship with CD3⁺, CD19⁺ counts, as well as with CD4⁺CD45RA⁺ percentage and counts. No influence of the diagnostic subtype was found when this was included in the model.

4. Discussion

The present study explored the alterations in WBCs and in the lymphocyte subset profile of AN patients of either the

restrictive or binge-purging subtype, as well as in a group of patients with FED-NEC, all in their first episode of the disorder and with a short period of evolution. In agreement with our hypothesis, lymphocyte cell variations were differentially influenced by body mass loss in AN patients. Among all lymphocyte subsets analyzed, the associations with the BMI z score were significant for the naive CD4⁺ and the B lymphocyte numbers, which seem to reflect an adaptive mechanism to preserve the adaptive immune response.

Our results are in agreement with all previous reports describing leucopenia with relative lymphocytosis as the most frequent immune abnormality in AN [1, 8], as well as low neutrophil, monocyte, and basophil counts in relation to the control group [27–30]. In our study, relative lymphocytosis was not found in the FED-NEC or ANP groups.

The decrease in the percentage and absolute number of CD8⁺ T cells observed in the patients seems to be explained by the significant decrease in memory CD8⁺ T cells. Similar findings for CD8⁺ cells have been previously described in AN patients by several authors [1,7,8,13], and particularly, Mustafa et al [7] also reported a diminished population of memory CD8⁺ cells. A decrease in the capacity of dendritic cells to expand memory T-cell clones might explain this finding, according to the results that have also been observed in starvation animal models [31]. In contrast with the CD8⁺ decrease and as a main finding in the current study, an increase in CD4⁺ percentage was found in our patients, which

Table 2 – WBC counts and differential in adolescents with AN and FED-NEC

	Control n = 90	ED n = 66	FED-NEC n = 9	ANP n = 11	ANR n = 46	P value [#]
Leukocytes (cel./μL)	6612 ± 1736	5962 ± 1612*	5841 ± 1590	5673 ± 1602°	6055 ± 1643°	.780
Lymphocytes (%)	35.6 ± 9.1	38.9 ± 9.5*	35.5 ± 12.6	36.7 ± 11.1	40.0 ± 8.3**	.153
Lymphocytes (cel./μL)	2300 ± 617	2260 ± 636	1950 ± 494	2049 ± 771	2370 ± 606	.011
Neutrophils (%)	53.7 ± 9.6	50.5 ± 10.2*	54.4 ± 14.2	49.4 ± 12.8	50.1 ± 8.6*	.156
Neutrophils (cel./μL)	3624 ± 1406	3094 ± 1305*	3264 ± 1740	2869 ± 1484°	3115 ± 1186*	.871
Monocytes (%)	7.0 ± 1.5	4.4 ± 1.5***	4.6 ± 1.5*** ^{a, b}	5.3 ± 2.7*** ^a	4.1 ± 1.0*** ^b	.092
Monocytes (cel./μL)	461 ± 151	259 ± 100***	272 ± 126***	281 ± 88***	251 ± 99***	.424
Basophils (%)	1.4 ± 0.5	0.9 ± 0.4***	0.8 ± 0.4**	1.0 ± 0.5*	0.9 ± 0.4***	.466
Basophils (cel./μL)	94 ± 41	53 ± 27***	43 ± 17***	55 ± 31**	55 ± 28***	.297
Eosinophils (%)	2.2 ± 1.1	2.7 ± 2.1	3.4 ± 2.1* ^{a, b}	3.6 ± 2.2*** ^a	2.4 ± 2.1 ^b	.039
Eosinophils (cel./μL)	150 ± 84	159 ± 115	188 ± 100	196 ± 111	144 ± 118	.358

Values are expressed as means ± SD.

Asterisks indicate differences vs control; Student t test: *P < .05, **P < .01, ***P < .001, °P < .1.

[#]ANOVA among ED groups adjusted by age.

Different letters indicate significant differences between ED groups. Tukey test; P < .05.

Table 3 – Lymphocyte subsets in adolescents with AN and FED-NEC

		Control n = 90	ED n = 66	FED-NEC n = 9	ANP n = 11	ANR n = 46	P value [#]
CD45 ⁺ CD3 ⁺	%	70.2 ± 6.5	69.4 ± 5.9	65.0 ± 5.8 ^{ab}	74.3 ± 4.7 ^{ab}	69.1 ± 5.4 ^a	.003
Mature T lymphocytes	cel./μL	1613 ± 455	1567 ± 464	1275 ± 374 [*]	1527 ± 609	1634 ± 427	.023
CD45 ⁺ CD4 ⁺	%	37.8 ± 6.7	41.6 ± 6.3 ^{***}	40.4 ± 4.5 ^a	46.6 ± 4.8 ^{***ab}	40.6 ± 6.5 ^{ab}	.018
T helper lymphocytes	cel./μL	872 ± 287	933 ± 305	792 ± 245	960 ± 392	955 ± 291 ^o	.182
CD45 ⁺ CD8 ⁺	%	26.9 ± 5.7	23.6 ± 4.9 ^{***}	23.2 ± 5.7 ^o	25.2 ± 4.7	23.4 ± 4.8 ^{***}	.676
T cytotoxic lymphocytes	cel./μL	619 ± 218	530 ± 184 ^{**}	452 ± 149 [*]	508 ± 188	551 ± 189 ^o	.137
CD45 ⁺ CD3 ⁺ (CD56 ⁺ 16 ⁺) ⁺	%	16.4 ± 6.6	10.4 ± 4.5 ^{***}	14.6 ± 6.0 ^a	9 ± 5.6 ^{***ab}	9.9 ± 3.4 ^{***b}	.022
NK cells	cel./μL	382 ± 193	230 ± 106 ^{***}	279 ± 134	172 ± 108 ^{**}	234 ± 96 ^{***}	.141
CD45 ⁺ CD19 ⁺	%	10.9 ± 2.8	12.7 ± 4.4 ^{**}	11.8 ± 4.0	11.0 ± 3.1	13.3 ± 4.6 ^{**}	.168
B lymphocytes	cel./μL	249 ± 88	293 ± 149 [*]	232 ± 114	236 ± 165	319 ± 147 ^{**}	.007
CD3 ⁺ CD45RO ⁺	%	49.6 ± 9.9	42.9 ± 11.5 ^{***}	47.6 ± 15.4	40.5 ± 11.2 ^{**}	42.6 ± 10.6 ^{***}	.526
Memory T lymphocytes	cel./μL	788 ± 249	656 ± 220 [*]	586 ± 206 [*]	609 ± 248 [*]	683 ± 216 [*]	.138
CD4 ⁺ CD45RA ⁺	%	48.3 ± 10.4	47.0 ± 12.0	39.6 ± 12.1 [*]	46.3 ± 13.3	48.6 ± 11.4	.152
Naive T helper lymph.	cel./μL	428 ± 181	453 ± 228	331 ± 192	455 ± 240	478 ± 230	.127
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺	%	26.4 ± 5.0	26.3 ± 7.6	28.8 ± 8.7	29.0 ± 8.2	25.1 ± 7.1	.116
Memory T helper lymph.	cel./μL	420 ± 141	398 ± 133	354 ± 103	443 ± 204	396 ± 116	.859
CD8 ⁺ CD45RA ⁺	%	58.1 ± 13.2	64.0 ± 12.0 ^{**}	57.1 ± 18.6 ^a	72.2 ± 8.8 ^{ab}	63.7 ± 11.5 ^{ab}	.117
Naive T cytotoxic lymph.	cel./μL	360 ± 152	341 ± 134	262 ± 132 ^o	364 ± 132	351 ± 134	.121
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁺	%	14.5 ± 5.7	11.0 ± 5.0 ^{***}	12.9 ± 7.2	8.4 ± 3.4 ^{**}	11.3 ± 4.7 ^{**}	.396
Memory T cytotoxic lymph.	cel./μL	234 ± 118	169 ± 91 ^{***}	158 ± 97 ^o	127 ± 60 ^{***}	182 ± 94 ^{**}	.127
Ratio CD4 ⁺ /CD8 ⁺		1.49 ± 0.48	1.84 ± 0.52 ^{***}	1.85 ± 0.55 [*]	1.92 ± 0.47 ^{**}	1.82 ± 0.54 ^{***}	.934

Values are expressed as means ±SD.

Asterisks indicate differences vs control; Student t test. *P ≤ .05, **P ≤ .01, ***P ≤ .001, ^oP ≤ .1.

[#]ANOVA among ED groups adjusted by age.

Different letters indicate significant differences between ED groups. Tukey test; P < .05.

could be considered as a successful attempt to preserve CD4⁺ absolute numbers under restricted intakes and reduced leukocyte numbers. Thus, CD4⁺ lymphocyte cell levels maintenance could be understood as a fundamental issue within the adaptation process to low intakes and also a key factor explaining why patients do not suffer an increased infection risk as classical forms of protein-energy malnutrition. The increased CD4⁺ percentage has been also described in other studies with AN patients [7,13,32]. Similarly, the increased B cell counts in our patients are consistent with the generally agreed concept that humoral immunity is well preserved in

these patients [2,33]. This increase was only observed in the ANR group and seems to be linked to the body mass loss as well as the relative lymphocytosis adaptive mechanism because both lymphocytes and B lymphocytes are negatively associated with the BMI z score. Similarly, the negative relationship found in our patients between the BMI z score and CD4⁺CD45RA⁺ cells, in both percentage and counts, suggests that as the body weight is depleted, the production of lymphocytes is prioritized over that of other immune cells, and in the case of T lymphocytes, the priority is laid on naive T helper cells. This might be an attempt to preserve the

Table 4 – Associations between BMI z score and WBCs in ED patients

	Basic model ^a			R ²	Basic model + diagnostic subtype ^b		
	BMI z score				P	Diagnostic subtype	R ²
	β	95% CI	P				
Leukocytes (cel./μL)	-0.042	(-0.863, 0.626)	.752	0.013	.996	.880	0.017
Lymphocytes (%)	-0.311	(-9.244, -1.067)	.014	0.138	.039	.815	0.143
Lymphocytes (cel./μL)	-0.329	(-0.631, -0.102)	.007	0.201	.081	.891	0.204
Neutrophils (%)	0.213	(-0.699, 8.274)	.097	0.098	.121	.544	0.116
Neutrophils (cel./μL)	0.090	(-0.399, 0.809)	.500	0.009	.459	.707	0.020
Monocytes (%)	0.291	(0.008, 0.119)	.026	0.081	.048	.079	0.155
Monocytes (cel./μL)	0.192	(-0.012, 0.080)	.143	0.054	.161	.519	0.074
Basophils (%)	-0.100	(-0.255, 0.114)	.448	0.027	.461	.505	0.049
Basophils (cel./μL)	-0.143	(-0.019, 0.006)	.273	0.05	.694	.737	0.060
Eosinophils (%)	0.190	(-0.034, 0.218)	.150	0.045	.972	.067	0.126
Eosinophils (cel./μL)	0.135	(-0.026, 0.080)	.307	0.023	.809	.403	0.051

β, standardized regression coefficient; CI, confidence interval.

^a Linear regression adjusted by age.

^b General linear model including diagnostic subtype as independent factor and z score and age as covariates.

Table 5 – Associations between BMI z score and lymphocyte subsets in ED patients

		Basic model			R ²	Basic model + diagnostic subtype ^b		
		BMI z score ^a				BMI z score	Diagnostic subtype	R ²
		β	95% CI	P		P	P	
CD45 ⁺ CD3 ⁺	%	-0.200	(-4.692, 0.601)	.127	0.054	.532	.005	0.205
Mature T lymphocytes	cel./μL	-0.353	(-482.222, -91.465)	.005	0.182	.077	.884	0.185
CD45 ⁺ CD4 ⁺	%	0.010	(-2.779, 3.001)	.939	0.048	.894	.033	0.151
T helper lymphocytes	cel./μL	-0.250	(-270.159, 2.236)	.054	0.092	.189	.702	0.102
CD45 ⁺ CD8 ⁺	%	0.042	(-1.901, 2.619)	.752	0.011	.504	.607	0.028
T cytotoxic lymphocytes	cel./μL	-0.221	(-154.180, 10.493)	.086	0.096	.369	.928	0.098
CD45 ⁺ CD3 ⁺ (CD56 ⁺ 16 ⁺) ⁺	%	0.316	(0.500, 4.450)	.015	0.097	.420	.053	0.142
NK cells	cel./μL	0.058	(-38.323, 60.070)	.660	0.014	.753	.103	0.085
CD45 ⁺ CD19 ⁺	%	-0.118	(-2.873, 1.068)	.363	0.050	.938	.449	0.078
B lymphocytes	cel./μL	-0.267	(-32.98, -7.325)	.029	0.188	.291	.749	0.196
CD3 ⁺ CD45RO ⁺	%	0.228	(-0.758, 9.775)	.092	0.047	.199	.606	0.063
Memory T lymphocytes	cel./μL	-0.147	(-155.503, 43.536)	.265	0.079	.815	.756	0.088
CD4 ⁺ CD45RA ⁺	%	-0.279	(-11.228, -0.515)	.032	0.085	.352	.739	0.094
Naive T helper lymph.	cel./μL	-0.296	(-219.600, -18.221)	.021	0.117	.134	.839	0.122
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺	%	0.283	(0.374, 7.108)	.030	0.115	.130	.697	0.126
Memory T helper lymph.	cel./μL	-0.060	(-76.307, 48.407)	.656	0.004	.564	.572	0.021
CD8 ⁺ CD45RA ⁺	%	-0.114	(-8.461, 3.390)	.395	0.012	.802	.026	0.126
Naive T cytotoxic lymph.	cel./μL	-0.235	(-116.232, 5.403)	.073	0.076	.427	.443	0.101
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁺	%	0.063	(-1.818, 2.914)	.645	0.006	.621	.153	0.066
Memory T cytotoxic lymph.	cel./μL	-0.167	(-67.293, 14.946)	.208	0.075	.419	.442	0.100

^a Linear regression adjusted by age.

^b General linear model including diagnostic subtype as an independent factor and z score and age as covariates.

efficacy of the adaptive immune response under the food deprivation status. It might also be related with the finding of Omodei et al [27] who observed that the peripheral blood mononuclear cells from AN patients showed lower activity of its major energy-producing pathways than those from the controls. It might be worth investigating whether the priority in lymphocyte production aims to compensate for a decreased metabolic activity.

We further tested the occurrence of this adaptation mechanism in the most undernourished girls by comparing those girls with <-2 SD z score BMI (n = 13) values with those girls that showed the less undernourished status (z score BMI >-1 SD; n = 12). This analysis showed that the most undernourished girls had significantly higher lymphocyte counts and CD4⁺CD45RA⁺ counts than the less undernourished girls (2438 ± 641 vs 1928 ± 498 and 527 ± 286 vs 338 ± 168, respectively) and also a trend for a higher percentage of CD4⁺CD45RA⁺ (P = .065).

ANP and ANR showed similar adaptive mechanisms regarding lymphocyte subsets in the context of reduced leukocytes. As in ANR, only NK cells and memory cytotoxic T cells were decreased in ANP; however, the low CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺ counts were more significant in ANP than in ANR. Likewise, Nagata et al [13] found significantly decreased CD8⁺ counts in 6 patients with ANP compared with controls and a similar nonsignificant trend in 7 patients with restricting-type AN. The effect of vomiting on lymphocyte subsets has also been analyzed, showing that vomiting as a purging strategy is associated with a more deleterious effect on T cells [15]. The acquisition of purging-compensatory habits might be working as a strain on the already stressed body [33].

FED-NEC patients' NK cells were less significantly diminished than those of both AN subtypes. Malnutrition severity as well as the time of evolution of the disease could be

important factors explaining the variability observed because FEDs-NEC are, in our sample, patients with initial disorders that have relatively shorter periods of evolution than the other groups; however, no conclusions can be derived from this small and heterogeneous group. Similarly, the low number of patients with ANP compared with ANR might be considered as another limitation in this study; however, this was a convenience sample and reflects the disparity in both subtypes' incidence at first episode. Despite this, the results showing a priority in the production of naive T cells was common to both ED subtypes, and the question arises whether this mechanism aimed to preserve the adaptive immune response is maintained in those patients with longer duration of disease and unsuccessful treatments. Future work with follow-up data from immune assessments performed in this study population will hopefully solve this limitation and will add information on the usefulness of these immunological parameters as biomarkers of disease evolution.

No influence of the BMI z score was observed on the NK cell subset in our study, nor was it observed in eosinophil percentage. However, the eosinophil percentage seemed to be influenced by the diagnostic subtype. ANP showed higher values than ANR, but it is not clear if this can be explained exclusively by the prevalence of allergy by groups, which was 33%, 18%, and 17% in FED-NEC, ANP, and ANR subtypes, respectively. It is important to note the endocrine changes known to occur in patients with AN [34,35] because pituitary-adrenal cell-mediated immunity interrelationships seem to be disrupted [36]. Furthermore, some issues that frequently coexist with AN, such as depression or stressful life events [37–40], are themselves known to adversely impact immune function, and it is difficult to separate their effects. The impact of these processes, or others, derived from the

physiological adjustment secondary to EDs is likely to confuse the measurement of immune abnormalities.

In conclusion, our study of patients suffering their first episode of AN or FED-NEC showed that relative lymphocytosis results from an enhanced production of naive CD4⁺ T cells and B cells as body mass loss progresses. This seems to be an adaptation mechanism to maintain lymphocyte numbers and, likely, the adaptive immune response.

Acknowledgment

The authors sincerely thank all families that volunteered to participate in this study. This work was supported by the Ministry of Health (FIS PI08/1832) and Alicia Koplowitz Foundation (2009). The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Marcos A, Varela P, Santacruz I, Muñoz-Velez A, Morandé G. Nutritional status and immunocompetence in eating disorders. A comparative study. *Eur J Clin Nutr* 1993;787–93.
- [2] Nova E, Marcos A. Immunocompetence to assess nutritional status in eating disorders. *Expert Rev Clin Immunol* 2006;2: 433–44. <http://dx.doi.org/10.1586/1744666X.2.3.433>.
- [3] Marcos A, Varela P, Toro O, López-Vidriero I, Nova E, Madruga D, et al. Interactions between nutrition and immunity in anorexia nervosa: a 1-y follow-up study. *Am J Clin Nutr* 1997; 66:485S–90S.
- [4] Nova E, Gómez-Martínez S, Morandé G, Marcos A. Cytokine production by blood mononuclear cells from in-patients with anorexia nervosa. *Br J Nutr* 2002;88:183–8. <http://dx.doi.org/10.1079/BJNBJN2002608>.
- [5] Erhabor O, Adias TC. *Haematology made easy*. Annotated edition AuthorHouse; 2013.
- [6] Cason J, Ainley CC, Wolstencroft RA, Norton KR, Thompson RP. Cell-mediated immunity in anorexia nervosa. *Clin Exp Immunol* 1986;64:370–5.
- [7] Mustafa A, Ward A, Treasure J, Peakman M. T lymphocyte subpopulations in anorexia nervosa and refeeding. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;82:282–9.
- [8] Fink S, Eckert E, Mitchell J, Crosby R, Pomeroy C. T-lymphocyte subsets in patients with abnormal body weight: longitudinal studies in anorexia nervosa and obesity. *Int J Eat Disord* 1996;20:295–305. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-108X\(199611\)20:3<295::AID-EAT9>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-108X(199611)20:3<295::AID-EAT9>3.0.CO;2-J).
- [9] Allende LM, Corell A, Manzanares J, Madruga D, Marcos A, Madroño A, et al. Immunodeficiency associated with anorexia nervosa is secondary and improves after refeeding. *Immunology* 1998;94:543–51.
- [10] do Carmo I, Palma-Carlos ML, Melo A, Jorge Z, Macedo A, Nunes S, et al. Characterization of leukocytes, lymphocytes and lymphocyte subsets in eating disorders. *Allerg Immunol (Paris)* 1997;29:261–8.
- [11] Nova E, Lopez-Vidriero I, Varela P, Toro O, Casas J, Marcos A. Indicators of nutritional status in restricting-type anorexia nervosa patients: a 1-year follow-up study. *Clin Nutr* 2004;23: 1353–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2004.05.004>.
- [12] Nova E, Varela P, López-Vidriero I, Toro O, Ceñal MJ, Casas J, et al. A one-year follow-up study in anorexia nervosa. Dietary pattern and anthropometrical evolution. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55:547–54. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601181>.
- [13] Nagata T, Tobitani W, Kirinike N, Iketani T, Yamagami S. Capacity to produce cytokines during weight restoration in patients with anorexia nervosa. *Psychosom Med* 1999;61: 371–7.
- [14] American Psychiatric Association. *DSM V: diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.
- [15] Marcos A, Varela P, Toro O, Nova E, López-Vidriero I, Morandé G. Evaluation of nutritional status by immunologic assessment in bulimia nervosa: influence of body mass index and vomiting episodes. *Am J Clin Nutr* 1997;66:491S–7S.
- [16] Castellini G, Lo Sauro C, Mannucci E, Ravaldi C, Rotella CM, Faravelli C, et al. Diagnostic crossover and outcome predictors in eating disorders according to DSM-IV and DSM-V proposed criteria: a 6-year follow-up study. *Psychosom Med* 2011;73:270–9. <http://dx.doi.org/10.1097/PSY.0b013e31820a1838>.
- [17] De Filippo E, Marra M, Alfinito F, Di Guglielmo ML, Majorano P, Cerciello G, et al. Hematological complications in anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr* 2016;70:1305–8. <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2016.115>.
- [18] Lawson EA, Eddy KT, Donoho D, Misra M, Miller KK, Meenaghan E, et al. Appetite-regulating hormones cortisol and peptide YY are associated with disordered eating psychopathology, independent of body mass index. *Eur J Endocrinol* 2011;164:253–61. <http://dx.doi.org/10.1530/EJE-10-0523>.
- [19] Villaseñor A. Anorexia nervosa. Hospital care at home (HCH). An adolescent's parent training programme. *Interpsiquis* 2011. 12° Congreso virtual de Psiquiatría y Neurociencias; 2011 [<http://www.psiquiatria.com/bibliopsiquis/handle/10401/2202>; <http://hdl.handle.net/10401/2202>].
- [20] Graell M. Hospital care programme for school children and adolescents with eating disorders. *Interpsiquis* 2011. 12° Congreso virtual de Psiquiatría y Neurociencias; 2011 [<http://www.psiquiatria.com/bibliopsiquis/handle/10401/2203>; <http://hdl.handle.net/10401/2203>].
- [21] American Psychiatric Association. *DSM IV: diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.
- [22] Herpertz-Dahlmann B, van Elburg A, Castro-Fornieles J, Schmidt U. ESCAP expert paper: new developments in the diagnosis and treatment of adolescent anorexia nervosa—a European perspective. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2015;24: 1153–67. <http://dx.doi.org/10.1007/s00787-015-0748-7>.
- [23] Fairburn CG, Bohn K. Eating disorder NOS (EDNOS): an example of the troublesome "not otherwise specified" (NOS) category in DSM-IV. *Behav Res Ther* 2005;43:691–701. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brat.2004.06.011>.
- [24] Veiga OL, Gómez-Martínez S, Martínez-Gómez D, Villagra A, Calle ME, Marcos A. Physical activity as a preventive measure against overweight, obesity, infections, allergies and cardiovascular disease risk factors in adolescents: AFINOS study protocol. *BMC Public Health* 2009;9:475.
- [25] Sobradillo B, Aguirre A, Aresti U, Bilbao A, Fernández Ramos C, Lizárraga A, et al. *Curvas y tablas de Crecimiento y Desarrollo (Estudio longitudinal y transversal)*. Bilbao: Fundación Faustino Orbeago; 2004.
- [26] Calder PC. Immunological parameters: what do they mean? *J Nutr* 2007;137:773S–80S.
- [27] Omodei D, Pucino V, Labruna G, Procaccini C, Galgani M, Perna F, et al. Immune-metabolic profiling of anorexic patients reveals an anti-oxidant and anti-inflammatory phenotype. *Metabolism* 2015;64:396–405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.025>.
- [28] Misra M, Aggarwal A, Miller KK, Almazan C, Worley M, Soyka LA, et al. Effects of anorexia nervosa on clinical, hematologic, biochemical, and bone density parameters in community-dwelling adolescent girls. *Pediatrics* 2004;114:1574–83. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2004-0540>.
- [29] Hütter G, Ganepola S, Hofmann W-K. The hematology of anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 2009;42:293–300. <http://dx.doi.org/10.1002/eat.20610>.

ORIGINAL ARTICLE

Adipokines, cortisol and cytokine alterations in recent onset anorexia nervosa. A case–control study



Ana Elegido^a, Alina Gheorghe^a, Ana R. Sepúlveda^b, Patricia Andrés^c,
Ligia E. Díaz-Prieto^a, Montserrat Graell^{c,d}, Ascensión Marcos^a, Esther Nova^{a,*}

^a Immunonutrition Research Group, Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN) – CSIC, C/ José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain

^b Faculty of Psychology, Autonomous University of Madrid, C/ Ivan Pavlov n°6, 28049 Madrid, Spain

^c Eating Disorders Unit, Child and Adolescent Psychiatry and Psychology Department, Children University Hospital Niño Jesús, Av Menéndez Pelayo, 65, 28009 Madrid, Spain

^d CIBERSAM (Biomedical Research Networking Centre for Mental Health, Ministry of Health), Spain

Received 26 September 2018; accepted 12 February 2019

Available online 11 April 2019

KEYWORDS

Anorexia nervosa;
Adipokines;
Cytokines;
Cortisol;
Case–control study

Abstract

Introduction: Psychological and neuroendocrine alterations are typical characteristics in anorexia nervosa patients. The role of adipokines and cytokines as mediators of body systems' adaptations to the patients' abnormal eating behavior is not well understood. The duration of disease seems to be a determinant of nutritional status and associated hormone changes. We aimed to assess whether alterations in adipokines, cytokines and cortisol do already exist in patients with a recent disease onset by means of a case–control study.

Methods: Forty-one adolescent female patients on their first-episode and diagnosed with anorexia nervosa, were matched by age and socioeconomic status (SES) (1:1) with healthy girls. Leptin, soluble leptin receptor (sOB-R), adiponectin, cortisol, and the cytokines IL-1 β , IL-2, IL-6 and TNF- α were examined.

Results: The results showed reduced leptin and increased sOB-R and cortisol levels in AN patients. Adiponectin was also increased but opposite to the previous biomarkers did not correlate with BMI Z-score. Serum TNF- α and IL-2 showed significantly lower and higher values, respectively, in the AN patients than in the controls. Cortisol showed the strongest correlation with sOB-R ($r=0.436$; $P=0.005$).

Abbreviations: AN, anorexia nervosa; ANP, anorexia nervosa binge/purging type; ANR, anorexia nervosa restricting type; BMI, body mass index; DSM, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; ED, eating disorders; FLI, free leptin index; HPA, hypothalamic–pituitary–adrenal; IBW %, ideal body weight percentage; NJCUH, Niño Jesus Children University Hospital; SES, socioeconomic status; sOB-R, soluble leptin receptor.

* Corresponding author.

E-mail address: enova@ictan.csic.es (E. Nova).

<https://doi.org/10.1016/j.endinu.2019.02.003>

2530-0164/© 2019 SEEN y SED. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

PALABRAS CLAVE

Anorexia nerviosa;
Adipoquinas;
Citocinas;
Cortisol;
Estudio caso-control

Conclusions: Our study confirms previous findings on adipokine and cortisol alterations in AN patients, while overall cytokine results did not show a clear disruption in AN patients with short disease duration. The results highlight the need to disentangle the role of the sOB-R in the interactions between leptin and cortisol secretion.

© 2019 SEEN y SED. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Alteraciones en adipoquinas, cortisol y citocinas en anorexia nerviosa de diagnóstico reciente. Estudio caso-control

Resumen

Introducción: Las alteraciones psicológicas y neuroendocrinas son típicas de las pacientes con anorexia nerviosa (AN). El papel de las adipoquinas y citocinas como mediadores de la adaptación del organismo al comportamiento alimentario alterado no es bien conocido. La duración de la enfermedad parece ser un determinante del estado nutricional y de los cambios hormonales asociados. Nuestro objetivo ha sido establecer si existen alteraciones de adipoquinas, citocinas y cortisol en pacientes con un comienzo reciente de la enfermedad en un estudio caso-control.

Métodos: Cuarenta y una chicas adolescentes diagnosticadas de AN en su primer episodio fueron emparejadas por edad y estado socioeconómico (1:1) con adolescentes sanas. Se midieron la leptina, el receptor soluble de leptina, la adiponectina, el cortisol y las citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6 y TNF- α .

Resultados: Las pacientes con AN mostraron niveles reducidos de leptina y elevados de receptor de leptina y cortisol. La adiponectina también se observó elevada pero, al contrario que los otros marcadores, no correlacionó con el Z-score del índice de masa corporal. Las pacientes mostraron valores de TNF- α e IL-2 menores y mayores, respectivamente, que las controles. El cortisol y el receptor de leptina mostraron la correlación más fuerte de todas las observadas ($r=0,436$; $p=0,005$).

Conclusiones: Se confirman los resultados previos de adipoquinas y cortisol en pacientes con AN. Sin embargo, los resultados globales de citocinas no muestran una alteración clara en pacientes con corta duración de la enfermedad. Los resultados apuntan a la necesidad de desentrañar el papel del receptor soluble de leptina en las interacciones entre leptina y cortisol.

© 2019 SEEN y SED. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Introduction

Anorexia nervosa (AN) is a psychiatric syndrome characterized by self-induced starvation leading to severe weight loss, mainly at the expense of adipose tissue.¹ Multiple adaptive mechanisms that seem to change along the course of the illness are triggered.² In this sense, adipokines and cytokines are among the regulatory molecules that have been appointed as essential contributors to some of the physiological adaptations.³ Specifically, leptin and adiponectin have emerged as the most abundant fat-derived hormones, redefining adipose tissue as a key component not only of the endocrine system, but also of the immune system. While leptin plasma concentrations are markedly reduced in AN patients in comparison to controls,^{4,5} circulating adiponectin levels show contradictory results in the literature.⁶ In this sense, the fluctuations in adipokine levels along the course of the treatment have shown associations with the anthropometrical recovery,⁵ which points out to these biomarkers as useful indicators of treatment response and possibly also of the risk of future relapse. It is known

that leptin and adiponectin display effects on immune cells, being leptin an enhancer of immune activation and an up-regulator of inflammatory responses and adiponectin, on the contrary, an inhibitor of pro-inflammatory cytokine production.⁷ These soluble messengers secreted mainly by immune cells also seem to be altered in AN.⁸ In these sense, elevated plasma levels of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) have been reported in some studies performed with AN patients when compared to controls^{9,10} and also in a meta-analysis.¹¹ However, no full consistency exists among studies, many of them having found no alteration in cytokines in comparison with healthy females.^{12,13} On the other hand, evidence suggests that activation of a bidirectional feedback loop between cytokines and cortisol is central to the appropriate functioning of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and elevated serum cortisol levels have been found in AN patients.¹⁴ However, elucidating the interplay between the HPA axis and cytokines and regulatory hormones of appetite and weight control in the acute stage of disease development is essential to evaluate if any of these the molecules might be useful

to estimate recovery and relapse risks along the course of treatment.

Since the controversial results published with respect to immune markers and regulatory molecules might be associated, to some extent, to the heterogeneity of the patients included in the study groups in terms of age and duration of the disease,^{11,12,15} we aimed to determine the basal status of these metabolic and immune biomarkers in a homogenous group of patients that were all suffering their first episode of disease. In addition, we have followed a case-control design, based in pairs matched by age and socioeconomic status (SES), aiming to reduce potential confounding factors that might also account for the discrepancies found among previous studies on adiponectin and cytokine levels.

Materials and methods

Subjects and study design

A 1:1 matched case-control study was conducted. Adolescent female patients diagnosed with anorexia nervosa participated in the study. All patients were recruited upon admission at the Eating Disorders (ED) Unit, at Niño Jesus Children University Hospital (NJCUIH) in Madrid during the years 2010–2013. All patients consecutively admitted and diagnosed in a semi-structured interview were invited to participate in the ANABEL study¹⁶ which is a comprehensive study of clinical, familial and biological variables involved in prognosis of ED. The following inclusion criteria were considered: (1) female gender, (2) age range between 12 and 17 years, (3) no specific ED treatment. Exclusion criteria were: (1) patients with a differential diagnosis of any other disease. With these criteria, 114 patients were included in the ANABEL study as explained somewhere else,¹⁶ and a subsample of 63 patients was included in the blood biomarkers sub-study based on lymphocyte counts as outcome variable for sample size calculations.¹⁷ For the current study of matched case-control pairs, power analysis was based in cortisol, assuming that leptin, adiponectin and related parameters would not present difficulties regarding statistical power because the expected impact of anorexia nervosa on them is higher than for cortisol. Taking as reference the cortisol value of healthy European adolescents published in Perez de Heredia et al.¹⁸ and considering 80% statistical power and a minimum expected difference of 20% between AN and C groups, the results showed that 42 matched pairs would be necessary. However, similar sample size calculations for cytokine values produced unfeasible sample sizes due to the very high standard deviation of these biomarkers.¹⁸ Among the 63 ED patients with blood biomarker analyses, only patients with a diagnosis of AN were included and exclusion criteria were: (1) patients with no suitable matching control, (2) patients with uncomplete blood sample analyses. All patients were initially diagnosed according to Diagnostic and statistical Manual of Mental Disorders (DSM IV-TR) criteria by clinical interview performed by clinical experts but were later reclassified according to the DSM-5¹⁹ in order to be in line with current operational criteria. Thus, 33 patients were diagnosed as AN-restricting type (ANR) and 8 patients as AN-binge/purging type (ANP). Most

of the patients at study enrolment had been recently admitted for in-hospital treatment (80%) and a lower number were admitted to follow home care hospitalization (15%) and outpatient treatment (5%). Sixty five percent of patients were under psychopharmacological therapy (anxiolytics/antidepressants/antipsychotics) prescribed no more than three weeks before the evaluation. 37% of AN patients take serotonin reuptake inhibitors, 32% take anxiolytics (benzodiazepines) and 7% take second generation antipsychotics. However, 46% of the patients under psychopharmacological therapy had a combination of at least two types of medication.

The control group consisted of 50 healthy female adolescents, free of psychiatric or somatic illness as ascertained by clinical interviews (K-SADS-PL), which were carried out by trained psychologists. These girls participated in the ANOBAS case-control study (PSI2011-23127), which involved the completion of a battery of psychological questionnaires by parents and adolescents. They were recruited from secondary schools (both public and state subsidized) in Madrid through direct response flyers. Psychological reports and blood results were personally delivered to the parents. Adolescents presenting with a psychiatric diagnosis were referred to their corresponding mental health services and were excluded from the study. Each AN case was matched with a control, using age and socioeconomic status (SES) as matching criteria. SES was typified by using the Hollingshead index,²⁰ based on primary caregiver education and occupation. A range from I to V designated the lowest and highest categories of SES. Matching within ± 1 year difference was acceptable for age and also matching within adjacent categories for SES. With this criteria 50 case-control pairs were formed but only 41 included AN patients participating in the blood biomarkers sub-study. Thus, 41 pairs were studied in this work.

All procedures performed were in accordance with the ethical standards of the 1964 Helsinki declaration and its later amendments and the Spanish law 14/2007 on Biomedical Research. This study was approved by the Ethics Committee of the Niño Jesús Children University Hospital and the Autonomous University of Madrid. Informed consent was obtained from all the parents and guardians of the participants included in the study.

Anthropometrical measurements

All patients and controls underwent anthropometrical assessment by standard procedures (without shoes and in underwear clothes). Patients' measurements were performed on their first day of admission or on the following day using a digital electronic weighing scale (Seca 780; 0.100 g precision) with an incorporated telescopic measuring rod (Seca 220: 0.5 cm precision). From these data, body mass index (BMI) [weight (kg)/height² (m²)], Z-score of the BMI and ideal body weight percentage (IBW %) were calculated according to the Spanish growth reference Charts.²¹ Anthropometric measurements in the healthy adolescents were obtained at their schools using a Seca digital weighing scale (Type 799 and 769; 0.100 g precision) with height measuring rod.

Biomarkers analysis

Blood extractions in patients and controls were performed in the NJCUH. Venous blood samples were obtained between 8 and 9 AM, after an overnight fast. Following collection in EDTA-K3E Vacutainer tubes (BD Biosciences), blood samples were centrifuged during 15 min at 1300g and 4°C to obtain the plasma. The investigators checked that no subject participating in the study had any vaccine administered within the six weeks prior to the day of blood sampling and that they presented no active infectious episode or were taking immunomodulatory medications. Fasting plasma levels of adipokines (leptin and adiponectin) and cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α) were measured by Multiplex immunobead assay technology following the manufacturer's protocol (Milliplex MAP Human Metabolic Hormone panel, Human Adipokine panel and Human high sensitivity Cytokine/Chemokine panel respectively, from Millipore Corp.; Magpix analytical test instrument, Luminex Corp., Austin, TX). The soluble leptin receptor was measured by ELISA (Abnova, Walnut, CA, USA) and cortisol was measured by chemiluminescent microparticle immunoassay using Architect i1000SR kit (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). The minimum detectable concentration for each analyte was as follows: IL-1 β , 0.06 pg/mL; IL-2, 0.26 pg/mL; IL-6, 0.20 pg/mL; TNF- α , 0.07 pg/mL; leptin, 27 pg/mL; adiponectin, 11 pg/mL; leptin receptor, 0.04 ng/mL; cortisol, 0.40 μ g/dL. All analyses were performed in different aliquots to avoid freeze-thawing repetitions. Free leptin index (FLI) was calculated as the ratio leptin: sOB-R.

Statistical analysis

Prior to statistical analyses, data were examined for normal distribution with the Kolmogorov–Smirnov test. After logarithmic transformation of IL-6, leptin and FLI values and logarithmic transformation of variable plus 1 for TNF- α , all variables were normally distributed. The differences between the AN patients and their matched controls were assessed using a lineal mixed model including "Group (AN or Control)" and "Psychopharmacological treatment (yes/no)" as fixed factors and "Pair" as a repetition factor with random effect. In the same model, "subtype of AN (ANR or ANP)" was included as a nested factor within the AN Group and it was analyzed through a type I hierarchical fixed-effect contrast. Since IL-1 β and IL-2 plasma detectable values were only 25% and 49% of the total samples, respectively, we analyze those variables through a conversion to categorical variables. Three levels were defined for each cytokine: undetectable values, "low" and "medium" ranges, seeing that a balanced number of the total detectable data fell in the two latest categories. Subsequently, the distribution of AN and Control data by category was compared using the Chi-square test. Age-adjusted partial correlations were also performed to find significant relationships between cytokines, adipokines, cortisol levels and BMI Z-score in the patients and healthy peers separately. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using the IBM SPSS statistical software version 23.

Results

The AN patients and controls distribution into the SES categories is shown in Table 1. In 87.8% of the cases for age and 85.4% for SES, couples of the same category were formed. Five AN patients were matched to one-year younger control. Five AN patients were matched with a control in an immediately inferior SES category and one AN patient was matched with a control in an immediately superior SES category. Nevertheless, age and SES distribution was similar in AN and Control groups, as intended (Table 1).

Malnutrition in AN patients is evidenced by BMI Z-score values as shown in Table 1. Leptin levels were very significantly lower in AN patients than in their controls while leptin receptor, adiponectin and cortisol concentrations were significantly higher (Table 2; Fig. 1). No differences were found between AN subtypes in adipokine values, although there was a trend for increased leptin receptor levels in ANR compared to ANP together with lower FLI values.

Significant correlations between adipokines and BMI Z-score were found, both in patients and controls, for leptin and sOB-R but not between adiponectin and the BMI Z-score.

Regarding cytokines, TNF- α levels were significantly lower in patients than in their matched controls but no differences were observed for IL-6 and IL-1 β plasma concentrations between both groups (Tables 2 and 3; Fig. 1). IL-1 β was detectable in only 25% ($N = 20$) of the total samples and while the overall distribution of values in the set of ranges was similar in both groups ($P = 0.124$), the proportion of patients with "medium" levels (20%, $N = 8$) was higher than in the controls (5%, $N = 2$) (Table 3). Similarly, differences between groups were observed for IL-2. The proportion of patients with detectable values was higher (63%, $N = 26$) than in controls (39%, $N = 16$) and also the proportion of patients with "medium" levels was higher in the AN patients (36.6%, $N = 15$) than in the controls (14.6%, $N = 6$).

No correlations were found between cytokine concentrations and BMI Z-score, in the patients or in the controls. No correlations were found either between cytokines and adipokines in any of the study groups. The correlation between leptin and sOB-R was observed both in AN and control groups. Moreover, a positive correlation was found between cortisol and sOB-R ($r = 0.436$; $P = 0.005$), whereas an inverse correlation was detected between cortisol and BMI Z-score ($r = -0.403$; $P = 0.010$). Both associations were also observed in ANR type patients but not in the healthy peers.

Discussion

Our study, performed in adolescent patients in the early stage after onset of the disease has revealed significant changes in adipokines and cortisol levels compared to their control peers and scarce differences in basal cytokine levels.

As expected, serum leptin concentration was found highly perturbed in the AN patients. Our results showed leptin values 81.42% lower than in their matched controls, which is in agreement with numerous studies performed in AN.^{1,4,5} Leptin changes are believed to be partly responsible for changes in neuroendocrine axes during restricted energy intake circumstances.²² In this sense, it is worth mentioning

Table 1 Demographic and anthropometrical parameters in female adolescent patients with anorexia nervosa matched to healthy adolescents.

	Control N = 41	AN N = 41	ANR N = 33	ANP N = 8	<i>P</i> ^c	<i>P</i> ^d
Age (years)	14.56 ± 1.25	14.71 ± 1.35	14.58 ± 1.35	15.25 ± 1.28	0.611	0.369
SES (N, (%))					0.970	0.840
Status I	3 (7.3)	3 (7.3)	3 (9.1)	0 (0)		
Status II	1 (2.4)	2 (4.9)	2 (6.1)	0 (0)		
Status III	6 (14.6)	5 (12.2)	4 (12.1)	1 (12.5)		
Status IV	10 (24.4)	9 (22)	7 (21.2)	2 (25.0)		
Status V	21 (51.2)	22 (53.7)	17 (51.5)	5 (62.0)		
BMI (kg/m ²)	21.43 ± 1.98	15.57 ± 1.35	15.40 ± 1.40	16.27 ± 0.81	<i>P</i> ^{e, a} <0.001	<i>P</i> ^{e, b} 0.105
BMI Z-score	0.21 ± 0.85	-1.62 ± 0.38	-1.65 ± 0.41	-1.49 ± 0.14	<0.001	0.219
Illness duration (months)	-	12.32 ± 9.23	11.70 ± 9.12	14.88 ± 9.88	-	-
Psychiatric drugs (N, (%))	0 (0)	27 (65)	20 (60)	7 (87.5)	-	-

Values are expressed as mean ± SD.

BMI, body mass index; ANR: AN restricting type; ANP: AN binge eating-purging type; SES, socioeconomic status according to Hollingshead index.²⁰

^a Group effect (AN vs. Control).

^b Subtype of AN effect (ANR vs. ANP).

^c AN vs. Control. Student's *T* test for age comparisons and Chi² Test for SES comparisons.

^d ANP vs. ANR. Mann-Whitney *U* test for age comparisons and Chi² Test for SES comparisons.

^e Lineal mixed model including "group" as fixed factor, "par" as a repetition factor with random effect and "subtype of ED" as a nested factor analyzed through a type I hierarchical fixed-effect contrast.

Table 2 Adipokine, cortisol and cytokine levels in female adolescent patients with anorexia nervosa matched to healthy adolescents.

	Control N = 41	AN N = 41	ANR N = 33	ANP N = 8	<i>P</i> value ^{c, a}	<i>P</i> value ^{c, b}
Leptin (pg/mL)	7496 ± 5102	1393 ± 1170	1289 ± 1202	1822 ± 977	<0.001	0.104
sOB-R (ng/mL)	13.83 ± 3.44	31.94 ± 12.39	33.78 ± 12.72	24.39 ± 7.53	<0.001	0.046
FLI (ng/mL)	0.684 ± 0.701	0.056 ± 0.062	0.050 ± 0.066	0.079 ± 0.038	<0.001	0.045
Adiponectin (μg/mL)	20.58 ± 8.10	33.99 ± 14.89	34.60 ± 13.90	31.45 ± 19.47	<0.001	0.547
Cortisol (μg/dL)	14.72 ± 4.76	17.65 ± 5.64	18.23 ± 6.06	15.24 ± 2.42	0.004	0.123
IL-6 (pg/mL)	2.96 ± 6.32	2.39 ± 4.94	2.67 ± 5.47	1.25 ± 1.39	0.152	0.761
TNF-α (pg/mL)	4.43 ± 1.90	3.60 ± 2.99	3.56 ± 3.11	3.78 ± 2.66	0.008	0.646

Mean ± SD. FLI: free leptin index.

^a Group effect (AN vs. Control).

^b Subtype of AN effect (ANR vs. ANP).

^c Lineal mixed model including "group" and "psychiatric drugs" as fixed factors, "par" as a repetition factor with random effect and "subtype of ED" as a nested factor analyzed through a type I hierarchical fixed-effect contrast.

also the role of the sOB-R in energy homeostasis through the regulation of leptin bioavailability. Studies *in vivo*²³ and *in vitro*²⁴ showed that sOB-R inhibits leptin-binding to cell surface receptors, neutralizing leptin-mediated STAT3 signaling and anorexic responses *in vivo*. Increased sOB-R and decreased FLI are in agreement with previous studies.^{4,25} Moreover, the highly significant correlation found in this study between cortisol and sOB-R, which is in agreement with the findings of Kratzsch et al.,²⁵ reinforces the need to disentangle the role of the sOB-R in leptin function regulation and in the interactions between leptin and cortisol secretions.

Although adiponectin is a well studied adipokine in AN patients, published data show variable results.^{4,6,26}

In the current study, adiponectin level was significantly higher (65.16% higher) in the AN group than in the matched controls, which was similarly found in many previous studies.^{1,5,27} On the other hand, significant negative correlations between adiponectin and BMI have been found only in certain circumstances,^{1,27} which seem to arise from groups of AN patients that present high inter-individual heterogeneity in terms of BMI, duration of disease, etc. It has been suggested that a combination of factors including fat mass and temporal delays in the response of adiponectin to changes in body composition might explain adiponectin variability.²⁸

Some authors have pointed out the importance of cytokine involvement in the pathogenesis of ED.⁸ The

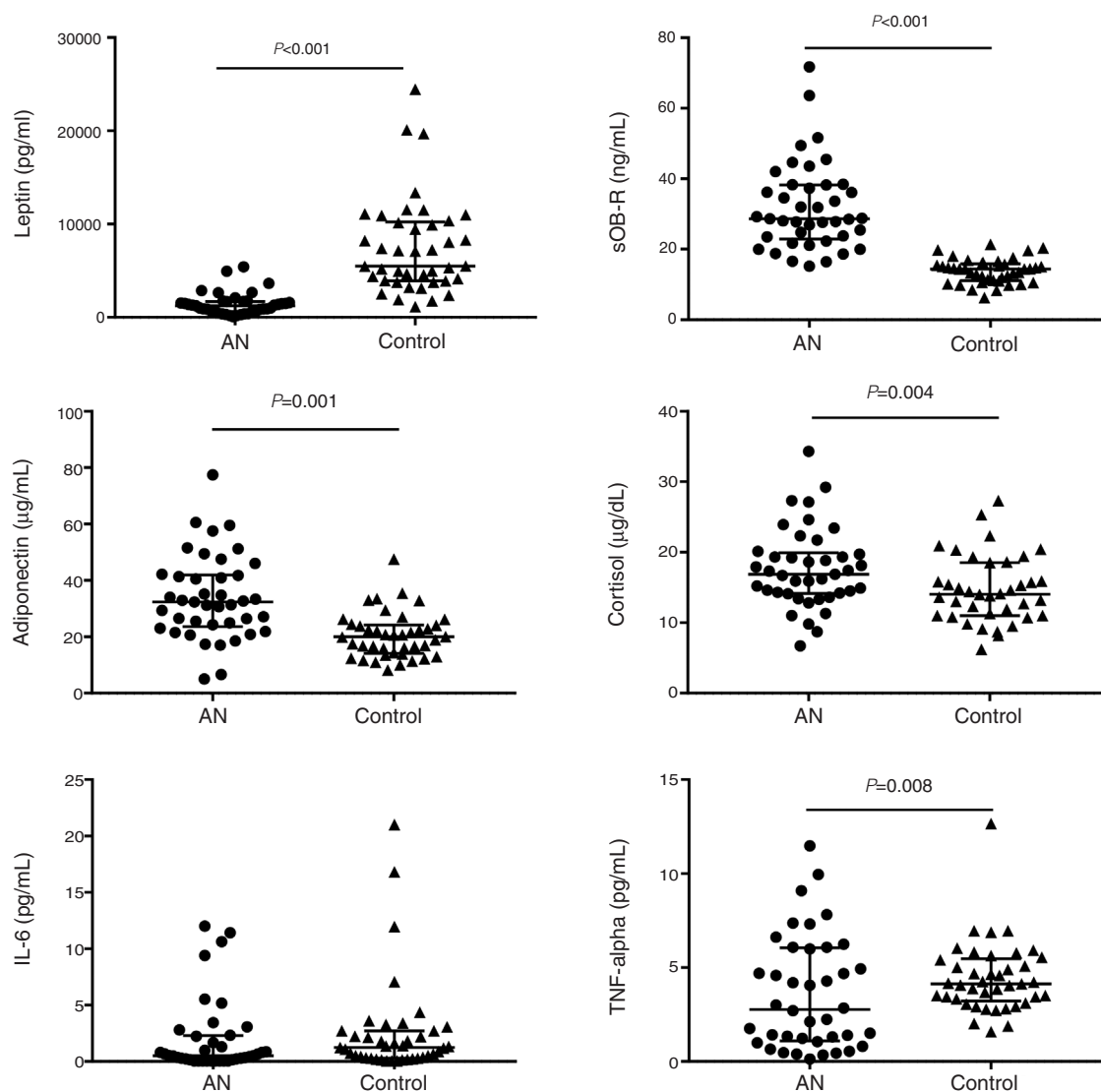


Figure 1 Adipokines, cortisol and cytokine levels in AN patients and controls. Scatter dot plots show individual data in each group and lines represent the median and interquartile range for each data set. Significant differences show the “group effect” as calculated by lineal mixed model including “group” and “psychiatric drugs” as fixed factors, “pair” as a repetition factor with random effect and “subtype of ED” as a nested factor.

Table 3 IL-1 β and IL-2 levels in female adolescent patients with anorexia nervosa matched to healthy adolescents.

		Control	AN	P
IL-1 β ^a	Undetectable	34 (82.9) ^a	28 (68.3) ^a	0.124
	Low	5 (12.2) ^a	5 (12.2) ^a	
	Medium	2 (4.9) ^a	8 (19.5) ^b	
IL-2 ^b	Undetectable	25 (61.0) ^a	15 (36.6) ^b	0.041
	Low	10 (24.4) ^a	11 (26.8) ^a	
	Medium	6 (14.6) ^a	15 (36.6) ^b	

Data show number of subjects and percentage in brackets.

^a IL-1 β : undetectable values, <0.05 pg/mL; low values, 0.05–0.27 pg/mL; medium values, 0.27–7.43 pg/mL.

^b IL-2: undetectable values, <0.1 pg/mL; low values, 0.1–1 pg/mL; medium values, 1–33.8 pg/mL. Columns with different superscript letters indicate differences between the groups at that level.

cytokine results in this study do not support a basal pro-inflammatory status in our patients, which is in contrast with some previous findings that described elevated plasma levels of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6 and TNF- α) in AN patients.^{10,11} We found lower values of TNF- α in patients than in controls. On the contrary, activation of the TNF- α axis and a negative correlation with BMI and duration of disease were found in a heterogeneous group of AN patients.⁹ Therefore, we suggest that the precise regulation of pro-inflammatory cytokines at disease onset and during the first episode is different as compared to their status in patients with longer illness duration. However, this is a small group of AN patients studied if the big inter-individual variability in plasma cytokines is taken into account. Thus, a posterior power analysis showed only a 63% statistical power ($1-\beta$ error = 0.63) for the differences observed in TNF- α . Regarding IL-2, the results point toward a conserved production, which is in contrast to other results in the literature that described decreased serum levels²⁹ or a decreased response to a stimulus.³⁰ Our results might be linked to the fact that, despite the lower number of leukocytes, the CD4+ lymphocytes in this group of patients with short duration of disease were not lower than in controls.¹⁷ Finally, the trend toward elevated IL-1 β might be an early sign of the alteration of the adrenal axis regulation evidenced also by the hypercortisolemic status of the AN patients found in this study as well as in others.^{14,31} A positive correlation between IL-1 β production and cortisol has been previously found, which shows that the counter-regulatory feedback loop between cytokines and cortisol might be deranged in AN patients.³¹ On the other hand, the inverse relationship between cortisol and BMI Z-score found, suggests a response of cortisol to undernutrition, which was also observed by Misra et al.¹⁴ As pointed out by these authors, it can be considered as an adaptive mechanism to maintain euglycemia in a status of low energy availability.

This study has some limitations that should be considered. Firstly, the number of patients is small and especially is insufficient to draw conclusions for the purgative-type AN patients. Since patients were recruited as they were referred to the ED hospital unit, the sample reflects the disparity that is normally found between subtypes incidence at first AN diagnosis. The usefulness of the results shown here is also limited by the cross-sectional nature of the study; however, further work regarding the follow-up of these treated patients would soon and hopefully provide new scientific evidences of biomarkers evolution in response to treatment.

In conclusion, the alterations of adipokines and cortisol reported in the literature are confirmed with this case-control study in adolescent onset AN patients. However, the alteration of pro-inflammatory cytokines was not confirmed, which suggests that the increase in these cytokines might occur in patients with a longer duration of the illness. However, these results should be taken with caution due to the scarce sample size for cytokine analysis. Finally, the associations found for cortisol with BMI Z-score and sOB-R point toward an interaction between the HPA axis and leptin function driving the early adaptations to energy restriction. Thus, a longitudinal study of adipokines and cortisol in this homogeneous group of patients is warranted in order to find out if follow-up measurements can predict

good and poor treatment response and be used as prognostic factors.

Funding

This project received grants from the Ministry of Health (FIS PI08/1832), the Ministry of Innovation and Science (MICINN PSI2011-23127) and Alicia Koplowitz Foundation (2009).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Dostálová I, Smitka K, Papezová H, Kvasnicková H, Nedvídková J. Increased insulin sensitivity in patients with anorexia nervosa: the role of adipocytokines. *Physiol Res.* 2007;56:587–94.
2. Nova E, Lopez-Vidriero I, Varela P, Toro O, Casas JJ, Marcos AA. Indicators of nutritional status in restricting-type anorexia nervosa patients: a 1-year follow-up study. *Clin Nutr.* 2004;23:1353–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2004.05.004>.
3. Nova E, Marcos A. Immunocompetence to assess nutritional status in eating disorders. *Expert Rev Clin Immunol.* 2006;2:433–44, <http://dx.doi.org/10.1586/1744666X.2.3.433>.
4. Misra M, Miller KK, Almazan C, Ramaswamy K, Aggarwal A, Herzog DB, et al. Hormonal and body composition predictors of soluble leptin receptor, leptin, and free leptin index in adolescent girls with anorexia nervosa and controls and relation to insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3486–95, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2003-032251>.
5. Terra X, Auguet T, Quesada IM, Aguilar C, Guiu-jurado E. Adipocytokine levels in women with anorexia nervosa relationship with weight restoration and disease duration. *Int J Eat Disord.* 2013;6:855–62, <http://dx.doi.org/10.1002/eat.22166>.
6. Kowalska I, Karczewska-Kupczewska M, Strączkowski M. Adipocytokines, gut hormones and growth factors in anorexia nervosa. *Clin Chim Acta.* 2011;412:1702–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2011.06.007>.
7. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:85–97, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2921>.
8. Corcos M, Guilbaud O, Chaouat G, Cayol V, Speranza M, Chambry J, et al. Cytokines and anorexia nervosa. *Psychosom Med.* 2001;63:502–4.
9. Agnello E, Malfi G, Costantino AM, Massarenti P, Pugliese M, Fortunati N, et al. Tumour necrosis factor alpha and oxidative stress as maintaining factors in the evolution of anorexia nervosa. *Eat Weight Disord.* 2012;17:e194–9.
10. Nakai Y, Hamagaki S, Takagi R, Taniguchi A, Kurimoto F. Plasma concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and soluble TNF receptors in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1226–8, <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.84.4.5589>.
11. Solmi M, Veronese N, Favaro A, Santonastaso P, Manzato E, Sergi G, et al. Inflammatory cytokines and anorexia nervosa: a meta-analysis of cross-sectional and longitudinal studies. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;51:237–52, <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.09.031>.
12. Brambilla F, Bellodi L, Brunetta M, Perna G. Plasma concentrations of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in anorexia and bulimia nervosa. *Psychoneuroendocrinology.* 1998;23:439–47.

13. Brambilla F, Monti D, Franceschi C. Plasma concentrations of interleukin-1-beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha, and of their soluble receptors and receptor antagonist in anorexia nervosa. *Psychiatry Res.* 2001;103:107-14.
14. Misra M, Miller KK, Almazan C, Ramaswamy K, Lapcharoensap W, Worley M, et al. Alterations in cortisol secretory dynamics in adolescent girls with anorexia nervosa and effects on bone metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:4972-80, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2004-0723>.
15. Pisetsky DS, Trace SE, Brownley KA, Hamer RM, Zucker NL, Roux-Lombard P, et al. The expression of cytokines and chemokines in the blood of patients with severe weight loss from anorexia nervosa: an exploratory study. *Cytokine.* 2014;69:110-5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.05.018>.
16. Graell M, de Andrés P, Sepúlveda AR, Moreno A, Villaseñor A, Faya M, et al. The adolescent onset anorexia nervosa study (ANABEL): design and baseline results. *Int J Methods Psychiatr Res.* 2018:e1739.
17. Elegido A, Graell M, Andrés P, Gheorghe A, Marcos A, Nova E. Increased naive CD4+ and B lymphocyte subsets are associated with body mass loss and drive relative lymphocytosis in anorexia nervosa patients. *Nutr Res.* 2017;39:43-50, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2017.02.006>.
18. Pérez de Heredia F, Garaulet M, Gómez-Martínez S, Díaz LE, Wärnberg J, Androutsos O, et al. Self-reported sleep duration, white blood cell counts and cytokine profiles in European adolescents: the HELENA study. *Sleep Med.* 2014;15:1251-8.
19. American Psychiatric Association. *DSM-5: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, Washington; 2013.
20. Hollingshead AB, Hollingshead index. *Four-factor index of social status*. Yale Unive.; 1975.
21. Sobradillo B, Aguirre A, Aresti U, Bilbao A, Fernández Ramos C, Lizárraga A, et al. *Curvas y tablas de crecimiento y desarrollo (estudio longitudinal y transversal)*. Fundación Faustino Oregozo Eizaguirre Bilbao. 2004.
22. Chan JL, Mantzoros CS. Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa. *Lancet (London, England).* 2005;366:74-85, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66830-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66830-4).
23. Zhang J, Matheny MK, Tümer N, Mitchell MK, Scarpace PJ. Leptin antagonist reveals that the normalization of caloric intake and the thermic effect of food after high-fat feeding are leptin dependent. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292:R868-74, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00213>.
24. Huang L, Wang Z, Li C. Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem.* 2001;276:6343-9, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M009795200>.
25. Kratzsch J, Lammert A, Bottner A, Seidel B, Mueller G, Thiery J, et al. Circulating soluble leptin receptor and free leptin index during childhood, puberty, and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:4587-94, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2002-020001>.
26. Tagami T, Satoh N, Usui T, Yamada K, Shimatsu A, Kuzuya H. Adiponectin in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:1833-7, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2003-031260>.
27. Bosy-Westphal A, Brabant G, Haas V, Onur S, Paul T, Nutzinger D, et al. Determinants of plasma adiponectin levels in patients with anorexia nervosa examined before and after weight gain. *Eur J Nutr.* 2005;44:355-9, <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-005-0533-3>.
28. Modan-Moses D, Stein D, Pariente C, Yaroslavsky A, Ram A, Faigin M, et al. Modulation of adiponectin and leptin during refeeding of female anorexia nervosa patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:1843-7, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2006-1683>.
29. Licinio J, Altemus ME, Wong M, Gold PW. Circulating levels of interleukin-2 in patients with anorexia nervosa. *Biol Psychiatry.* 1991;29 Suppl. 9A:56A (Abstract).
30. Pászthy B, Svec P, Túry F, Kovács L, Vársárhelyi B, Tulassay T, et al. Impact of anorexia nervosa on activation characteristics of lymphocytes. *Neuro Endocrinol Lett.* 2007;28:422-6.
31. Limone P, Biglino A, Bottino F, Forno B, Calvelli P, Berardi C. Evidence for a positive correlation between serum cortisol levels and IL-1 β production by peripheral mononuclear cells in anorexia nervosa. *J Endocrinol Invest.* 2000;23:422-7.

- [30] Cleary BS, Gaudiani JL, Mehler PS. Interpreting the complete blood count in anorexia nervosa. *Eat Disord* 2010;18:132–9. <http://dx.doi.org/10.1080/10640260903585540>.
- [31] Abe M, Akbar F, Matsuura B, Horiike N, Onji M. Defective antigen-presenting capacity of murine dendritic cells during starvation. *Nutrition* 2003;19:265–9.
- [32] Saito H, Nomura K, Hotta M, Takano K. Malnutrition induces dissociated changes in lymphocyte count and subset proportion in patients with anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 2007;40:575–9. <http://dx.doi.org/10.1002/eat.20417>.
- [33] Marcos A, Nova E, Montero A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:66–9. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601819>.
- [34] Galusca B, Prévost G, Germain N, Dubuc I, Ling Y, Anouar Y, et al. Neuropeptide Y and α -MSH circadian levels in two populations with low body weight: anorexia nervosa and constitutional thinness. *PLoS One* 2015;10:e0122040. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0122040>.
- [35] Nova E, Marcos A. Immunity in anorexia nervosa. In: Calder Philip, Kulkarni Anil, editors. *Nutrition, immunity & infection*. CRC Press/Taylor & Francis Group; 2017 Chapter 9. [in press].
- [36] Chiappelli F, Gwirtsman HE, Lowy M, Gormley G, Nguyen LD, Nguyen L, et al. Pituitary–adrenal-immune system in normal subjects and in patients with anorexia nervosa: the number of circulating helper T lymphocytes (CD4) expressing the homing receptor Leu8 is regulated in part by pituitary-adrenal products. *Psychoneuroendocrinology* 1991;16:423–32.
- [37] Blinder BJ, Cumella EJ, Sanathara VA. Psychiatric comorbidities of female inpatients with eating disorders. *Psychosom Med* 2006;68:454–62. <http://dx.doi.org/10.1097/01.psy.0000221254.77675.f5>.
- [38] Strober M, Johnson C. The need for complex ideas in anorexia nervosa: why biology, environment, and psyche all matter, why therapists make mistakes, and why clinical benchmarks are needed for managing weight correction. *Int J Eat Disord* 2012;45:155–78. <http://dx.doi.org/10.1002/eat.22005>.
- [39] Brambilla F. Social stress in anorexia nervosa: a review of immuno-endocrine relationships. *Physiol Behav* 2001;73:365–9.
- [40] Lasselín J, Alvarez-Salas E, Grigoleit J-S. Well-being and immune response: a multi-system perspective. *Curr Opin Pharmacol* 2016;29:34–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2016.05.003>.