

Lej: 180



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Facultad de Ciencias**

**CINETICA DE LINFOCITOS IN VITRO DE NIÑOS  
CON DESNUTRICION PROTEICO CALORICA SEVERA**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**B I O L O G O**

**P r e s e n t a :**

**Angel Tolentino Tello López**



**México, D. F.**

**Febrero de 1984**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	Pág.
I. INTRODUCCION.	1
a. EFECTOS A NIVEL FISIOLOGICO Y BIOQUIMICO	5
b. EFECTOS A NIVEL CELULAR	12
c. EFECTOS A NIVEL INMUNOLOGICO	18
II. OBJETIVO.	27
III. HIPOTESIS.	28
IV. MATERIAL Y METODOS.	28
V. RESULTADOS	36
VI. DISCUSION.	40
VII. CONCLUSIONES.	43
VIII. CUADROS Y GRAFICAS.	45
IX. BIBLIOGRAFIA.	62

## I. INTRODUCCION.

Se conoce con el nombre de desnutrición protéico-calórica (DPC) al conjunto de síntomas y signos clínicos y bioquímicos que se observan en niños a consecuencia de la deficiente ingestión y/o utilización de dietas de variados contenidos calóricos y bajo contenido protéico. La deficiencia nutricional se desarrolla cuando las células del organismo no cuentan con las cantidades de nutrientes esenciales para las funciones metabólicas normales (1).

La desnutrición infantil, de inicio insidioso, se manifiesta al principio casi exclusivamente por retardo en la curva de crecimiento para peso y talla. Después de esta etapa de duración variable, la enfermedad evoluciona de dos maneras distintas: el crecimiento se retarda cada vez más hasta que finalmente se detiene del todo, hay fusión que desaparece casi por completo, el cabello y la piel presentan cambios mínimos (a veces solo sequedad, aspereza y arrugamiento por falta de panículo adiposo), no hay edemas, el hígado es pequeño sin exceso de grasa, y la apariciencia general del enfermo es de adelgazamiento extremo (hueso y piel) con facies características (carita de mano). Este conjunto constituye el cuadro clásico del marasmo, que representa la etapa final -



de un proceso de autofagia de larga duración (1).

Por otro lado, puede ser que el paciente evolucione hacia el kwashiorkor que se caracteriza por anorexia, e irritabilidad, edemas, lesiones severas de la piel, decoloración y cambios en la textura normal del cabello, infiltración grasa del hígado con ligero aumento del tamaño, y disminución moderada del tejido adiposo subcutáneo y de la masa muscular (2).

La desnutrición es uno de los principales problemas de salud pública en los países en vías de desarrollo. Se considera que aproximadamente la mitad de la población mundial total ha sobrevivido a un período de desnutrición moderada o avanzada durante la infancia, calculándose que de los 815 millones de niños menores de 15 años que vivieron en 1975, alrededor de 329 millones no recibieron dietas adecuadas, por continuar operando en sus sociedades, los mismos factores que interfieren con la correcta distribución de los alimentos disponibles (1).

La historia natural de la desnutrición puede resumirse de la siguiente manera: las madres mal alimentadas, durante el embarazo no incrementan su dieta usual, ni dis

minuyen su actividad muscular, lo que provoca que los niños al nacimiento tengan peso y talla más baja que lo normal. Durante los primeros 3 a 4 meses de vida extrauterina, la alimentación al seno materno es más o menos satisfactoria a juzgar por los incrementos de peso y talla. La calidad de la leche es sorprendentemente buena, a pesar de que tampoco en la lactancia estas madres tiene una dieta adecuada. La cantidad de leche disminuye haciéndose insuficiente hacia los 4 a 6 meses de edad del niño, además de que no se introducen alimentos suplementarios en su dieta. Aunque variable en cuanto al tiempo, tarde o temprano se produce el destete de manera súbita, generalmente por un nuevo embarazo. Al niño se le priva de la leche materna disponible por un lado, y por otro no tiene acceso a los alimentos que constituyen la dieta del adulto (1).

Debido a las pésimas condiciones de nutrición e higiene, sobreviene la infección a través de algún alimento contaminado, generalmente por las manos de quien lo prepara, iniciándose una cadena de brotes diarréicos cada vez más graves y de mayor duración. Durante estos periodos y durante la convalecencia, es común reducir al mínimo la ingestión de alimentos, tanto por las madres como por los médicos (1).

Se puede decir sin temor a exagerar, que niños severamente desnutridos, con edad cronológica de 3 años han pasado en ayuno una cuarta o quinta parte de los días de su vida (1).

A partir de los 4 a 6 meses de vida, el niño comienza a mostrar desaceleración del crecimiento y desarrollo la cual es franca entre los 12 y 18 meses de vida y alcanza su máximo alrededor de los 30 a 36 meses. Al llegar a la edad escolar, las medidas antropométricas son inferiores a las correspondientes a la edad y hay retardo cronológico en la presencia de algunos cambios funcionales, propios de la maduración (1).

Al convertirse en adulto, la característica fundamental es su poco rendimiento en el trabajo, su falta de iniciativa y en general, la falta de interés hacia todo aquello que signifique un mayor esfuerzo físico y mental (1).

Esta secuencia se lleva a cabo en los niños que sobreviven a la desnutrición. Al aparecer uno o más períodos infecciosos, generalmente diarrea o bronconeumonía, el niño puede recuperarse en su medio, morir durante la fase aguda o ser trasladado a un hospital pa-

ra su tratamiento (1).

Aún cuando los antecedentes causales inmediatos de la DCP pueden variar, las alteraciones clínicas y bioquímicas fundamentales son las mismas en todos los países. Las variaciones regionales que se observan generalmente están asociadas a otras deficiencias nutricionales prevalentes en el área, al patrón de destete y a la patología infecciosa preponderante, (3).

Como producto de este proceso de desnutrición severa se ven alteradas funciones a diferente nivel de organización del individuo como son:

- a). Efectos a nivel fisiológico y bioquímico.
- b). Efectos a nivel celular.
- c). Efectos a nivel inmunológico.

A continuación se refieren algunos de los hallazgos más relevantes en los diferentes niveles mencionados.

#### a.- EFECTOS A NIVEL FISIOLÓGICO Y BIOQUÍMICO.

El análisis fisiológico y bioquímico ha revelado cambios metabólicos que son característicos del kwashiorkor y el marasmo, pero que pueden ser modificados por facto-

res ambientales locales como diarreas o por la composición electrolítica de las dietas.

Así tenemos que en el estudio del contenido de albúminas y globulinas séricas se halla que los niños con kwashiorkor muestran valores más bajos que aquellos con marasmo; además de que al agudizarse el cuadro de kwashiorkor, los niveles de proteínas mencionados disminuyen aún más. Por otro lado la concentración de los aminoácidos esenciales está reducida, mientras que los no esenciales se encuentran en concentraciones normales o aún elevados (4), (5).

En el kwashiorkor hay una infiltración característica de grasa en el hígado la cual no se observa en niños con marasmo. En base a algunos resultados experimentales se cree que esta acumulación quizá se deba a alguna falla en el transporte de las grasas desde el hígado a los tejidos periféricos, lo cual probablemente tenga sus orígenes en la reducida síntesis de proteínas o de sus precursores, las apoproteínas. Se ha encontrado además que existe una correlación entre la baja concentración de proteínas en el suero y esta infiltración grasa en el hígado, aún cuando todas las pruebas de las funciones hepáticas parezcan normales (6).



Los niveles de ácidos grasos libres en el plasma dependen de la dieta inmediata precedente, y es común que se encuentren alterados tanto en casos de kwashiorkor como de marasmo, tendiendo a la normalidad durante el tratamiento hospitalario. Los lípidos séricos, como el colesterol, triglicéridos y fosfolípidos se encuentran en concentraciones bajas en el marasmo y aún inferiores en el kwashiorkor.

Las grasas que se acumulan en el hígado son triglicéridos y parece que en los tejidos adiposos también son los principales componentes lipídicos. Una posible explicación de este fenómeno sería que las grasas hepáticas resultan de la combinación de un flujo alto de grasas desde los tejidos adiposos hacia el hígado, junto con una disminución de la síntesis de beta lipoproteínas en el hígado. Las beta lipoproteínas transportan triglicéridos hacia afuera del hígado, pero su concentración es reducida durante la DPC (7).

Por otro lado, se ha encontrado que las concentraciones de piruvato y de lactato en suero sanguíneo están incrementadas, mientras que las de glucosa se hallan por debajo del nivel normal tendiendo a disminuir más en aquellos niños en los que el kwashiorkor es más seve



ro, siendo por esto hipoglucémicos presentando una marcada intolerancia a la glucosa, tanto en forma oral como intravenosa (4).

Pineda en Guatemala al estudiar la actividad de algunas enzimas del ciclo de Krebs en neutrófilos polimorfonucleares de niños con DPC encontró que en el kwashiorkor hay un incremento significativo en la actividad de la enzima fumarasa, mientras que la actividad de la aconitasa se mantiene dentro de los límites normales. La deshidrogenasa-isocítrica y la deshidrogenasa málica disminuyen su actividad.

En el marasmo la actividad de estas enzimas se encuentran disminuida excepto en el caso de la deshidrogenasa isocítrica cuya actividad está incrementada (8).

Hansen ha demostrado que la secreción enzimática del páncreas se encuentra reducida en el kwashiorkor, siendo la quimotripsina la más afectada y la tripsina la menos afectada. En el marasmo ocurre algo similar, pero no tan severo como en el caso anterior. Este autor sugiere con base en estudios realizados en niños durante 5 años consecutivos, que el daño causado por la DPC continua puede dar origen a un daño pancreático irreversible.

ble (7).

Es de interés el reporte de Hansen acerca de que la concentración de hormona del crecimiento en el plasma de niños desnutridos está aumentada; este es un factor muy importante, dada la tendencia de esta hormona a inhibir la enzima arginin-succinato sintetasa que a su vez puede ejercer influencia desfavorable en el ciclo de la urea (9).

Diversos autores han hallado anomalías en diferentes sistemas enzimáticos, distintos de los mencionados previamente, encontrando que sus patrones de actividad están alterados (10), (11) y (12).

Durbin y col. hallaron que el alimentar a cerdos de 7 días de edad con una dieta consistente en una mezcla de vegetales al 5% o ésta misma mezcla adicionada con carbohidratos, la actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa hepática no se desarrollaba normalmente. En cambio, en animales alimentados con dietas normales o con dietas a las que se les agregó 5% de caseína, la actividad de la enzima fue normal. Con esto comprobaron que la calidad de la dieta es importante en el desarrollo normal de las funciones metabólicas (12).

En otros trabajos las concentraciones de aminoácidos libres en el plasma sanguíneo de niños con kwashiorkor muestran relaciones anormales de fenilalanina/tirosina (12).

Esta misma observación hecha por Cheung y col. en orina, sugiere la posibilidad de un defecto en el sistema enzimático que convierte la fenilalanina en tirosina en estos niños (12).

Esta idea es compatible con los resultados obtenidos en un experimento realizado en ratas desnutridas y que sugieren un retraso anómalo en la maduración del sistema de la fenilalanina-hidroxilasa (12).

Cravioto y col. al investigar la posible razón de la elevada retención de nitrógeno, observada en la desnutrición en niños y durante su recuperación analizaron cuantitativamente la actividad proteolítica total del hígado de ratas desnutridas desde el nacimiento hasta los 21 días y desnutridas del destete en adelante. Encontraron notables diferencias en la actividad de las enzimas involucradas en este proceso (13).

Waterlow indica por su parte que las altas concentra

ciones de cortisol tienen un papel importante en la DPC. Este compuesto normalmente favorece la síntesis de proteínas y al mismo tiempo causa un balance negativo de nitrógeno en todo el cuerpo, por esto el hígado obtiene este elemento a expensas de los tejidos periféricos tales como el músculo. Es evidente que en el estado nutricional deficiente, los requerimientos calóricos y proteícos son esenciales, por lo que es claro que se encuentre un desbalance orgánico como el mencionado (9)

Dado que las concentraciones de cortisol aumentan al doble con la DPC y su tasa de degradación está reducida, existe una mayor exposición de los tejidos a este compuesto, lo cual les permite asimilar mejor las proteínas de los tejidos.

Otras anomalías asociadas con la DPC son: atrofia de las células del miocardio, reducción del gasto cardíaco, el pequeño tamaño de las células musculares y el menor consumo de aminoácidos. Hay también deficiencia en las funciones del intestino aunque aún no se ha determinado con exactitud que actividad de reabsorción presenta (14).

Las funciones glomerulares y las tubulares de los

rificnes son anormales; el agua total, el volumen extracelular y el volumen del plasma sanguíneo se encuentran incrementados en relación al peso normal del cuerpo. - Además se registran concentraciones elevadas de bilirru bina en el plasma, correlacionadas estrechamente con - una alta tasa de mortalidad relacionada con el síndrome de la DPC (14).

Estos cambios fisiológicos son muy complejos y en el momento actual no se sabe con certeza cual es la importancia de cada uno de ellos, por ejemplo la combinación de hipoglicemia con concentraciones de insulina reducida y niveles de cortisol aumentados sugieren un marcado desequilibrio del control en la retroalimentación normal (9).

Estos hallazgos indican claramente como la desnutrición puede alterar los patrones metabólicos produciendo alteraciones en el crecimiento y en el desarrollo.

#### b. EFECTOS A NIVEL CELULAR.

El ciclo de vida de una célula en crecimiento, comprende el periodo entre su formación por la división de su célula madre y el tiempo requerido para que ella mis



na se divide (15).

Este ciclo comprende esencialmente dos períodos: la interfase, que abarca la mayor parte del ciclo, y el período de división. La observación de que las células duplican su ácido desoxirribonucleico (ADN) durante un cierto intervalo de la interfase, ha llevado a dividir al ciclo celular en cuatro fases, que fueron principalmente definidas por Alma Howard y Stephan Pelc (16) de la siguiente manera: fase  $G_1$  (gap) es el período comprendido entre la mitosis y el inicio de la fase S, que es la etapa de síntesis de ADN;  $G_2$  que es el período comprendido entre el final de S y el inicio de la fase de división D, que puede ser una mitosis o meiosis.

La duración del ciclo varía de un tipo celular a otro, esto es debido principalmente a que la longitud de la fase  $G_1$  puede variar de cero a varias horas, días o semanas. La duración de la fase S en células de mamíferos en proliferación es en promedio de 6 a 8 horas, la fase  $G_2$  de 2 a 6 horas y la fase D de una hora (17).

Deo en 1975 encontró que la proliferación, migración, diferenciación y muerte celular son procesos biológicos básicos que juegan un papel crucial en el crecimiento -



y desarrollo de los tejidos. Normalmente se mantiene un balance entre estos procesos, por lo que alteraciones de uno con respecto a otro modifican el desarrollo. La desnutrición altera la proliferación y migración celular, aunque la diferenciación parece no estar alterada. En la desnutrición los tejidos y células no son afectadas de la misma manera, ni en tiempo ni en dimensión (18).

Mathur y Deo en 1975, en un estudio realizado en foliculo de pelo y epidermis de fetos de ratas, siguiendo la técnica de incorporación de timidina tritiada ( $^3\text{H-TdR}$ ) y determinando fases del ciclo celular por medio de porcentajes de células marcadas contra tiempo, reportaron que en la desnutrición se afectan algunas fases del ciclo celular. El tiempo promedio de generación celular que ellos hallaron en los controles fué de 18 horas, siendo la fase  $G_2 + \frac{1}{2} M, S$  y  $G_1$  de 1.5, 7 y 9.5 horas respectivamente (19).

En los animales desnutridos la fase  $G_2$  se prolongó en 100% y la fase S en un 57% (19).

Deo y col. proponen que las fases del ciclo celular que son afectadas por la desnutrición son: la fase  $G_2$  -

por ser más sensible a la deficiencia de proteínas y la fase S por ser más sensible a la privación de energía, permaneciendo la fase G<sub>1</sub> sin alteración (18).

En otro trabajo los mismos autores proponen un alargamiento de la fase M, y reportan que la lesión fundamental causada por la desnutrición en órganos con alta renovación celular es una depresión de la proliferación celular con una pequeña alteración en la concentración de ácido ribonucleico (ARN) y proteínas (20).

Mediante estudios de autorradiografía con <sup>3</sup>HTdR se ha encontrado una prolongación en la fase S y en la duración del ciclo de las células del yeyuno de monos desnutridos (21). También se ha observado un retardo en el ciclo celular durante la regeneración de hepatocitos en ratas desnutridas (19).

Gaben-Cogneville y col. estudiaron el efecto de la DPC en las fracciones del estroma y de los adipocitos del tejido inguinal de ratas que fueron desnutridas por períodos variables a partir del nacimiento, encontraron que la proliferación y diferenciación celular se ven seriamente afectadas en relación directa a la duración del período de desnutrición (22).

Otro aspecto importante fué el hecho de que las células del estroma que se diferencian para producir adipocitos no fueron normales, considerando por esto que los procesos de diferenciación están interrumpidos durante la desnutrición, y que en este caso coincidió con un período activo de mitosis (22).

También se han estudiado aspectos celulares relacionados con el ADN, ARN y proteínas durante la desnutrición, como por ejemplo Winnick y Noble en una serie de estudios encontraron que moléculas como los ácidos nucleicos varían en proporción considerable durante la DPC cuando esta se establece en etapas tempranas de la vida, modificando los patrones de desarrollo del sistema nervioso central y otros órganos. Estos mismos autores han encontrado que los niños que padecieron y se recuperaron de una desnutrición tipo kwashiorkor y que presentan peso normal al nacimiento, muestran pequeñas diferencias en los valores de ADN con respecto a niños bien nutridos de la misma edad. En cambio, en niños que sufrieron desnutrición de tipo marasmático con peso normal al nacimiento sí se observan diferencias significativas respecto a los niños testigo. Las diferencias más marcadas, del orden del 50% o más, del déficit del contenido de ADN fueron halladas en un grupo de niños -

que tuvieron bajo peso al nacimiento y manifestaron desnutrición grave durante la época de la lactancia (24). - Ellos mismos han reportado en un trabajo experimental - una marcada variación en el contenido de proteínas, ADN y ARN en diversos órganos y tejidos de ratas desnutri - das al nacimiento, al destete y a los 65 días después - del destete, confirmando con esto otra característica - más de las que ya se han atribuido al síndrome de la - DPC.

Ortiz Muñiz en 1980 reportó un trabajo realizado en ratas desnutridas y bien nutridas, en el cual estudió - el ciclo a través de tres generaciones celulares, encon - trando mediante la técnica de la tinción diferencial de crométidas hermanas, un marcado retraso en la prolifera - ción celular en la médula ósea de las ratas desnutridas. Otro aspecto importante fué que al comparar el índice - mitótico (I.M.) promedio de ambos lotes, éste es más al - to en ratas desnutridas que en los controles. Este fe - nómeno quizá pueda ser explicado considerando que la fa - se mitótica dure más tiempo de lo normal, y que por es - to al inyectar colchicina a los animales durante una ho - ra, antes del sacrificio se encuentren más mitosis en - estas ratas (25).

Otros investigadores han reportado anomalías cromosómicas en niños. Así, Armendares y col. reportaron en 1971 una mayor incidencia de aberraciones en niños con DPC que en sus controles (26). En tanto que Betancourt, a pesar de encontrar aberraciones cromosómicas en niños desnutridos, sugiere que no puede afirmarse que la DPC vaya acompañada de una frecuencia mayor de estas aberraciones en los linfocitos provenientes de sangre periférica, proponiendo que la variabilidad existente en sus resultados puede deberse a variabilidad individual y a otros factores aún no determinados (27).

Por su parte Murthy y col. al estudiar niños con kwashiorkor, empleando el método de giemsa y fluorescencia para tinción de cromátidas hermanas, encontró que estos niños presentaban un mayor promedio de intercambio en sus linfocitos circulantes. En resumen, estos trabajos demuestran que la DPC tiene efectos concomitantes que producen cuadros patológicos diversos, que en la mayoría de las veces interfieren en el desarrollo óptimo del organismo y en muchas ocasiones son la principal causa de la mortalidad infantil en el mundo (28).

#### c.- EFECTOS A NIVEL INMUNOLÓGICO.

La DPC está asociada con una marcada susceptibili -



dad a las enfermedades infecciosas y a un comportamiento anómalo de varias facetas de la respuesta inmune, por lo cual se incrementa la vulnerabilidad a las enfermedades producidas por microorganismos patógenos (29). Numerosos investigadores han demostrado diferencias significativas de las funciones de inmunidad mediada por células, así como deficiencias en los niveles de complemento sérico y la actividad fagocitaria (29).

Muchos de los estudios publicados han involucrado niños severamente desnutridos con deficiencias nutricionales clínicamente aparentes. Los estudios llevados a cabo en humanos parecen indicar que el retardo del crecimiento utilizado comúnmente para determinar las deficiencias nutricionales moderadas, es acompañado por anomalías del sistema inmune (30).

La DPC está asociada con un decremento consistente del número de linfocitos T circulantes. Dado que la cuenta total de linfocitos es normal o baja durante la deficiencia nutricional, el número de linfocitos T en la sangre periférica está siempre disminuido (31).

Los mecanismos involucrados en estas observaciones no son claros aunque se cree que puedan deberse a alte



raciones como cambios en las proteínas de la superficie de la membrana o a la presencia de inhibidores tales como la proteína C-reactiva junto con altas concentraciones de la inmunoglobulina E. Otras causas pueden ser la linfolesis como una consecuencia de las altas concentraciones de cortisol libre en el plasma, la maduración y diferenciación anómalas de las células T responsables de la respuesta inmune celular (31). Así en estudios recientes, Chandra ha reportado una marcada heterogeneidad funcional y fisicoquímica de los linfocitos formadores de rosetas (31). En estos estudios se ha encontrado que en niños con DPC, los linfocitos con receptores para la IgM (células T, "auxiliares") están disminuidos, y aquellos con receptores para la IgG (células T, "supresoras") están ligeramente aumentados (31).

Las células nulas también inhiben la proliferación de linfocitos T inducida por mitógeno. También se ha demostrado que ambas actividades están aumentadas en los niños desnutridos, observación compatible con un incremento de las poblaciones de células T y células nulas. Estudios en animales sugieren que la deficiencia proteica produce pérdida selectiva de células supresoras. También hay ciertas pruebas de alteraciones en la densidad de linfocitos, aunque no se ha dilucidado

do el significado biológico de estos cambios en los subgrupos de células T (32).

El incremento de la desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) leucocitaria en la DPC sugiere una diferenciación incompleta de las células nulas para madurar a los linfocitos post-tímicos, demostración indirecta de la alteración de la influencia de inducción del timo en la DPC (32).

La actividad sérica de hormonas tímicas está reducida en la mayoría de los niños con DPC. Esto sugiere que el déficit inmunológico celular en la deficiencia nutricional puede deberse a la actividad inductiva tímica reducida (32).

En cuanto a los linfocitos B, la proporción de estos, identificados por la presencia de inmunoglobulinas en la superficie de la membrana, generalmente es normal en la DPC. Los valores ligeramente más altos observados en datos obtenidos tanto de sujetos bien nutridos como de los de nutrición deficiente en los países en desarrollo, comparados con las cifras obtenidas en sujetos sanos bien nutridos examinados en Europa y Estados Unidos, pueden reflejar la exposición más frecuente de los pri-

meros a diversos microorganismos como resultado de medidas sanitarias deficientes y del ambiente contaminado, incluyendo el agua y los alimentos. La proporción de células B está incrementada en el grupo desnutrido, lo cual puede representar el resultado de infecciones gastrointestinales y respiratorias repetidas en los niños con nutrición deficiente. En algunos casos, la reducción en el número absoluto de linfocitos B refleja la presencia de linfopenia, observación hecha en 15% de pacientes con DPC (32).

El análisis de los valores de inmunoglobulinas séricas en la DPC debe tener en cuenta tanto el estado nutricional como la presencia de infección. Las concentraciones de todas las inmunoglobulinas están elevadas en niños con DPC; se observan incrementos notorios de IgA e IgE, particularmente esta última, en individuos con infestación parasitaria. Es posible que la hiperinmunoglobulinemia sea resultado directo de infecciones repetidas de la piel y de los sistemas digestivo y respiratorio en la desnutrición. Alguna vez, en un niño con inicio temprano de DPC, los valores de las inmunoglobulinas, en particular de la IgG pueden estar bajos. Esto puede reflejar síntesis reducida, pérdida gastrointestinal de las proteínas, o ambas (32).

Además de la cantidad de anticuerpos producida en respuesta a la administración de antígeno, es importante la calidad o la capacidad para fijarse a dicho antígeno. Información reciente señala una disminución importante en la afinidad del anticuerpo producida en la DPC. La afinidad del anticuerpo en relación con la función macrofágica es evaluada por la depuración de la polivinilpirrolidona (PVP) marcada con  $^{125}\text{I}$ . Es posible que la reducción de la afinidad del anticuerpo en la DPC contribuya a la frecuencia de complejos inmunitarios en el suero de niños desnutridos y al desarrollo de inmunopatología en infecciones como el paludismo y la esquistosomiasis (32).

Las causas reales del aumento de los niveles de inmunoglobulinas en relación a la respuesta normal o disminuida de los anticuerpos no es clara, pero sería factible considerar a ciertos factores como los responsables de este fenómeno: muchos niños desnutridos, a diferencia de su contraparte, y de animales colocados en cuartos libres de gérmenes, tienen respuestas antigénicas altas como resultado de infecciones respiratorias e intestinales crónicas. Otros presentan dermatitis crónica que es una potente estimuladora de la IgE. Muchos desnutridos tienen parásitos intestinales, estimulantes



de IgE.

Hay considerable evidencia en la literatura que indica que las infecciones y sus complicaciones ocurren con más frecuencia y tienen las consecuencias más serias en niños que sufren DPC (32). Esta alta susceptibilidad incrementada en los niños desnutridos que sufren infecciones se atribuye a los efectos deletéreos de la privación nutricional sobre los mecanismos inmunológicos que sirven para prevenir o limitar las infecciones virales, bacterianas y fúngicas in vivo.

Los linfocitos de individuos desnutridos muestran in vitro una reacción disminuida a los mitógenos y a los antígenos, (32). Se encuentran respuestas bajas en la mayoría de los niños con DPC moderada a grave y en algunos niños con desnutrición leve. Las respuestas al mitógeno valoradas nuevamente después de la terapéutica nutricional se vuelven normales. Es posible que la razón principal para la disminución de la inmunidad mediada por células in vitro sea el reducido número de linfocitos formadores de rosetas. Si los resultados son corregidos para el número de tales células en las preparaciones, la diferencia entre los valores en DPC y en los grupos sanos es considerablemente menor. Además, el

uso de suero de ternera recién nacida o suero AB mezclado de res sana mejora la estimulación linfocítica a los mitógenos. En tales estudios es útil trazar una curva de respuesta a la dosis, ya que la respuesta proliferativa máxima puede requerir cantidades variables de mitógeno para las diferentes preparaciones de células. Las razones de las respuestas linfocíticas normales obtenidas por algunos investigadores no son claras (32); pudiendo haber contribuido las diferencias en el estado clínico de los pacientes y en las técnicas de cultivo celular.

La estimulación de los linfocitos con fitohemaglutinina y la actividad mitótica están disminuidas en animales con DPC (32). Además los estudios autorradiográficos han mostrado que la restricción proteica reduce el número de mitosis y la captación de timidina radioactiva en los tejidos linfoides estimulados con el antígeno.

Por su parte, y en contraste con los hallazgos mencionados previamente, José y col. (33) al trabajar con niños aborígenes australianos han hallado que mientras la respuesta humoral de las células B fué visiblemente disminuida, ciertos aspectos de la inmunidad individual mediada por células T se incrementaron.



Good, R.A. y col. reportan un incremento en las funciones inmunitarias mediadas por células T en ratas y ratones, que contrastan con los reportes de Chandra y otros autores en que los mitógenos concanavalina A, fitohemaglutinina y lipopolisacárido tienen una respuesta negativa por parte de los linfocitos de estos animales (34).

Por último Fernández y Yunis reportan una respuesta alta en la incorporación de <sup>3</sup>HTdR en células de bazo de ratas desnutridas como efecto de la estimulación por parte de los tres agentes mitogénicos. Cuando probaron fitohemaglutinina, los controles tuvieron cuentas que fueron incrementadas alrededor de 130 veces en comparación con las ratas desnutridas; al usar concanavalina A, la respuesta fue de 99 veces la del testigo y con lipopolisacárido la respuesta se incrementó 30 veces, indicando con esto que la respuesta inmunitaria es muy variable y que se necesitan investigaciones más amplias para apoyar o no estos resultados (35).

Otras reacciones importantes de la respuesta inmune, alteradas en la DPC y que están asociadas al funcionamiento óptimo de los linfocitos T y B son: la quimiotaxis, la capacidad opsonica del plasma que está reducida,

las reacciones de injerto contra huésped que se encuentran aumentadas en contraste con la capacidad de rechazo a los homoinjertos que algunos autores hallan aumentadas y a veces se mantienen sin cambio, así como una actividad microbicida que se encuentra reducida (32).

La respuesta inmunitaria óptima requiere una función adecuada de varios componentes celulares y humorales, así como de las interacciones entre ellos. Hay circuitos de retroalimentación positivos e inhibitorios. Es probable que la deficiencia nutricional afecte los diferentes mecanismos de defensa del huésped en una extensión variable. La mayor parte de los estudios a la fecha han sido enfocados hacia la respuesta inmunitaria individual. Los mecanismos inmunorreguladores auxiliar y supresor, muy bien pueden dar la clave del laberinto de interacciones de nutrición e inmunidad en el hombre y en los modelos animales (32).

## II. OBJETIVO.

Por todo lo antes expuesto puede verse que se ha realizado una investigación amplia en lo que se refiere a los efectos de la DPC en diferentes organismos. Sin embargo hay muchos aspectos como la proliferación celular

y la transformación blastoide de los linfocitos que hasta la fecha no han sido estudiados de una manera más amplia, tomando como referencia la cantidad de ADN determinada por medios puramente químicos. Por esto se decidió realizar la presente investigación la cual forma parte de un programa sobre la Biología de las Células Desnutridas que se desarrolla en el laboratorio de Biología Celular de la UAM-I y cuyo objetivo es determinar si existen diferencias significativas en la proliferación de poblaciones de linfocitos de niños sanos y desnutridos a través de la cuantificación de ADN.

### III. HIPOTESIS.

La hipótesis a probar es que la cantidad de ADN en los cultivos de niños sanos difiere significativamente de la registrada en los cultivos de niños desnutridos debido a una diferente proliferación.

### IV. MATERIAL Y METODOS.

La sangre se obtuvo por punción venosa con jeringas previamente heparinizadas (heparina Abbott 1000 UI), de niños severamente desnutridos (DPC de tercer grado, tanto de tipo marasmo como kwashiorkor) (figura 1) que in-

gresaron al servicio de nutrición del Instituto Nacional de Pediatría-DIF entre septiembre de 1981 y marzo de 1983, y en donde fueron valorados por personal especializado - que diagnosticó la enfermedad, así como las características de peso, talla, déficit de peso y tipo de infección en cada uno de los casos en que ellos proporcionaron las muestras (cuadro 1). Una vez obtenida la muestra de sangre se le mantuvo en refrigeración hasta que se efectuó la cuenta leucocitaria y la siembra.

Los niños que sirvieron como controles en el estudio, fueron aquellos que estaban siendo atendidos en los servicios de Oftalmología y Ortopedia y que no presentaban infecciones de ninguna naturaleza ni estaban recibiendo medicamentos en un intervalo de 2 ó 3 días antes de la toma de la muestra sanguínea. La edad de los niños controles estuvo dentro del intervalo de los niños desnutridos y todos fueron del sexo masculino.

**CUENTA DE LEUCOCITOS EN SANGRE TOTAL.-** Para ajustar el número de leucocitos en cada frasco de cultivo, se hizo evidente la necesidad de conocer la concentración de leucocitos por mililitro en cada muestra, para lo que se efectuó la cuenta leucocitaria como se explica a continuación: se aspiró la sangre previamente mezclada, con -

una pipeta para glóbulos blancos hasta la marca 0.5. Se continuó aspirando con el líquido de Turk (ácido acético (Merck) al 3% con 3 gotas de azul de tripano (Sigma) al 1% con la misma pipeta hasta la marca 1.1 (se rotó la pipeta mientras se aspiraba el diluyente), se agitó la pipeta durante 90 segundos aproximadamente para conseguir una suspensión uniforme. Se desecharon cuatro gotas del contenido de la pipeta, limpiando posteriormente la punta con una gasa o con papel absorbente. Después se llenó la cámara cuentaglóbulos en una forma tal que la distribución del líquido fuera uniforme. Se esperaron dos minutos y se contaron las células en un microscopio óptico Zeiss a 400 aumentos, por último se multiplicó el resultado de la cuenta por 50 que es el factor de dilución, obteniéndose así el número de leucocitos por milímetro cúbico.

#### CULTIVO DE LINFOCITOS A PARTIR DE SANGRE COMPLETA.-

La técnica de cultivo empleada se modificó de la técnica propuesta por Arakaki y Sparkes (36). Bajo condiciones de esterilidad, se sembró la sangre de los niños de la siguiente manera: en cada frasco ampula de 60 ml. vertieron 5 ml. de medio de cultivo McCoy (Microlab) 0.2 ml. de fitohemaglutinina (Microlab), reconstituido con agua destilada estéril; 0.02 ml. de solución de pe-



nicilina-estreptomina (Microlab) en proporción 1:1; y finalmente se añadió una cantidad de sangre conteniendo  $2.0 \times 10^6$  leucocitos. Se sembraron 10 frascos de cultivo por niño.

COSECHA.- La técnica de cosecha es una modificación a la técnica propuesta por Moorhead y col. (37). Tomando como tiempo cero (0), la hora de la siembra, se cosecharon los cultivos a las 24, 48, 72 y 96 horas para posteriormente hacer el análisis bioquímico de ADN. Se sacaron los frascos de cultivo de la incubadora (2 por cada hora de cosecha y por muestra) y se agitaron suavemente para que se desprendieran las células y se mezclaron uniformemente; acto seguido el material se extrajo con una pipeta Pasteur y se colocó en tubos de centrifuga de 15 ml. Se centrifugó a 117.6 g durante 10 minutos. Después de la centrifugación, de cada tubo se desechó el sobrenadante, quedando solo los paquetes celulares que se resuspendieron por medio de una agitación fuerte, para efectuar el siguiente paso. En seguida se fijaron los linfocitos agregando una solución de ácido acético glacial (Merck) + alcohol metílico (Merck) en proporción de 1:3 y se agitó fuerte y rápidamente para impedir la formación de grumos y se llevó a un volumen de 6 ml. con fijador. Se dejaron reposar 5 minutos a temperatura ambiente.

te y se centrifugaron 10 minutos a 111.7 g. Después de esta segunda centrifugación se eliminó el sobrenadante y se llevó el paquete celular a un volumen final de 4 ml. con fijador resuspendiéndose, se volvió a centrifugar una vez más y se eliminó otra vez el sobrenadante quedando con esto, listos los linfocitos para la extracción de ácidos nucleicos totales.

Para efectuar la cuenta de células transformadas y no transformadas en preparaciones para análisis microscópico, se siguió la misma técnica de Moorhead et al (37) suprimiendo el choque hipotómico y lavado con fijador hasta obtener un paquete de células blanco y el sobrenadante transparente.

Al observar al microscopio cada una de las proporciones, se consideraron núcleos transformados (T) a aquellos que tenían una apariencia más laxa, teñidos más débilmente y con un tamaño que en muchos casos estuvo entre 2 y 6 veces el diámetro de los que se consideraron núcleos no transformados (No T), los cuales a diferencia de los transformados presentan generalmente un aspecto compacto y tinción más oscura.

EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS TOTALES EN CULTIVOS

DE LINFOCITOS.- La técnica de extracción es una modificación hecha a la técnica de Schneider (38). El tubo de centrifuga con el paquete celular se agitó y se le adicionaron 2 ml. de ácido perclórico IN (PCA) (J.T. Baker), se incubó en baño maría a 70°C durante 20 minutos. Terminando la incubación se centrifugó a 698.1 g, durante 5 minutos para extraer el sobrenadante que contenía los ácidos nucleicos en cual se pasó a un vial de vidrio quedando en el fondo las proteínas.

CUANTIFICACION DE ADN UTILIZANDO LA REACCION DE DISCHE MODIFICADA POR BURTON (39).- Se agregó un volumen del reactivo de difenilamina modificado por Gilles y Myers (40) por cada volumen de extracto final (el sobrenadante con los ácidos nucleicos). El reactivo se preparó en el momento de la cuantificación. Los viales se colocaron bajo 3 lámparas de luz fluorescente de 20 watts (Phillips TL 20W/54) recibiendo una intensidad de aproximadamente 500 Lx, la exposición de los viales a la luz se efectuó durante 4 horas a temperatura ambiente y a una distancia de 10 cms. de las lámparas. Las absorbancias de las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro Zeiss PM a 595 y a 700 nm.

La razón por la que se leyó a dos longitudes de onda

es, que el complejo que se forma en la reacción de la difenilamina tiene su máximo de absorción a 595-600 nm, careciendo de otra banda de absorción, y la absorción obtenida a 700 nm se estima que es debida a las impurezas presentes en la muestra. Así para corregir el valor de ADN obtenido para cada lectura, es necesario restarle al valor obtenido a 595 nm el valor obtenido a 700 nm.

Posteriormente se determinó la cantidad de ADN presente en la muestra, multiplicando la absorbancia por el factor de la curva patrón (78.51) y por el volumen del extracto final (2 ml.), obteniendo de esta manera la concentración de ADN en microgramos por cultivo.

Para preparar la curva de calibración, se hizo una solución patrón de ADN de timo de ternera (Merck) con una concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$  en PCA 1 N, y se tomaron alícuotas de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12 y 0.14 ml. que se aforaron a 1 ml. con PCA 1 N obteniéndose concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Se incubaron con luz fluorescente durante 4 horas, al término de las cuales se leyeron en el espectrofotómetro Zeiss PM6 a 595 y 700 nm. Para obtener el factor de absorbancia de la curva, se dividió ca

da concentración entre su absorbancia, obteniéndose así factores individuales que posteriormente se promediaron dando un valor de 78,51, como se muestra en el cuadro 2 y en la gráfica 1 en la que se indica la correlación.

OBTENCION Y AISLAMIENTO DE LINFOCITOS A PARTIR DE SANGRE COMPLETA CON FICOLL-PAQUE (41).- Se tomaron 5ml de sangre con una jeringa heparinizada y se diluyeron en proporción 1:1 con solución salina isotónica de NaCl 0.15 M, pH 7.2-7.4. Se puso en un tubo de centrifuga de 15 ml. un volumen de Ficoll-Paque de 2.5 a 3.0 ml. En cada tubo de centrifuga se pusieron 5 ml. de sangre diluida escurriéndola por las paredes para evitar que se mezclara con el Ficoll-Paque. Se centrifugó a 167.55 G a 20°C por 30 a 40 minutos, y se obtuvo una banda de linfocitos. Se pasó a otro tubo de centrifuga limpio, se añadió tres veces su volumen de solución salina isotónica, y se resuspendió. Después se centrifugó a 111.7 g. durante 10 minutos a 20°C. Se decantó, y se desechó el sobrenadante para obtener el paquete celular (1 ml.). Por último se resuspendió el paquete celular en 20 ml. de solución salina isotónica, para posteriormente contar el número de linfocitos por mililitro en una cámara de Newbauer.

De la suspensión de linfocitos aislados, se tomaron



alícuotas (0.125-2.0 ml) por duplicado con un contenido de  $0.25 \times 10^6$ - $4.0 \times 10^6$  células, las cuales fueron centrifugadas para remover el sobrenadante y dejar un paquete celular, al que se le extrajeron los ácidos nucleicos por medio de la técnica de Schneider (38), para posteriormente determinar el ADN por medio de la reacción de Dische modificada por Burton (39).

Se hizo una gráfica con las concentraciones de ADN determinadas en las alícuotas de la suspensión de linfocitos y el número de células contadas en la cámara de Newbauer (cuadro No. 3 y gráfica 2).

#### V. RESULTADOS.

La muestra estudiada fué de sangre de siete niños desnutridos y de siete niños testigos.

Al cuantificar el ADN en cada uno de los cultivos se obtuvieron los resultados que se muestran en los cuadros y gráficas 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, en donde se puede notar que las concentraciones de ADN en los niños desnutridos se sitúa en general por encima de aquellas obtenidas en los niños testigos, sobre todo en las determinaciones de las 48, 72 y 96 horas. Solamente en el ca-

so 3 las curvas se presentaron prácticamente iguales.

En general se puede observar que la cinética de proliferación celular empieza a diferenciarse a partir de las 24 horas, siendo a las 48 horas cuando se observa un cambio notable en el crecimiento. También se observa en cada gráfica que, tanto en los niños desnutridos como en los sanos, existe un decremento en el contenido de DNA entre las cero y las 24 horas de cultivo.

Esto posiblemente se deba a que las células están adaptándose al medio, por lo que algunas mueren y no se les registra en las siguientes horas de cultivo. Este podría ser el caso de los linfocitos B y polimorfonucleares que forman del 4 al 9% de la población total de células de las muestras y que además no son estimulados por la fitohemaglutinina, ya que el conteo del número inicial de células correspondió al total de leucocitos presentes.

Como se puede observar en las gráficas individuales todos los cultivos tuvieron un comportamiento muy semejante, por lo que se promediaron los valores obtenidos para cada hora de cultivo tanto en los testigos como en los desnutridos, obteniéndose la gráfica 10.

En ese cuadro se pueden observar dos cosas importantes: 1.- A las cero horas no existe ninguna diferencia significativa debido a que el inóculo de cada frasco de cultivo y de cada niño está ajustado a  $2.0 \times 10^6$  células (leucocitos). 2.- A partir de las 48 horas las concentraciones de ADN se empiezan a incrementar en ambos grupos haciéndose evidente que dicho incremento es mayor en los desnutridos sobre todo entre las 72 y 96 horas.

Para verificar si en los cultivos de los niños desnutridos estaba ocurriendo una mayor proliferación que en los testigos, se hicieron preparaciones de células cultivadas durante 96 horas de dos niños de cada uno de los grupos tomados al azar, y se observaron al microscopio para determinar la cantidad de células que había por cultivo, y así determinar que porcentaje correspondía a células no transformadas (No T) y cual a células transformadas (T), siendo estas las que aparentemente respondieron a la fitohemaglutinina. Los resultados se ilustran en el cuadro 5 y en la gráfica 11, en los cuales se puede ver que en el grupo de los desnutridos se halló un porcentaje mayor de núcleos no transformados, ocurriendo lo contrario en los niños sanos. Sin embargo hay que hacer notar que las sumas totales de células

NT y T (T y nT) en el grupo de los niños desnutridos es 3 veces mayor que el total de células (T y nT) encontrados en los niños sanos.

Al efectuar el análisis de pendientes y el análisis de medianas (42) de ambas curvas no se obtuvo ninguna diferencia estadísticamente significativa, lo que demostró que ambas curvas eran similares (gráfica 10).

Aunque no hubo diferencia entre estas curvas de proliferación la diferencia entre la cantidad de ADN en cada grupo a medida que pasaba el tiempo de cultivo se va haciendo más amplia, por lo que se efectuó un análisis de varianza (43) para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos a las diferentes horas de cosecha, encontrándose que para las cero y 24 horas de cultivo no existen diferencias significativas, y para las 48, 72 y 96 horas sí se encontró una diferencia significativa con una  $F = 4.75$ ,  $g1 = 1, 12$ ,  $p < 0.05$  - - (cuadro 4).

Para cuantificar las diferencias entre núcleos transformados y no transformados encontradas en los cultivos de células de dos niños desnutridos y dos sanos, se llevó a cabo la prueba de "t" de Student. Este análisis se -

realizó en dos formas: en la primera se tomó el total de células sin discriminar no transformadas y transformadas, y se compararon los dos grupos de niños. En la segunda se tomaron en cuenta los núcleos transformados.

En la comparación de núcleos transformados hubo diferencias significativas con una  $t=2.64$ ,  $gl=1,2$ ,  $p < 0.025$ , lo que parece indicar que ese incremento de ADN en los cultivos de niños desnutridos es debido al gran número de células no transformadas pero que sí están dividiéndose y quizá corresponden a células nulas (Cuadro 5, gráfica 11).

## VI. DISCUSION.

Los resultados aquí presentados corroboran la sensibilidad de la técnica de cuantificación de ADN reportada por Medina en 1980, (44).

La cinética de proliferación de los cultivos de linfocitos tal como se aprecia en las gráficas, sigue un modelo de comportamiento con crecimiento exponencial, con una fase "lag" (período en el cual las células se adaptan al medio) de aproximadamente 24 horas en los 2 grupos, teniendo el mínimo de crecimiento a las 17:10 horas



en el grupo desnutrido y a las 23:33 horas en el sano - (ver gráfica 10), lo que indica un período de latencia mayor en el grupo testigo. Estos valores se calcularon a partir de los datos promediados de cada grupo y aplicándoles un método de mínimos cuadrados para curvas, en ambos casos el valor corresponde al punto más bajo de una parábola de la forma  $y(x) = a - bx + cx^2$ , en donde  $y$  es la concentración de ADN,  $x$  es el tiempo y  $a, b, c$  son coeficientes. Esos valores son expresiones del aumento de la concentración de ADN y corresponden a la primera derivada de la ecuación mencionada (42).

Por otra parte se puede ver que las curvas de proliferación en ambos grupos están separadas por intervalos cada vez mayores, lo cual se debe a que conforme avanza el tiempo de cultivo la división celular aumenta, y en consecuencia la concentración de ADN. Esto parece indicar que es el grupo de los niños desnutridos el que tiene una proliferación celular mayor, aunque no más rápida.

Al analizar los resultados de las cuentas de transformación, aparentemente los datos son contradictorios con los resultados de la cuantificación de ADN, ya que lo esperado era que la proliferación de linfocitos en -

cultivo debe ir acompañada de transformación blastoide como una respuesta a la fitohemaglutinina. Se observó que a pesar de que los cultivos de sangre de niños desnutridos tuvieron un número de células mayor por preparación, su índice de transformación fué muy bajo comparado con el observado en los niños sanos, aún cuando la cuantificación de ADN indica que hubo una proliferación más alta que la de los niños sanos.

Una posible explicación a esta supuesta discordancia podría deberse a que esos núcleos "no transformados" no son linfocitos T, sino las llamadas "células nulas", que según Chandra (45) son células precursoras de linfocitos T que proliferan sin diferenciarse a linfocitos y que se han encontrado aumentadas en cultivos de células de niños severamente desnutridos.

Esto podría explicar el gran número de células en las preparaciones de los niños desnutridos y su bajo índice de transformación.

Por otro lado, varios autores han reportado en general que los linfocitos de niños desnutridos poseen una capacidad reducida de respuestas a los agentes mitogénicos cuando son cultivados in vitro (46-49), pero

en ningún caso determinan microscópicamente la transformación blastoide, y solamente trabajos como los de Jose y col. (33) y de Good y col. (34) hablan de transformación blastoide aumentada, pero sin hacer observaciones al microscopio, y solo apoyan sus datos en función del índice de incorporación de timidina tritiada que ellos encuentran al efectuar sus experimentos y que apoyan de manera indirecta estos hallazgos.

Por todo lo anterior se puede indicar con los resultados aquí presentados que los niños desnutridos efectivamente pueden tener una capacidad inmune abatida, debido a una transformación blastoide deficiente, sin embargo esto no quiere decir que se disminuya la capacidad proliferativa de todos los tipos celulares, ya que los hallazgos aquí presentados muestran que existe una población celular que aunque morfológicamente no está transformada, sí prolifera activamente, pudiendo ser la que corresponde a células nulas.

## VII. CONCLUSIONES.

- 1.- Se encontró diferencia en cuanto a la cantidad de ADN entre niños sanos y desnutridos, presentando estos últimos los mayores valores.

- 2.- Existe una transformación blastoide mayor en los ni  
ños sanos que en los desnutridos.
- 3.- La transformación blastoide deficiente sugiere una  
respuesta inmune abatida.
- 4.- La desnutrición protéico-Calórica ejerce una influencia  
limitante en el funcionamiento óptimo de los linfo  
citos T.

**FIGURA 1**  
**NIÑOS PRESENTANDO LOS DOS TIPOS DE DESNUTRICION**  
**PROTEICO-CALORICA SEVERA.**



**KWASHIORKOR**



**MARASMO**



CUADRO 1

CARACTERISTICAS DE LOS NIÑOS DESNUTRIDOS EL DIA DE LA TOMA DE SANGRE.

NI- No	INICIALES	SE- XO	EDAD (meses)	TALLA (cm.)	PESO (kg.)	DEFICIT DEL PESO (%)	DIAGNOSTICO	INFECCION
1	E.R.A.	♂	12	80	8.000	24.95	K	1
2	S.I.	♂	12	62	4.800	53.38	M	2,3
3	C.G.A.	♂	60	87	9.580	48.77	K	1,4,5
4	P.M.T.	♂	14	64	4.240	59.81	K	1,6
5	C.N.C.	♂	7	50	3.220	60.89	K	1,7,8
6	R.F.G.	♀	3.5	41	3.000	46.85	M	9
7	V.R.M.	♀	7	58.6	3.850	50.76	M	1

K = kwashiorkor

M = marasmo

1 - Salmonella sp.

2 - Cándida sp.

3 - Varicela.

4 - Pseudomona sp.

5 - Klebsiella sp.

6 - E. coli.

7 - Streptococcus sp.

8 - Staphylococcus sp.

9 - Giardia lamblia.

CUADRO 2

ABSORBENCIAS OBTENIDAS AL ELABORAR LA CURVA DE CALIBRACION CON LAS QUE SE OBTUVO EL FACTOR DE ABSORBENCIA.

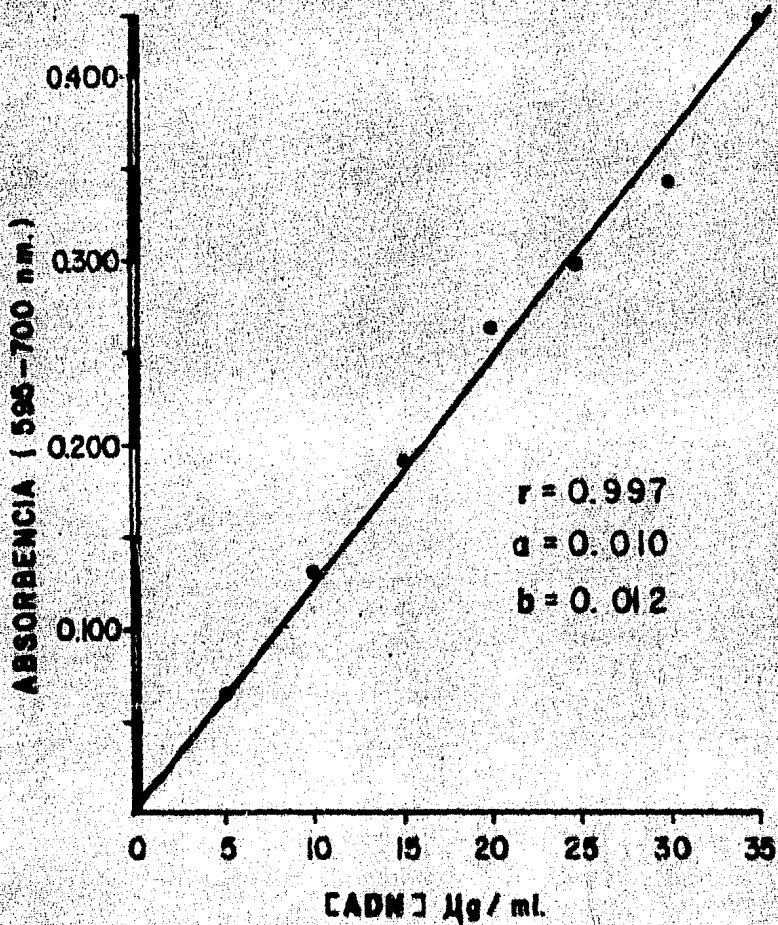
TUBO	[ADN] µg/ml.	ABSORBENCIA		RELACION [ADN]/Abs.	FACTOR DE ABS.
		595nm.	700 nm.		
1	5	0.064	0.001	5 / 0.065	76.92
		0.072	0.002		
2	10	0.134	0.003	10 / 0.132	75.75
		0.144	0.011		
3	15	0.196	0.000	15 / 0.196	76.53
		0.199	0.002		
4	20	0.274	0.005	20 / 0.265	75.61
		0.265	0.005		
5	25	0.299	0.000	25 / 0.297	84.17
		0.298	0.001		
6	30	0.377	0.002	30 / 0.378	79.36
		0.384	0.003		
7	35	0.465	0.014	35 / 0.430	81.39
		0.429	0.011		

FACTOR DE ABSORBENCIA PROMEDIO = 78.51 u. abs.

147.

GRAFICA I

CURVA DE CALIBRACION PARA LA DETERMINACION  
DEL ADN MEDIANTE LA REACCION DE LA  
DIFENILAMINA ACTIVADA POR LA LUZ.



$r$  = Coeficiente de Correlación  
 $a$  = Ordenada al Origen  
 $b$  = Pendiente

CUADRO 3

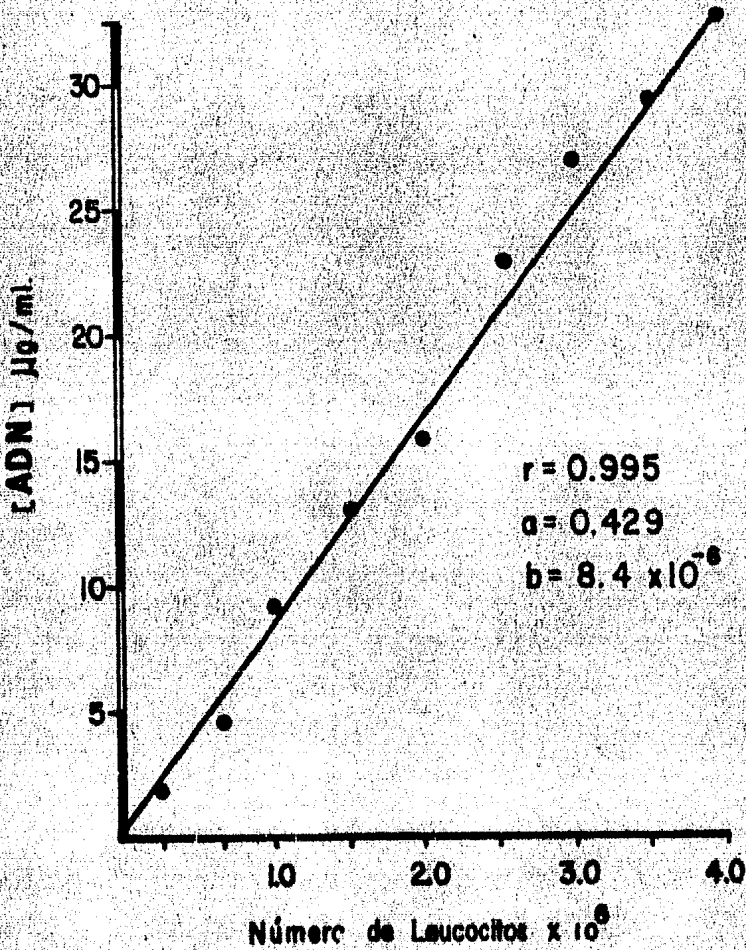
DATOS DE LA DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ADN CONTRA EL NUMERO DE LINFOCITOS.

Nº DE CELULAS	ABSORBENCIA		PROMEDIO	µg ADN/ml.
	595nm.	700 nm.		
250 000	0.012	0.000	0.0125	1.96
	0.016	0.003		
500 000	0.035	0.004	0.0300	4.71
	0.029	0.000		
1 000 000	0.060	0.002	0.0585	9.18
	0.062	0.003		
1 500 000	0.087	0.001	0.0840	13.18
	0.085	0.003		
2 000 000	0.107	0.004	0.1010	15.85
	0.100	0.001		
2 500 000	0.151	0.002	0.1460	22.92
	0.144	0.001		
3 000 000	0.177	0.001	0.1750	27.47
	0.180	0.006		
3 500 000	0.168	0.000	0.1870	29.50
	0.189	0.003		
4 000 000	0.210	0.000	0.210	33.00
	0.214	0.004		



## GRAFICA 2

CORRELACION ENTRE EL NUMERO DE LINFOCITOS  
Y LA CONCENTRACION DE ADN EN  $\mu\text{g/ml}$ ,  
OBTENIDOS POR MEDIO DE LA TECNICA DE  
AISLAMIENTO CON Ficoll-paque.



$r$  = Coeficiente de correlación  
 $a$  = Ordenada al Origen  
 $b$  = Pendiente

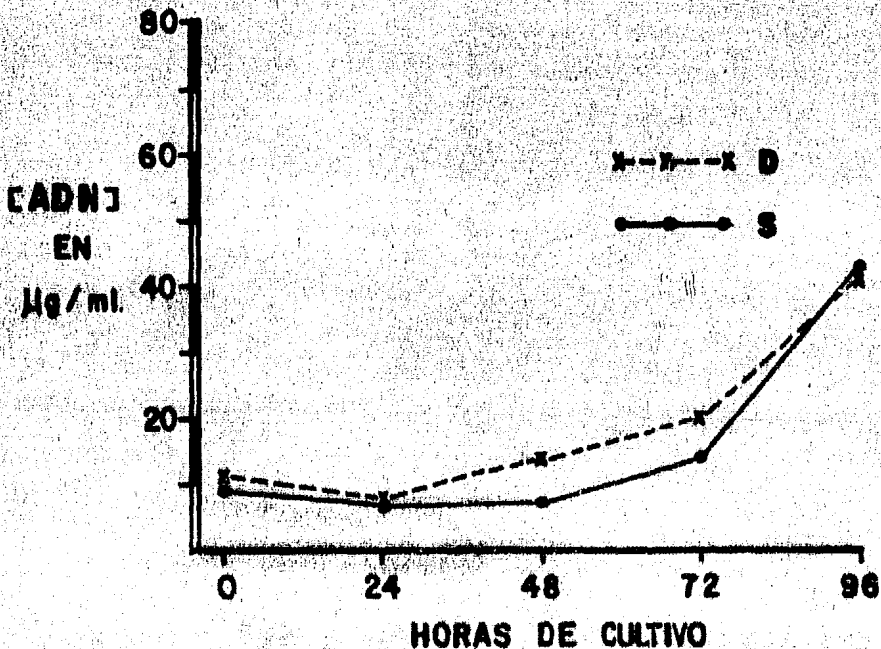


## GRAFICA 3

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ADN EN  
CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA  
EN DOS GRUPOS DE NIÑOS A DIFERENTES TIEMPOS  
DE COSECHA.

HORAS DE CULTIVO	ABSORBENCIA (595 - 700 nm)		[ADN] $\mu\text{g} / \text{ml}$	
	S	D	S	D
00.00	0.060	0.064	9.42	10.12
24.00	0.040	0.046	6.28	7.22
48.00	0.043	0.089	6.83	13.97
72.00	0.086	0.129	13.58	20.25
96.00	0.273	0.264	42.86	41.45

S = SANOS      D = DESNUTRIDOS



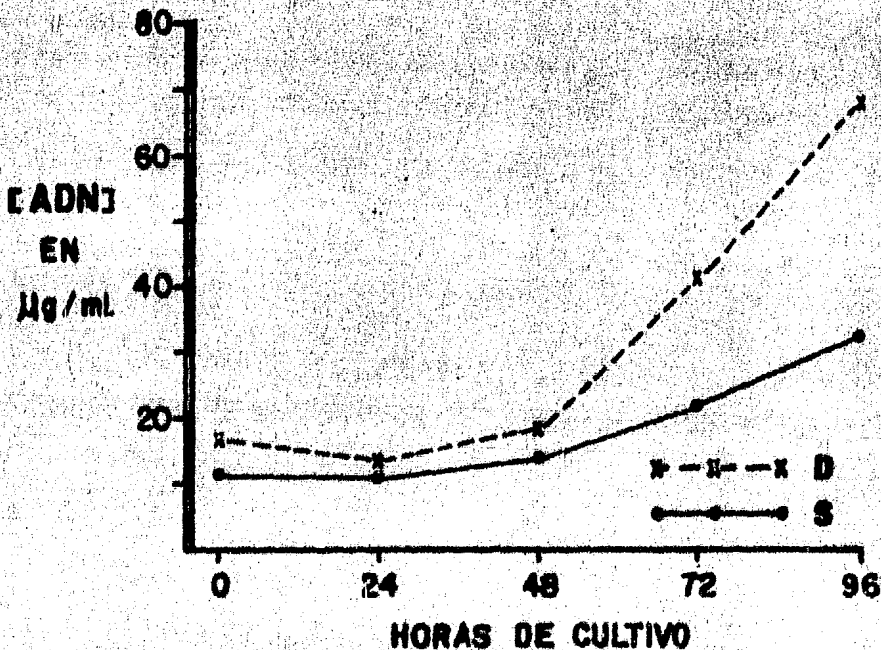
## GRAFICA 4

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ADN EN  
CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA  
EN DOS GRUPOS DE NIÑOS A DIFERENTES TIEMPOS  
DE COSECHA.

HORAS DE CULTIVO	ABSORBENCIA (595-700 nm.)		[ADN] $\mu\text{g} / \text{ml}.$	
	S	D	S	D
00.00	0.073	0.108	11.54	17.03
24.00	0.071	0.084	11.22	13.18
48.00	0.089	0.117	13.97	18.18
72.00	0.138	0.264	21.74	41.45
96.00	0.204	0.432	32.03	67.83

S = SANOS

D = DESNUTRIDOS



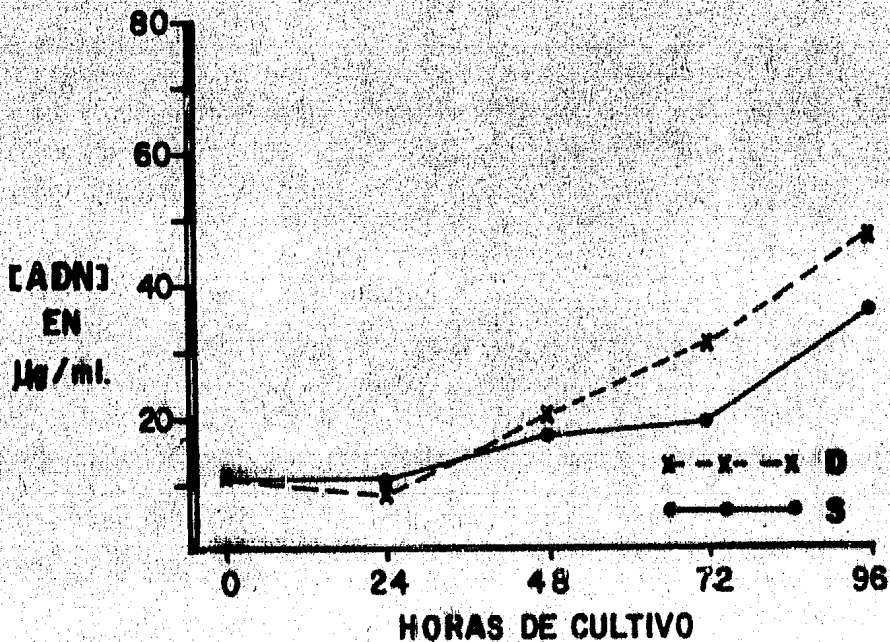
**GRAFICA 5**

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ADN EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN DOS GRUPOS DE NIÑOS A DIFERENTES TIEMPOS DE COSECHA.**

HORAS DE CULTIVO	ABSORBENCIA 595-700 nm		[ADN] $\mu\text{g}/\text{ml}$ .	
	S	D	S	D
00.00	0.079	0.075	12.48	11.85
24.00	0.067	0.056	10.59	8.79
48.00	0.108	0.129	17.03	20.33
72.00	0.125	0.202	19.62	31.77
96.00	0.232	0.303	36.50	47.57

**S = SANOS**

**D = DESNUTRIDOS**

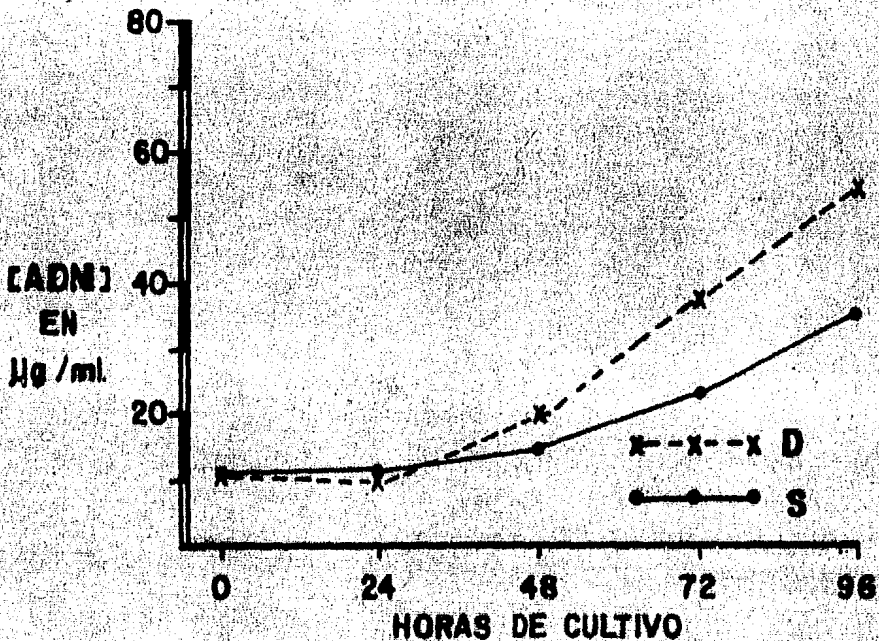


## GRAFICA 6

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ADN EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN DOS GRUPOS DE NIÑOS A DIFERENTES TIEMPOS DE COSECHA.

HORAS DE CULTIVO	ABSORBENCIA 595-700 nm.		[ADN] $\mu\text{g/ml}$	
	S	D	S	D
00.00	0.072	0.072	11.38	11.38
24.00	0.070	0.066	11.06	10.36
48.00	0.094	0.129	14.75	20.25
72.00	0.151	0.242	23.71	37.99
96.00	0.226	0.351	35.56	55.11

S= SANOS D=DESNUTRIDOS

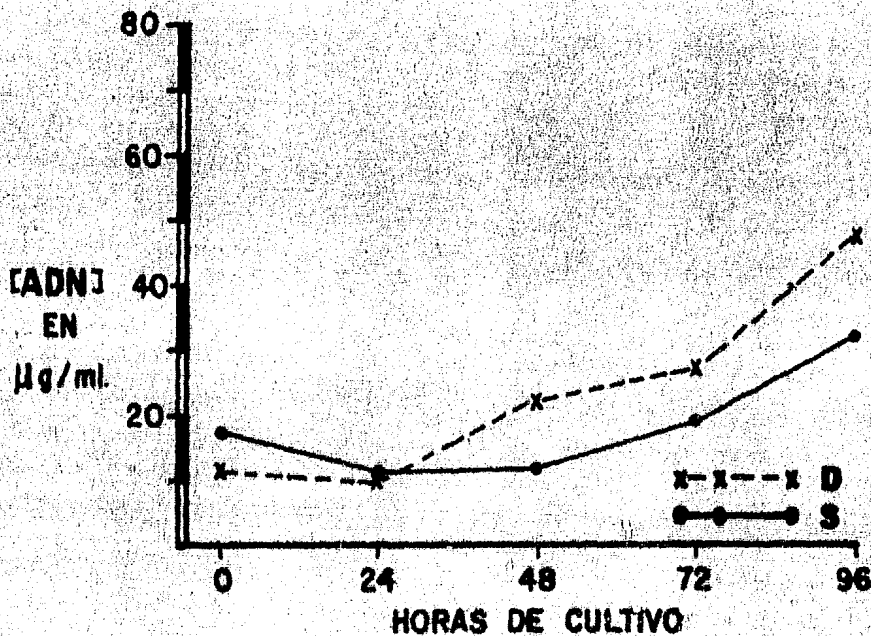


## GRAFICA 7

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ADN EN  
CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA  
EN DOS GRUPOS DE NIÑOS A DIFERENTES TIEMPOS  
DE COSECHA.

HORAS DE CULTIVO	ABSORBENCIA 595-700 nm.		[ADN] $\mu\text{g/ml}$	
	S	D	S	D
00.00	0.111	0.074	17.42	11.69
24.00	0.074	0.068	11.61	10.75
48.00	0.074	0.140	11.69	22.06
72.00	0.124	0.174	19.54	27.39
96.00	0.204	0.301	32.11	47.34

S=SANOS D=DESNUTRIDOS



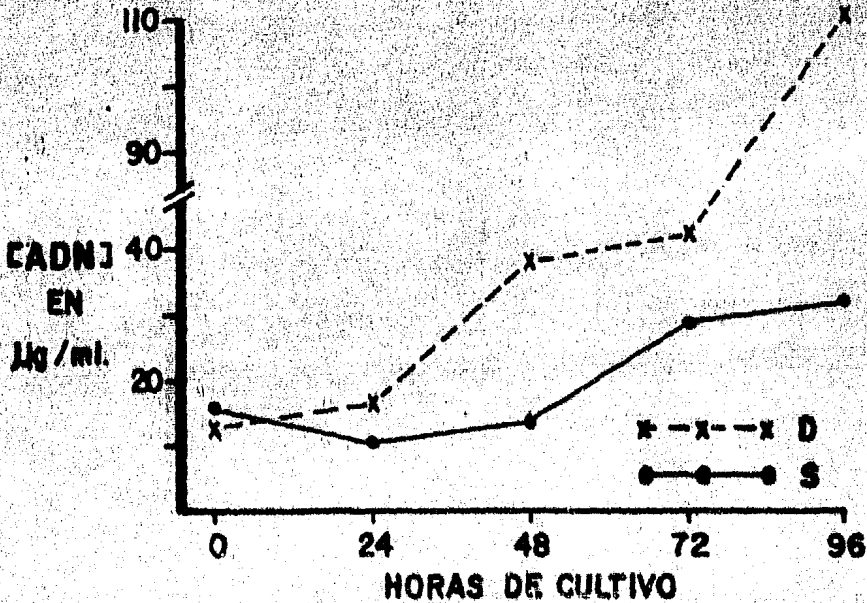


**GRAFICA 8**

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ADN EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN DOS GRUPOS DE NIÑOS A DIFERENTES TIEMPOS DE COSECHA.**

HORAS DE CULTIVO	ABSORBENCIA 595-700 nm		[ADN] µg/ml.	
	S	D	S	D
00.00	0.099	0.080	15.62	12.52
24.00	0.066	0.102	10.36	16.01
48.00	0.086	0.243	13.58	38.28
72.00	0.184	0.270	28.97	42.39
96.00	0.205	0.707	32.26	111.09

**S = SANOS      D = DESNUTRIDOS**

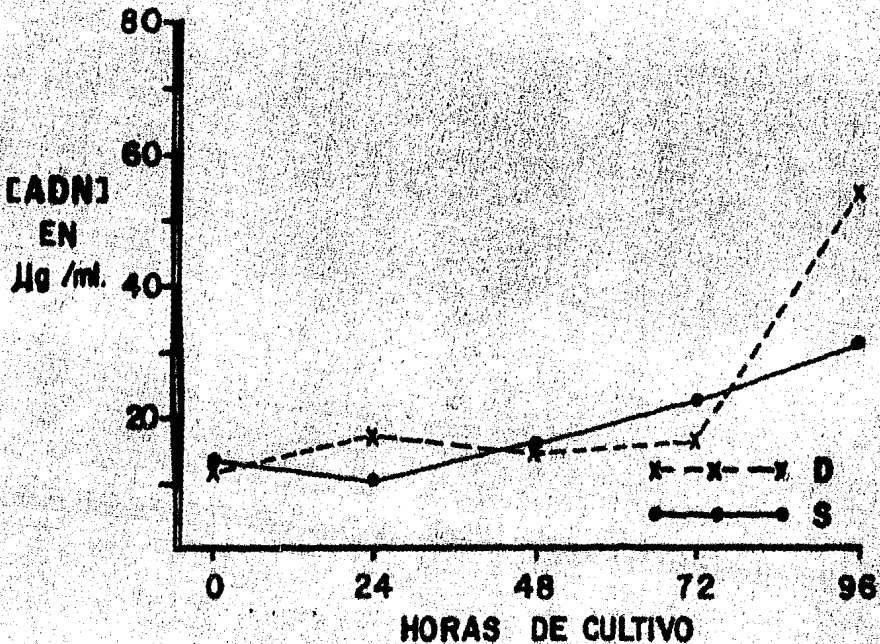


**GRAFICA 9**

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ADN EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN DOS GRUPOS DE NIÑOS A DIFERENTES TIEMPOS DE COSECHA.**

HORAS DE CULTIVO	ABSORBENCIA 695 - 700 nm		[ADN] $\mu\text{g/ml}$	
	S	D	S	D
00.00	0.088	0.078	13.81	12.35
24.00	0.070	0.111	10.99	17.48
48.00	0.103	0.096	16.25	15.43
72.00	0.146	0.105	23.00	16.53
96.00	0.199	0.344	31.32	54.01

**S = SANOS      D = DESNUTRIDOS**



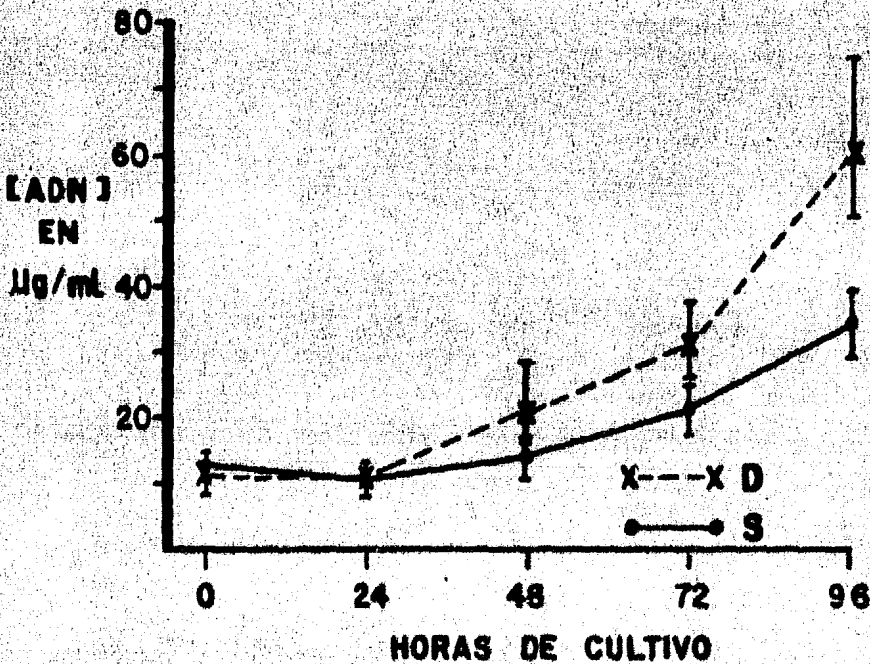
GRAFICA 10

PROMEDIO DE LA CONCENTRACION DE ADN EN  
LOS 7 CASOS ± DESVIACION ESTANDAR.

HORAS DE CULTIVO	CONCENTRACION DE ADN/ml.			
	SANOS		DESNUTRIDOS	
	$\bar{X}$	D.E.	$\bar{X}$	D.E.
0.0	13.08	2.74	12.42	2.17
24.0	10.30	1.81	11.97	3.76
48.0	13.44	3.56	21.21	8.05
72.0	21.45	4.78	31.11	10.21
96.0	34.66	4.12	60.62	23.76

$\bar{X}$  = PROMEDIO

D.E. = DESVIACION ESTANDAR.



**CUADRO 4**

**ANALISIS DE VARIANZA ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE ADN  
EN CELULAS DE NIÑOS DESNUTRIDOS Y EUTROFICOS  
A DIFERENTES HORAS DE CULTIVO.**

HORA	F	PROBABILIDAD
0.0	0.2642	$p > 0.05$
24.0	1.1352	$p > 0.05$
48.0	5.4968	$p < 0.05$
72.0	5.1579	$p < 0.05$
96.0	8.1137	$p < 0.05$

**g.l. 1, 12 en todos los casos.**



CUADRO 5

CANTIDAD DE NUCLEOS TRANSFORMADOS Y NO TRANSFORMADOS EN CULTIVOS DE SANGRE DE NIÑOS DESNUTRIDOS Y NIÑOS EUTROFICOS.

Niños Testigos

Niño No.1	T	NoT	Total ( T+ NoT)
	7975	1795	9770
Niño No.2	4720	144	4864
TOTAL	12695	1939	14634

Niños Desnutridos

Niño No.1	8495	19300	27795
Niño No.2	7785	18120	25905
TOTAL	16280	37420	53700

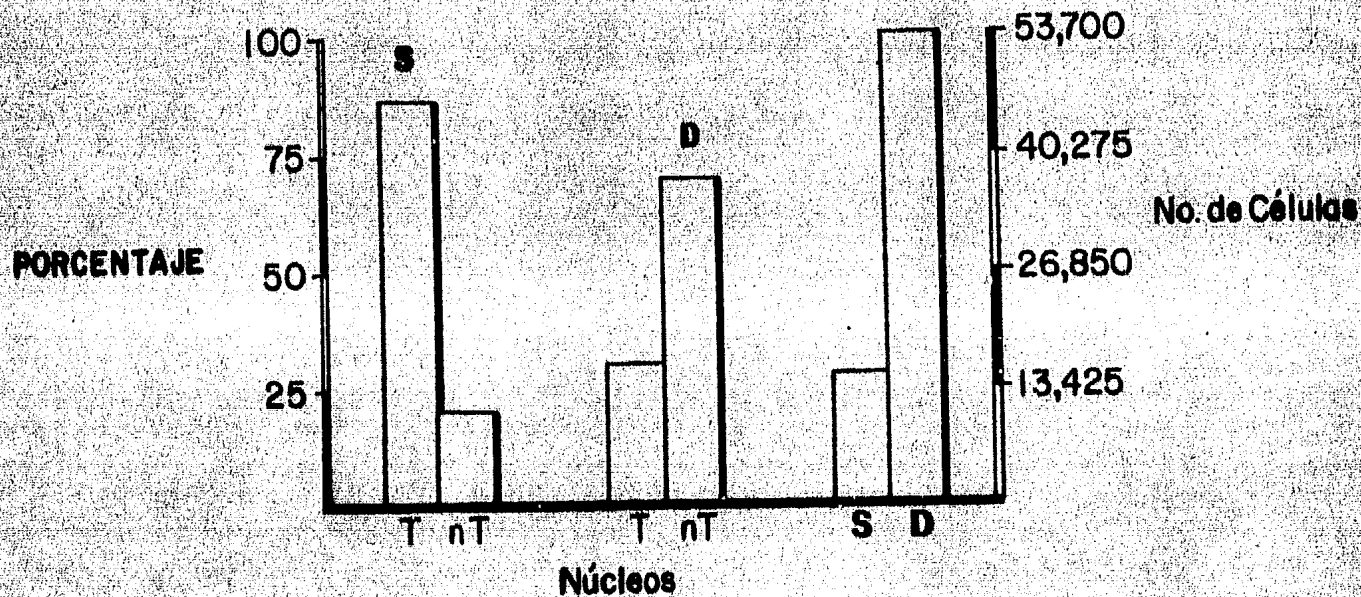
$t=2.64, gl=1,2; p<0.025$

T= Transformados  
NoT= No Transformados



GRAFICA II

PROPORCION DE NUCLEOS TRANSFORMADOS Y NUCLEOS NO TRANSFORMADOS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE NIÑOS EUTROFICOS Y DESNUTRIDOS.



T = TRANSFORMADOS  
nT = NO TRANSFORMADOS

S = SANOS  
D = DESNUTRIDOS

**IX. BIBLIOGRAFIA.**

1. Cravioto, J., y Arrieta, R.: Desnutrición Protéico-Calórica en el Niño. En: Nueva Guía para el Diagnóstico y Tratamiento del Paciente Pediátrico. Rodríguez, R. (Ed.) Hospital del Niño-DIF, cap. 14: 149-182, México, 1977.
2. Vassaux, C.: Algunas Consideraciones Sobre la Desnutrición Infantil. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de Licenciatura, 1962.
3. Cravioto, J., y DeLicardie, E.: Desnutrición en la Infancia y Nivel Intelectual. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. 28: 663-682, 1971.
4. Whitehead, R.: Biochemical Changes in Kwashiorkor and Marasmus, Calorie Deficiencies and Protein Deficiencies. Ed. J. &A. Churchill Ltd. 109-118, 1968.
5. Bjornesjo, K; Mellander, O. and Jagenburg, R.: The Distribution of Amino Acids Between Plasma and Red Cells in Protein Malnutrition. Calorie Deficiencies and Protein Deficiencies. Ed. J. &A. Churchill Ltd. London: 135-144, 1968.
6. Monckeberg, F.: Adaptation to Calorie and Protein Restriction in Infants. Calorie Deficiencies and Protein Deficiencies. Ed. J. &A. Churchill Ltd. London: 91-108, 1968.

7. Hansen, J.: Features and Treatment of Kwashiorkor - at the Cape. Calorie Deficiencies and Protein Deficiencies. Ed. J. & A. Churchill Ltd. London: 33-48, 1968.
8. Pineda, O.: Metabolic Adaptation to Nutritional Stress. Calorie Deficiencies and Protein - Deficiencies. Ed. J. & A. Churchill Ltd. - London: 75-89, 1968.
9. Waterlow, J.: The Adaptation of Protein Metabolism - to Low Protein Intakes. Calorie Deficiencies and Protein Deficiencies. Ed. J. & A. Churchill Ltd. London: 61-73, 1968.
10. Durbin, P.; Heard, C. and Platt, B.: Glycogen and - Glucose 6 Phosphatase in the Liver of Normal and Protein-Deficient Pigs. Proc. Nutr. Soc. 19: XXXV. 1960.
11. Gopalan, C.: Kwashiorkor and Marasmus: Evolution and Distinguishing Features. Calorie Deficiencies and Protein Deficiencies. Ed. J. & A. Churchill Ltd. London: 49-58, 1968.
12. Cravioto, J.: Appraisal of the Effect of Nutrition on Biochemical Maturation. Am. J. of Clin. Nut. 11: 484-492, 1962.
13. Cravioto, J. y Urbina, C.: Intento de Explicación de la Elevada Retención Nitrogenada Observada en la Desnutrición y Durante su Recuperación. Ensayos Bioquímicos de la Sala de Nutrición del Hospital Infantil de México: 331-336, 1969.

14. Cheek, D.; Graystone, J. y Read, M.: Cellular Growth, Nutrition and Development.  
Pediatrics 45: (2): 315-334, 1970.
15. Mitchison, J. M.: The Biology of the Cell Cycle.  
Cambridge University Press Cambridge, 1971.
16. Howard, D. y Pelc, S.: Synthesis of Deoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and its Relation to Chromosome Breakage.  
Heredity, London (Suppl) 6: 261, 1953.
17. Pardee, A.; Dubrow, R.; Hamlin, J. y Kletzien, F.: Animal Cell Cycle.  
Ann. Rev. Biochem. 47: 715-720, 1978.
18. Deo, M.; Bijlaniv y Ramalingaswami, V.: Nutrition and Cellular Growth Differentiation.  
Raven Press New York: 1, 1975.
19. Mathur, M. y Deo, M.: Kinetics of Proliferation and Differentiation of the Hair Follicle and Epidermis in Neonatally Undernourished Rats.  
Am. J. Pathol.
20. Deo, M.; Mathur, M. y Ramalingaswami, V.: Cell Generation in Protein Deficiencie.  
Nature, 216: 4, 1976.
21. Deo, M. y Ramalingaswami, V.: Reaction of the Small Intestine to Induce Protein Malnutrition in Rhesus Monkeys- A Study of Cell Population Kinetics in the Jejunum.  
Gastroenterol, 49: 150-157, 1965.

22. Gaben-Cogneville, A.M; Jahchan, T. y Swierczewski, E.: Alteration, by Early Underfeeding of Cellular Multiplication and Differentiation in the Inguinal Fat Pads of Rats. *J. Nutr.* 111: 2098-2105, 1981.
23. Winick, M. y Noble, A.: Cellular Response in Rats During Malnutrition at Various Ages. *J. Nutr.* 89: 300-306, 1966.
24. Winick, M. y Noble, A.; Quantitative Changes in Ribonucleic Acids and Protein During Normal Growth of Rat Placenta. *Nature*, 212: 34, 1966.
25. Ortíz, M.R.: Duración del Ciclo Celular en Ratas - Normales y Desnutridas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis Profesional, 1980.
26. Armendares, S; Salamanca, F. y Frenk, S.: Chromosomal Abnormalities in Severe Protein Calorie Malnutrition. *Nature* 232: 271-273, 1971.
27. Betancourt, M.: Aberraciones Cromosómicas en Desnutrición Calórico-Protéica Severa. Facultad de Ciencias, Div. Estudios Sup. Universidad Nacional - Autónoma de México, Tesis Doctoral, 1974.



28. Murthy, B.; Bhaskaram, P. y Srikantia, S.: Sister Chromatid Exchanges in Protein-Energy Malnutrition.  
Hum. Genet. 55: 405-406, 1980.
29. Chandra, R.K.: Cell-Mediated Immunity un Nutritional Imbalance Fed. Proceedings, 39: 3088-3092, - 1980.
30. Stiehm, E.R.: Humoral Immunity in Malnutrition, Fed. Proceedings 39: 3093-3097, 1980.
31. Chandra, R.K.: T and B Lymphocyte Subpopulation and Leukocyte Terminal Deoxynucleotidyl Transferase in Malnutrition.  
Acta Paediat. Scand. 68: 841-845, 1979.
32. Chandra, R.K.: Inmunología de los Trastornos Nutricionales.  
Edit. El Manual Moderno S.A., 18-60, México, 1980.
33. Jose, D.G; Welch, J.S. y Doherty, R.L.: Humoral and Cellular Immune Response to Streptococci Influenza and Other Antigens in Australian Aboriginal School Children.  
Aust. Paediatr. J. 6: 192-202, 1970.
34. Good, R.A.; West, A y Fernández, G.: Nutrition Modulation of Immune Response.  
Fed. Proceedings 39: 3098-3104, 1980.

35. Fernandez, G. y Yunis, E.J.: Suppression of Adenocarcinoma by the Immunological Consequences of Calorie Restriction. *Nature* 263: 504-504, 1976.
36. Arakaki, D. y Sparkes, R.: Microtechnic for Culturing Leukocytes from Whole Blood. *Cytogenetics* 2: 57, 1963.
37. Moorhead, P.S.; Nowell, P.D.; Mellman, W.J.; Battips, D.M. y Hungerford, P.S.: Chromosome Preparations of Leukocytes Cultures from Peripheral Blood. *Exp. Cell Res.* 20: 613, 1960.
38. Schneider, W.C.: Phosphorus of Deoxypentose Nucleic and Pentose Nucleic Acids. *J. Biol. Chem.* 161: 293, 1945.
39. Burton, K.: A Study of Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid. *Biochem. J.* 62: 315, 1956.
40. Gilles, K. M. y Myers, A.: An Improved Diphenylamine Method for the Estimation of Deoxyribonucleic Acid. *Nature* 206: 4979, 1965.
41. Flotino, M.; Merson, E.J. y Allen, F.H.: Micromethod for Rapid Separation of Lymphocytes from Peripheral Blood. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1: 31, 1971.

42. Kreyszig, B.: *Introducción a la Estadística Matemática*.  
Ed. Limusa-Wiley, México, 1976.
43. Hope, K.: *Manual Práctico de Estadística Avanzada*.  
Ed. F. Trillas S.A., México, 1970.
44. Medina Llamas, P.: *Cuantificación del Acido Desoxirribonucleico en Linfocitos Humanos Cultivados in vitro*.  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.  
Tesis Profesional, 1979.
45. Héresi, G. y Chandra, R.K.: *Effects of Severe Calorie Restriction on Thymic Factor Activity and Lymphocyte Stimulation Response in Rats*.  
*J. Nutr.* 110: 1888-1892, 1980.
46. Chandra, R.K.: *Reduced Secretary Antibody Response to Live Attenuated Measles and Poliovirus Vaccines in Malnourished Children*. *Brit. Med.J.*
47. Mc. Murray, D.N.; Loomis, S.A.; Casazza, L.J.; Rey, H. y Miranda, R.: *Development of Impaired Cell-Mediated Immunity in Mild and-Moderate Malnutrition*.  
*Am. J. Clin. Nutr.* 34: 68-77, 1981.
48. Jackson, T.M. y Zaman Shashiman, N.: *The "in vitro" Effect of the Thymic Factor Thymopoietin on a Subpopulation of Lymphocytes from Severely Malnourished Children*.  
*Clin. Exp. Immunol.* 39: 717-721, 1980.

49. Jose, D.G., Stutman, O. y Good, R.A.: Long Term -  
Effects on Immune Function of Early Nutritional  
Deprivation.  
Nature 241: 57-58, 1973.