



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

11261
4
Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DE UNA POBLACION DE CELULAS MONONUCLEARES
CON RECEPTOR FcY + EN NIÑOS CON DESNUTRICION PROTEICO-CALORICA (DPC).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS,
AREA DE INMUNOLOGIA

P R E S E N T A :

Rosalía Gómez Corvera

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	4
LISTA DE GRAFICAS	7
I.- RESUMEN	8
II.- INTRODUCCION	12
ASPECTOS INMUNOLOGICOS NORMALES	13
ASPECTOS INMUNOLOGICOS EN NIÑOS CON DPC.	24
Respuesta inmune humoral	24
Inmunoglobulinas séricas	24
Síntesis de anticuerpos	25
Inmunoglobulinas de secreción externa ..	27
El sistema del complemento.....	28
Función de los leucocitos polimorfonucleares y monocitos	29
La respuesta inmune mediada por células.	32
Antecedentes directos al problema planteado	35
Tabla 1. Defectos inmunológicos en DPC .	38
III.- OBJETIVOS	39
IV.- MATERIALES Y METODOS	40
Material biológico	40
Preparación de membranas de eritrocito de pollo para la inmunización del conejo.	40
Protocolo de inmunización para la obtención de anticuerpos contra eritrocitos de pollo	41
Prueba de hemólisis	41
Prueba de hemaglutinación	42
Precipitación con sulfato de amonio	42

Preparación de la DEAE-celulosa	43
Cuantificación de células mononucleares con RFc γ^+	43
Reactividad linfoblástica a PHA	44
Separación de células mononucleares RFc γ^+ para el cultivo de las células mononucleares RFc γ^+ y RFc γ^- ..	45
Reactividad linfoblástica a PHA de células mononucleares RFc γ^+ que llevan diferentes proporciones de células mononucleares RFc γ^-	46
Esquemas de la secuencia de la metodología	48
V.- RESULTADOS	50
Determinación de anticuerpos anti-eritrocitos de pollo pruebas de hemaglutinación y de hemólisis	50
Viabilidad de células mononucleares	50
Determinación del número de células mononucleares para la estandarización del método de formación de rosetas	50
Determinación del número de células mononucleares RFc γ^+ en los dos grupos estudiados	51
Reactividad linfoblástica a PHA de las células de sangre periférica de niños desnutridos y sanos	51
Reactividad linfoblástica a PHA en cultivos de células mononucleares con RFc γ^+ que llevan diferentes proporciones de células mononucleares RFc γ^-	52
VI.- DISCUSION	59
VII.- CONCLUSIONES	64
VIII.- BIBLIOGRAFIA	65

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1.- Viabilidad de células mononucleares de niños desnutridos y niños sanos	53
Gráfica 2.- Número de células mononucleares formadoras de rosetas	54
Gráfica 3.- Porciento de células mononucleares RFc γ^+ de niños desnutridos y niños sanos	55
Gráfica 4.- Células mononucleares RFc γ^+ por mm^3 de niños desnutridos y niños sanos	56
Gráfica 5.- Reactividad linfoblástica de células mononucleares a PHA de niños desnutridos y niños sanos	57
Gráfica 6.- Reactividad linfoblástica a PHA de células mononucleares RFc γ^+ con diferentes concentraciones de células mononucleares RFc γ^-	58

I.- RESUMEN.

Los niños con desnutrición proteicoenergética (DPE), presentan disminución del número de células mononucleares que forman rosetas E con eritrocitos de carnero mediado por la molécula CD2, también existe "in vitro" depresión de la reactividad linfoblástica a los mitógenos como fitohemaglutinina y fitolaca. Así mismo se ha reportado que estos niños presentan atrofia del timo, los ganglios linfáticos periféricos, las amígdalas y el bazo, en coincidencia con una marcada susceptibilidad a las infecciones que comúnmente son controladas por la respuesta inmune celular.

Los receptores para la porción Fc de IgG(RFc γ), presentan un papel central en la defensa inmune, participando en la estimulación y liberación de mediadores de la inflamación, en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos de las células NK, y en la eliminación de complejos inmunes por las células fagocíticas.

Se ha descrito que el número de receptores para Fc se encuentra incrementado en células de ratones deficientes en zinc; sugiriendo que los defectos en el sistema inmune se pueden localizar en parte en la disfunción de las células T ayudadoras. Por lo anterior nos interesó el estudio de las células mononucleares con receptores Fc γ^+ en niños con DPE y niños sanos y la reactividad linfoblástica de células mononucleares a PHA. También el efecto que se obtiene variando la densidad de las poblaciones de las células mononucleares con RFc γ^+ y RFc γ^- sobre la reactividad linfoblástica a PHA en

niños sanos.

Se observó que el número de células mononucleares $\text{RFc}\gamma^+$, cuantificado por el método de formación de rosetas EA, es mayor en niños con DPC comparado con los niños sanos ($p < 0.005$). Las células mononucleares de los niños con DPC no presentaron reactividad linfoblástica a PHA comparados con los cultivos de los niños sanos. En los cultivos con poblaciones enriquecidas de células $\text{RFc}\gamma^-$ no se observó reactividad linfoblástica a PHA en la proporción 1:1, sin embargo en las proporciones de 1:2, 1:4 y 1:9 sí se presentó.

Debido a la importancia biológica de los receptores $\text{Fc}\gamma$, al actuar como elementos de reconocimiento y modulación de la respuesta inmune, es posible que los cambios inmunológicos que se presentan en este padecimiento, estén relacionados con la alteración en número de las células mononucleares con receptores $\text{Fc}\gamma$ en niños con DPC.

SUMMARY.

Children with protein-caloric malnutrition (PCM) show a numerical diminution of cell rosette forming with sheep erythrocytes by means of molecule CD2, decrease has been found concerning the lymphoblastic reactivity capacity "in vitro" toward phytohemagglutinin (PHA) and pokeweed (PWM). It has also been reported children with a poor food intake that have atrophy in thymus, peripheral lymph nodes, spleen and tonsils associated with a high susceptibility for common infections usually controlled by cellular immune response.

The receptors for the Fc portion of IgG (RfC γ) are very important in immune response, playing a role in the stimulus and liberation of inflammatory mediators, in the cytotoxicity which depends from NK cells, and in the elimination of immune complex by the phagocytic cells.

It has been described that the number of cells bearing Fc receptors can be increased in murine cells with zinc deficiency suggesting that the defect in the immune system may be localized at the level of T helper cell functions.

This is the reason because interested we became to study mononuclear cells with receptor RfC γ^+ from children with PCM and healthy ones and lymphoblastic reactivity to PHA. This way the effect that is obtained changing the density of cells groups of cell-mononuclear RfC γ^+ and cell-mononuclear RfC γ^- in the lymphoblastic reactivity to PHA in cells from healthy children. It has been observed that the number RfC γ^+ cell-mononuclear which is determined by rosette formation, is

($p < 0.005$). Children with PCM did not show lymphoblastic activity to the PHA in reference with the healthy ones. In proliferation studies utilizing PHA in group rich in $\text{RFc}\gamma^-$ mononuclear cell the healthy children in the ration 1:1 it was not observed, in the proportions 1:2, 1:4 and 1:9 there was reactivity.

Due to the biologyc importance of Fc receptors playing a role as recognition and modulation element in the immune response. We hypothesize that some of the immunologic changes seen in PCM could be related with the number of mononuclear cells with $\text{Fc}\gamma^+$ receptors in children with PCM.

II.- INTRODUCCION

La desnutrición proteicocalórica (DPC) grado III es la causa más frecuente de inmunodeficiencia (1); este grave problema de salud pública no se encuentra limitado a países en desarrollo sino que, también, existe en las regiones industrializadas. Un cálculo de la Organización Mundial de la Salud indica que 100 millones de niños, menores de cinco años de edad, sufren desnutrición, de grado moderado a grave que se manifiesta como Kwashiorkor, que predominantemente es una deficiencia de proteínas, coincide con adecuada administración de calorías y Marasmo deficiencia de calorías totales y otros nutrimentos. En la desnutrición proteicocalórica (DPC), se presentan una combinación de Kwashiorkor y Marasmo (2). Desde hace algunas décadas, se ha reconocido que la desnutrición se asocia con una elevada susceptibilidad a ciertas infecciones (3); principalmente de organismos patógenos que incluyen: Staphylococcus, Neumococos Streptococcus, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Klebsiella, Bordetella pertussis y Mycobacterium tuberculosis, virus del Sarampión, Herpes Simple y Varicela, hongos Candida y Aspergillus, parásitos Ascaris y Plasmodium que contribuyen a una carga adicional, pérdida gastrointestinal de nutrimentos y malabsorción de proteínas (4). Estos mismos organismos atacan a pacientes con inmunodeficiencia.

En los últimos años muchos investigadores han dirigido su atención en la relación entre desnutrición y función inmune, tanto en estudios de campo como de laboratorio. La inmunología,

aunada a los métodos de diagnóstico nutricional, ha aclarado la influencia de la desnutrición sobre los órganos linfoides, el número y la función de las células que participan en la respuesta inmune, la inmunidad humoral, el sistema del complemento, la fagocitosis y especialmente, la inmunidad celular en pacientes desnutridos.

La desnutrición es crítica en los primeros meses de desarrollo y ejerce efectos más severos sobre la inmunidad. En los niños con subdesarrollo durante la gestación persiste un deterioro de la inmunidad mediada por células, con incremento en la frecuencia de infecciones que incluye la septicemia (6).

ASPECTOS INMUNOLOGICOS NORMALES.

Los linfocitos que se diferencian en la médula ósea y el timo son denominados células B y células T, respectivamente; tienen morfología similar, pero difieren en muchas funciones. Las células B son células formadoras de anticuerpos y las células T actúan como células efectoras de cooperación, citotóxicas o supresoras. Las subpoblaciones de las células T pueden ser distinguidas, por sus marcadores expresados en la superficie celular y por su respuesta a mitógenos. La molécula CD2, tiene la capacidad de unirse a eritrocitos de carnero, sin embargo el marcador más importante en las células T, es el receptor para el antígeno (TCR), esta molécula se expresa en células T maduras, está formado por un heterodímero de dos cadenas polipeptídicas transmembranales unidas por enlaces disulfuro (α y β); son denominados TCR2 y aproximadamente 95% de las células T lo expresan. Estos

polipéptidos son codificados por genes semejantes a los de las inmunoglobulinas (V-D-J) (7).

Las células con moléculas TCR que presentan cadenas γ y δ se encuentran en porcentaje pequeño y se les denomina TCR1. Los TCR1 y TCR2 tienen una estructura similar y se encuentran asociados con la subunidad CD3, constituida por cinco cadenas polipeptídicas γ , δ , ϵ , ξ y p21. El complejo CD3 media señales de traducción cuando las células son activadas con antígenos que se unen al TCR(8). Las células que presentan TCR-2 pueden ser subdivididas en dos distintas subpoblaciones $CD4^+$ inductoras o cooperadoras (Th) y $CD8^+$ T citotóxicas (9).

Las células T $CD4^+$ pueden ser divididas funcionalmente en: células que influyen positivamente en la respuesta inmune de células T y B, presentando funciones de cooperación, y células inductoras de funciones citotóxicas en células $CD8^+$ (10).

Recientemente los estudios "in vitro" de clones de células $CD4^+$ en ratones y humanos, han definido dos poblaciones de células TH1 y TH2 basadas en la producción de diferentes linfocinas. Todas las células TH secretan IL-3, pero las células TH 1 se especializan en la secreción de IL-2 e IFN como respuesta a estimulación con antígenos o mitógenos; en el caso de células TH 2 producen IL-4 e IL-5 (11).

Las células $CD8^+$ reconocen antígenos con moléculas clase I del MHC y producen IL-2, otras no reconocen antígenos en asociación con moléculas de MHC o producen IL-2 (12). La población $CD4^- CD8^-$ también denominada doble negativo (DN), se encuentra en la mucosas y epitelios, su papel funcional no es

claro (13).

Los linfocitos B presentan inmunoglobulinas en la superficie de la membrana que actúan como receptores antígeno específicos. La mayoría expresan IgM e IgD, y pocas células expresan IgG, IgA e IgE. Las células B tienen antígenos clase II, que son moléculas importantes en la comunicación con las células T. También tienen receptores para complemento C3b (CR1=CD35) y C3d (CR2=CD21) además de receptores Fc (Fcγ RII=CDW32) para IgG (14).

En la respuesta de células T a antígenos, el ligando para el TCR está presente en la superficie junto con las moléculas codificadas por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).

Los genes clase I y II codifican moléculas involucradas en el reconocimiento y cooperación de la respuesta inmune y los genes clase III, codifican algunos de los componentes del complemento (15).

Los productos de los genes clase I están constituidos por una cadena pesada de glicoproteína transmembranal codificada por los genes HLA-A, B o C; H-2 (K, D o L) en ratón asociada con un polipéptido la β_2 -microglobulina. Las regiones HLA-B presentan homología con las regiones K y D. Estas moléculas participan en el reconocimiento de receptores antígeno específicos, sirviendo como elementos de restricción en el reconocimiento de células T citotóxicas (CD8⁺) (16).

En el humano las moléculas clase II son codificadas por los genes HLA-DP, DQ, DR; los cuales presentan homología con la región I del ratón, son denominados antígenos Ir (17). Las

moléculas clase II se expresan en células B, macrófagos, algunas células epiteliales y células T activadas. Estas moléculas son heterodiméricas, formadas por dos cadenas α y β , que se encuentran unidas por interacciones no covalentes, los dominios distales $\alpha 1, \beta 1$ les confiere el polimorfismo (18). En la respuesta de antígenos timodependientes se requiere de células T y B. Las células T reconocen fragmentos de antígeno asociados con moléculas de MHC de células presentadoras de antígenos (APCs) restringidas por moléculas clase II, las cuales regulan el desarrollo de la respuesta inmune (19). Las células APCs pueden degradar el antígeno antes de expresarlo conjuntamente con las moléculas del MHC clase I (CD8) o clase II (CD4). El antígeno interactúa con la membrana plasmática formando una vacuola que se dirige hacia los lisosomas, donde el antígeno es hidrólizado por proteasas lisosomales, el resultado de la digestión parcial, es la formación de péptidos pequeños que son inmunogénicos, de tamaño de 8-24 aminoácidos (20).

El procesamiento antigénico, es llevado a cabo por las células APCs de las cuales la más conocida es el macrófago: se sabe que el macrófago en particular produce moléculas involucradas en la activación de linfocitos. La mejor caracterizada es la interleucina-1 (IL-1) una de sus acciones es inducir la producción de otras citocinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF) de macrófagos y endotelios, IL-6 de fibroblastos, factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) de células T, etc (21). Las células T y las B tienen receptores para IL-1, lo que promueve la

diferenciación de las células T e incrementa "in vitro" la proliferación, diferenciación y producción de anticuerpos por las células B (22). También induce la expresión del receptor para IL-2 que actúa en forma sinérgica con la IL-1.

Los eventos involucrados en la activación de las células T, comienzan con la interacción y presentación de antígenos con el TCR, la superficie de las células T es modificada, expresando el receptor para IL-2 y se incrementa el número de receptores para IL-1, moléculas clase II del MHC y el receptor de transferrina (TfR) (23). Otras moléculas de la superficie celular que participan en la adhesión y activación de las células T incluyen a los marcadores (antígenos) asociados con la función de los linfocitos como: (LFA-1), CD2 (T11, Leu-5, LFA-2), CD4 (T4, Leu-3, en humano, L3T4 en ratón) y CD8 (T8, Leu-2 en humano y Lyt-2 en ratón). En el caso de la molécula LFA-3 que se expresa en las "células blanco" y en células APCs, participan, en la adhesión celular, en la cooperación, activación y en algunas interacciones citotóxicas; esta molécula es el ligando para CD2 el cual sirve para incrementar el reconocimiento del antígeno-específico (24).

El receptor para IL-2 (RIL-2), está constituido por dos cadenas polipeptídicas α y β , después de la activación las cadenas α varían en número aumentando de 500 a aproximadamente a 5000 y las cadenas β se incrementan a 50 000 en cada célula T activada. El RIL-2 de alta afinidad ($K_d=10$ pm) es el heterodímero α y β , es efectivo en el crecimiento de las células T; el receptor de baja afinidad ($K_d=10$ nM) lo constituye

la cadena β sola, no activa normalmente a las células y puede estar involucrado en la activación solo en presencia de altas concentraciones de IL-2. Recientemente se ha identificado un péptido de 55 Kd que reacciona con el anticuerpo monoclonal anti-Tac y uno de 75 Kd que es no-Tac, estos péptidos interactúan con diferentes regiones de la molécula de IL-2 y cooperan para formar el receptor de alta afinidad (25).

La expresión del RIL-2 también puede ser activado por la acción de mitógenos. Además del receptor de IL-2 asociado a la membrana, este existe en una forma soluble y su liberación parece ser una consecuencia de la activación de varios tipos celulares, especialmente de las células T (26). La activación via receptor de células T, es asociado a un incremento en el calcio intracelular, a través se la activación del ciclo del fosfoinositol, resultando entre otras cosas en la translocación de la proteína-cinasa C (PCC) del citosol a la membrana.

La unión del TCR a su ligando lleva a la activación de la fosfolipasa C que cataliza la hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2) para generar diacilglicerol (DG) y 1,4,5 trifosfato (IP_3). El IP_3 causa liberación de Ca^{2+} almacenado. El aumento del Ca^{2+} intracelular resultante modula muchas funciones celulares incluso la actividad de la proteína cinasa C (27). Entre estas funciones se incluyen la la transcripción de genes que controlan la progresión de G0-G1 a la fase S del ciclo celular, receptores de IL-2 en la membrana, transferrina e insulina (28).

La activación de las células B con antígenos timo dependientes, requiere del procesamiento antigénico por APCs,

las que presentan los epitopes a las células Th o células B. Las células Th reconocen los epitopes, lo que genera la estimulación de las clonas de las células B, que se diferencian a células formadoras de anticuerpos. En este proceso dos señales son importantes: 1) la interacción del antígeno con el receptor de inmunoglobulinas de las células B y 2) factores provenientes de las células Th, que participan en el crecimiento y diferenciación de las células B, estos factores se han dividido en: Factores para la activación de las células B en reposo (IL-1, IL-4, IL-5); factores de crecimiento de las células B activadas (IL-2, IL-4, IL-5) y factores de diferenciación final de las células B activadas en células secretoras de inmunoglobulinas (IL-2, IL-5, IL-6) (29).

Las células T citotóxicas (CTL), participan en la eliminación de células infectadas con virus, la mayoría presentan el fenotipo CD8⁺ y reconocen antígenos en asociación con moléculas clase I del MHC. En el caso de (CTL), que reconocen antígenos junto con moléculas clase I y clase II del MHC, presentan diferencias, en los requerimientos de presentación de antígenos, para la sensibilización de células blanco y en el reconocimiento de las CTL restringidas por moléculas clase I reconocen formas nativas del antígeno, a diferencia de CTL restringidas por moléculas clase II, que presentan un mecanismo distinto pues reconocen epitopes de antígenos procesados (30).

Generalmente, el receptor de células T puede reconocer antígenos y determinantes polimórficos del MHC, sin embargo las

moléculas CD8 y CD4, han, sido implicadas en el reconocimiento de epítopes, en células blanco o células accesorias (31). La molécula CD8 es un polipeptido de 32-34 Kd, que existe como un homodímero, en células T periféricas y como heterodímero, en timocitos inmaduros, representado por un complejo formado por CD8 y CD1, que permanecen unidas por interacciones semejantes a los puentes disulfuro (32). El antígeno CD1, representa una familia de proteínas que tienen homología con antígenos clase I del MHC β_2 -microglobulina. A su vez la molécula CD8, presenta afinidad, a través de uniones semejantes a puentes disulfuro, a las cadenas pesadas de las moléculas clase I de el MHC, en todos los estados de diferenciación de las células T; este proceso es importante en el reconocimiento, activación y regulación de las células CD8⁺ (33).

Algunos otros receptores pueden participar en la unión de las células citotóxicas con las células blanco, como eventos que median la citotóxicidad, como son la molécula CD2 (LFA-2) además del receptor CD16 (Fc γ RIII), que se unen a sus respectivos ligandos en la célula blanco (34).

Existe evidencia de que los anticuerpos anti-idiotípicos son producidos durante la respuesta inmune natural, aquellos anticuerpos contra el idiotipo de las células B pueden interactuar con el receptor de las células T y específicamente activar o inhibir las funciones de las células T, su efecto es mediado por células Ts o células Th más que por la acción de las células B; además las clonas idiotípicas de las células T han sido aisladas y pueden ser estimuladas por anti-idiotipos para que proliferen y liberen IL-2 "in vitro" (35). Las

interacciones idiotípicas pueden modular la respuesta inmune y ser importantes en la fase inicial de la respuesta inmune en la cual hay contacto y reconocimiento del antígeno.

Las células T supresoras (Ts), juegan un papel esencial en el control contra antígenos extraños y la inducción de tolerancia a antígenos propios, sin embargo el mecanismo por el cual las células Ts son activadas es poco claro, la naturaleza de la interacción ligando-receptor que media la activación de las células Ts aun no se conoce (36). Sin embargo, un sistema supresor en ratones postula una interacción directa entre células Ts y antígenos, de manera análoga a lo que se ha descrito para las células B. Recientemente se ha descrito en humanos un tipo de células Ts las cuales son activadas por una interacción directa con el receptor del antígeno, que es inducido con el antígeno primario (37).

También se ha observado que la IL-2 producida en cultivos de células CD4⁺ es capaz de propagar clones CD8⁺ (Ts), las cuales inhiben al receptor específico para antígenos, y que son restringidos por moléculas clase I del MHC; el mecanismo de supresión no se ha definido, pero su efecto inhibitorio es por un mecanismo no citolítico (38). Se ha mostrado que la activación inducida por mitógenos, de las líneas células Th/inductora (Leu-3⁺, OKT4⁺), estimulan células nuevas con actividad citotóxica (Leu-2⁺, OKT8⁺) a proliferar y que son capaces de inhibir la respuesta de células T a una gran variedad de estímulos, el mecanismo de activación no se ha explicado, pero se cree que la interacción célula T-T parece

ser importante (39).

Los factores antígeno-específicos y aquellos no-específicos presentan diferentes mecanismos de acción y de limitaciones; en el caso de factores no-específicos como las linfocinas, estas pueden interactuar con las células que portan su correspondiente receptor, y además no seleccionan sus células blanco con base en su especificidad antigénica; en cambio los factores antígeno-específicos presentan una actividad biológica dependiente de una interacción específica con un determinante antigénico particular y pueden mostrar también especificidad de clase, sin embargo su producción es limitada en comparación con las linfocinas; la participación de ambos factores favorece una interacción integral entre diferentes células de la respuesta inmune. Algunas veces los factores supresores antígeno específico, pueden actuar directamente en clones de células T o B a través de su receptor específico o por medio de células presentadoras de antígeno, (40). Los factores antígeno-específicos de células Th y factores supresores, presentan similitud en su estructura, pesos moleculares, uniones disulfuro y en su mecanismo de acción.

Las células NK reconocen e interactúan con diversas células normales, en las que se incluyen las pre-tímicas, células de médula ósea y células linfoblásticas B. Se ha sugerido una importante función inmunorreguladora para las células NK en la diferenciación y posiblemente en el proceso proliferativo, no sólo de células linfoides, sino de otras células hematopoyéticas progenitoras (41). Existe una relación

entre las células NK y la regulación de las células B, se ha observado que las células NK se localizan en el compartimento germinal de las células B de los nódulos linfáticos, y pueden lizar ciertas poblaciones de células B (B-LCL) al ser activadas con mitógenos y LPS. Además, inhiben la producción de anticuerpos en poblaciones de células B estimuladas in vivo; esta capacidad inhibitoria ha sido demostrada en poblaciones de células NK efectoras, heterogeneas, purificadas y clonadas (42).

La sensibilidad de la citolisis de las células B puede ser dependiente del estado de diferenciación, el fenotipo susceptible a las células NK se presenta en el último estadio de desarrollo de las células B y constituyen el 10% del total de células B periféricas (43).

Se ha aislado de la orina de mujeres embarazadas una proteína de 85 Kd denominada "Uromodulina", que suprime la proliferación antígeno específica "in vitro" en concentraciones menores de 30 pm, pero no afecta la proliferación de células B, que fueron estimuladas con PWM; también inhibe la citotoxicidad de monocitos. Su mecanismo de acción es interferir con la interacción inicial entre IL-1 y su receptor (RIL-1). Se sugiere que el origen de la "Uromodulina" sea el macrófago y su papel principal sea el de una molécula inmunorreguladora (44,45).

Se ha reportado que un neuropeptido de 11 a.a. denominado sustancia P (SP), es sintetizado por el macrófago e induce desgranulación de células cebadas, promueve la quimiotaxis de

neutrófilos, y liberación de enzimas de PMN, aumenta la fagocitosis de macrófagos y de PMN, estimula la proliferación de células T (46).

El factor de crecimiento de transformación (TGF) posee la propiedad de incrementar o inhibir la respuesta inmune, dependiendo del tipo de células y la presencia de otros factores de crecimiento. Las células T activadas en cultivo, secretan TGF- β y expresan receptores para TGF- β , que luego regulan la activación de las células T. El TGF- β exógeno inhibe la proliferación de células T, dependiente de IL-2, RIL-2 y de transferrina (TfR) en las células T activadas con mitógenos. Se ha descrito que las células B tienen receptores para TGF- y que las células B activadas incrementan sustancialmente, el número de receptores TGF- β y que secreta cierta cantidad de este factor (47).

ASPECTOS INMUNOLOGICOS EN NIÑOS CON DPC.

A) Respuesta Inmune Humoral.

La caracterización de esta inmunidad se realiza a través de la cuantificación de linfocitos B en sangre periférica, la determinación cuantitativa de inmunoglobulinas séricas totales, la identificación y cuantificación de anticuerpos específicos así como de inmunoglobulinas de secreción externa.

En algunos estudios clínicos en pacientes desnutridos, se ha encontrado aumentada la población de linfocitos B circulantes, considerando este fenómeno secundario a las infecciones repetidas.

Inmunoglobulinas Séricas.

Las inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas presentes en el suero y otras secreciones, están constituidas por cinco clases denominadas IgM, IgG, IgA, IgE, e IgD, difieren una de otra por su tamaño, carga, composición de aminoácidos, antigenicidad y contenido de carbohidratos. Cada molécula de IgG, IgD, IgE son bifuncional, la región Fab, tiene el sitio de unión a el antígeno en tanto que la región Fc interactúa con receptores de células y actúa como molécula efectora en el proceso fagocítico y en la activación del sistema del complemento.

Algunos autores han descrito que los niños con desnutrición proteocalórica (DPC), tienen concentraciones normales o aumentadas de inmunoglobulinas séricas (48,49). Otros reportan una elevada proporción de los niños desnutridos presentan en circulación niveles normales o elevados de IgA, IgM e IgG (50). La hipergammaglobulinemia que se presenta en algunos pacientes con DPC se ha interpretado como resultado de la exposición del sistema inmunológico a diversos agentes infecciosos localizados en la piel, el sistema digestivo y el respiratorio (51).

Sin embargo, también se ha observado en pacientes con DPC; con y sin infección concomitante, una disminución de la concentración sérica de IgG, IgA e IgM (52); esto puede reflejar una síntesis reducida, pérdida gastrointestinal de proteínas o ambas cosas. La elevada concentración sérica de IgE puede ser secundaria a una infección por parásitos, que con frecuencia se presentan en estos pacientes (53).

Si la desnutrición ocurre durante la etapa de gestación o

en la lactancia, los niveles de inmunoglobulinas en el suero pueden ser bajos y los niños requieren un periodo de protección hasta que se desarrollan concentraciones normales de inmunoglobulinas en el suero (54). También necesita de nutrición suplementaria, para restaurar la producción de anticuerpos especialmente antes de ser sometidos al programa de vacunación (55).

Síntesis de Anticuerpos Específicos.

Los datos disponibles acerca de la síntesis de anticuerpos para los antígenos del virus de la fiebre amarilla, influenza, vacuna tifóidica y toxoide diftérico en niños desnutridos, son controvertidos. Si bien predomina el concepto de que la producción es anormalmente baja (56), otros reportan que la síntesis de anticuerpos es adecuada para los antígenos del virus del sarampión, la poliomielitis y el toxoide tetánico (57). La interpretación de éstos datos es aún difícil por carecer de controles críticos, tales como la dosis del antígeno, la vía de administración, la gravedad de la desnutrición, la índole de los tratamientos instituidos, el estado de la función hepática, y sobre todo las infecciones asociadas, que por sí mismas son capaces de inhibir la síntesis de anticuerpos (58). Es posible que un mecanismo que contribuya a la disminución de la respuesta a ciertos antígenos sea la reducción en la afinidad de los anticuerpos, por fallas del procesamiento de antígenos por el macrófago. Esta disminución en la afinidad de anticuerpos en DPC puede estar relacionada con diferentes factores, en los que se incluyen: una inadecuada

disponibilidad de aminoácidos esenciales, para la síntesis de moléculas de anticuerpos en la región variable, o a una disfunción de las subpoblaciones responsables de la regulación de la síntesis y ensamble del sitio de combinación de las moléculas de inmunoglobulinas (59).

Inmunoglobulinas de Secreción Externa.

Se ha descrito escasa síntesis de IgA secretora específica contra los virus de la poliomielitis y el sarampión, en las secreciones salivales y nasofaríngeas de niños desnutridos (60,61). Al ser insuficiente la producción local de IgA, se facilita la colonización de la mucosa por gérmenes patógenos y se explica la elevada incidencia de septicemia en pacientes desnutridos, así como, el aumento de la frecuencia de anticuerpos séricos contra ciertos alimentos, debido en parte a la degradación defectuosa de éstos, propiciando su participación como antígenos (62). La depresión de la inmunidad en la mucosa digestiva, además de la atrofia de la mucosa intestinal, la reducción de la actividad enzimática y el deterioro del sistema retículo endotelial, contribuyen a incrementar la susceptibilidad del hospedero a infecciones por gérmenes gram-negativos (63). A este respecto, se ha encontrado, en niños con DPC, un estado de endotoxemia que se relaciona con trastornos de la permeabilidad gastrointestinal, gravedad de las infecciones y menor eficiencia de la inmunidad inducida por vacunas por vía oral (64).

El mecanismo de la respuesta inmune secretora puede involucrar la disminución de la síntesis de un constituyente

esencial de la molécula de IgA como por ejemplo el componente secretor, o una alteración de la población celular inmune de tejido linfóide asociada a intestino y la disminución de las células formadoras de anticuerpos IgA en la mucosa (65).

B) El Sistema del Complemento.

El sistema del complemento es una serie de componentes enzimáticos que constituye uno de los principales mecanismos efectores del proceso inflamatorio. Su activación provoca la lisis de la célula blanco, y genera la partición proteolítica de pequeños fragmentos, los cuales se difunden rápidamente en el medio circundante. Las células PMN y macrófagos tienen receptores específicos para algunos de estos fragmentos que intervienen en la quimiotaxis, opsonización y la activación de células. En el humano, en algunos casos, se ha asociado con la deficiencia de ciertos componentes del sistema del complemento, el incremento en la susceptibilidad a las infecciones bacterianas.

En ciertos niños desnutridos se ha observado reducción en la concentración sanguínea de algunos componentes del sistema del complemento, particularmente de C3; así mismo disminución de la capacidad de opsonizar de C3 y C4 (66,67). Existe una buena correlación entre la gravedad de la deficiencia nutricional, valorada con base en las características clínicas y los valores séricos de C3 y C9 además de la concentración de otros componentes séricos como albumina, colinesterasa y transferrina (68).

Los niveles de los inactivadores del C1q, C4 y C5, están

usualmente, dentro del límite normal. Observaciones recientes, sugieren una disminución en la actividad de la vía alterna de del complemento, y en particular de la concentración del factor B (69). Los componentes del complemento, en niños con Kwashiorkor, se encuentran más disminuidos que en el Marasmo nutricional. En la etapa de recuperación nutricional, se ha sugerido, que los componentes del complemento son más sensibles a la magnitud del aporte de proteínas que a la ingestión calórica. Diversos mecanismos intervienen en los cambios del sistema del complemento en la DPC, tanto la disminución de la síntesis protéica en hígado, como un catabolismo acelerado, desempeñan un papel importante (70). La depresión de los componentes del complemento, en niños con DPC, se asocia a una baja actividad hemolítica, posiblemente a causa de sustancias con actividad anticomplemento. A este respecto, es bien conocido que sustancias como la inulina, ciertos polisacáridos, endotoxinas y complejos inmunes pueden activar al sistema del complemento. Aproximadamente el 50 % de niños con DPC poseen endotoxinas circulantes, que desaparecen en la etapa de recuperación; parece ser que la escasa actividad del complemento, en niños desnutridos, no sólo se halla relacionada con la disminución de nutrimentos disponibles, sino también con el incremento el consumo del sistema del complemento por las infecciones (71).

C) Funciones de Leucocitos Polimorfonucleares y Monocitos.

La función de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y de los monocitos son importantes para la resistencia del

hospedero contra las infecciones causadas por bacterias y otros parásitos, además participan en la inflamación aguda y en la patogenia de padecimientos mediados por complejos inmune.

El papel principal de los PMN y monocitos contra las infecciones es la eliminación del agente infeccioso a través de la fagocitosis, proceso que se presenta con frecuencia asociado a la quimiotaxis, que es la atracción de las células fagocíticas al sitio de inflamación, como respuesta a fragmentos derivados de la activación del complemento, linfocinas y factores quimiotácticos diversos liberados por las bacterias (72). Después se lleva a cabo la unión y reconocimiento de ligandos (en el caso de parásitos componentes mas externos de superficie) por los receptores correspondientes. Posteriormente, la ingestión se realiza cuando la membrana citoplasmática rodea el parásito con la formación de una vacuola (fagosoma) en el citoplasma celular. La muerte de los parásitos se inicia con la fusión de los gránulos lisosomales al fagosoma, formandose un fagolisosoma, en donde se libera el contenido enzimático de los lisosomas provocando la muerte y digestión de los parásitos por dos mecanismos bien definidos uno dependiente y el otro independiente del oxígeno (73). Al investigar la función quimiotáctica mediante la ventana de Rebuk, en pacientes con Kwashiorkor,, se encontró que el número total de leucocitos movilizados hacia la lesión cutánea era normal y se observó una migración de macrófagos retardada y disminuida, en tanto que la de PMN está aumentada (74). Por otro lado se observó en los

niños desnutridos se encuentran normales, la actividad quimiotáctica "in vitro" de los PMN, la fagocitosis de partículas de látex, la reducción de nitroazul de tetrazolio por monocitos y la capacidad opsonica del suero. Sin embargo, la reducción de nitroazul de tetrazolio por los PMN presento disminución (75).

Los leucocitos PMN de niños con DPC, tienen defectos en la destrucción intracelular de S. aureus, E. coli y C. albicans (76). Los modelos experimentales en animales, con carencia calórica y deficiencia proteica, muestran una reducción de la capacidad bactericida de los fagocitos (77). Las principales vías metabólicas, asociadas a la función fagocítica de las células PMN, son la glucólisis y la vía del hexosamonofosato para la producción de ácido láctico, NADPH y los radicales reactivos de oxígeno (78). Los leucocitos de los niños con desnutrición avanzada, presentan una baja producción de lactato y actividad glicolítica reducida, con disminución de la piruvato cinasa (79). La hexocinasa, fructocinasa, piruvatocinasa, mieloperoxidasa y NADPH oxidasa, son normales en los leucocitos de pacientes desnutridos, en cambio, se han encontrado aumento de las actividades de las deshidrogenasas fumárica, isocitrica, málica y de las transaminasas (80).

La destrucción intracelular en los leucocitos PMN, se puede estudiar por la activación de la vía hexosamonofosfato, debido al aumento del consumo de oxígeno, la producción de quimiluminiscencia por radicales superóxidos, por la formación del peróxido de hidrógeno, y la halogenación de proteínas bacterianas la cual se mide "in vitro" por la incorporación de

131] a las células después de la fagocitosis (76). Como pruebas adicionales de destrucción intracelular se puede estudiar la degranulación de tiroxina y triyodotironina en los leucocitos PMN. En pacientes con Kwashiorkor prevalece la disminución de la función intracelular, la disminución de la yodinación y el aumento de la actividad metabólica de los leucocitos PMN. Sin embargo, otros investigadores han mencionado, que el defecto selectivo de la destrucción intracelular en pacientes desnutridos, no parece ser importante para el mecanismo de la resistencia a las infecciones (75).

D) La Respuesta Inmune Mediada por Células.

La maduración y diferenciación de los linfocitos T es estimulada por varios factores tímicos como: timopoyetina, ubiquinina, factor tímico sérico, timosina y el factor tímico humoral, (81,82). Se ha informado de un incremento en la desoxinucleotidil-transferasa (TdT) en leucocitos de los niños con DPC, esta enzima se localiza en las células que se encuentran en el timo, en la médula ósea y en las células linfoides de sangre periférica, y participa en la diferenciación funcional de estas células, en la generación de la diversidad del sitio de combinación de los anticuerpos y en la memoria inmunológica. El incremento de TdT en DPC sugiere una diferenciación incompleta de las células pre-tímicas (83).

La respuesta inmune mediada por células en niños con DPC está profundamente alterada, y una de las evidencias es la observación de la atrofia tímica con una disminución del peso de timo (84).

En el timo hay disminución de linfocitos pequeños y degeneración de los corpúsculos de Hassal (85); estas modificaciones son similares en los nódulos linfáticos periféricos, las amígdalas, y el bazo de niños con DPC.

La variación numérica de las diferentes poblaciones celulares, en sangre periférica, ha sido considerada como un indicador del grado de deterioro de la respuesta inmune en niños con DPC; estos niños presentan un número de linfocitos totales menor $2500/\text{mm}^3$ (86). El porcentaje de células que forman rosetas con eritrocitos de carnero mediado por la molécula CD2, como indicador del número de linfocitos T, se encuentra disminuido en DPC (87); además el número de células que no poseen marcadores de células B ni T (células nulas), se encuentra significativamente incrementado, este aumento puede estar directamente relacionado con el defecto en la producción de las hormonas tímicas (88).

En niños con DPC el porcentaje de células capaces de formar rosetas puede ser incrementado "in vitro" añadiendo factores biológicos derivados del timo (89). Esto sugiere que los productos biológicos obtenidos del timo, pueden ser empleados en el tratamiento de los niños con DPC, para mejorar parcialmente la inmunidad mediada por células (90).

Los parámetros funcionales de la inmunidad mediada por células han sido estudiados en individuos con DPC y la prueba "in vitro" más ampliamente empleada ha sido la transformación linfoblástica en respuesta a los estímulos con mitógenos, en la cual, se activa a los linfocitos en forma no específica para

que proliferen. La respuesta a Con A y PHA que activan a los linfocitos T esta disminuida; pero la administración de un suplemento nutricional eleva la respuesta a los mitógenos (91).

El suero obtenido de niños desnutridos contiene factores capaces de inhibir la respuesta inmunológica, como la transformación linfoblástica in vitro, estos factores pueden ser responsables de la disminución de la formación de rosetas de las células T en los pacientes con DPC (92). También es posible que, en estos casos, la síntesis prolongada o anormal de proteínas de tipo embrionarios como la α -fetoproteína, tenga un efecto inmunosupresor y acentue en la depresión de la inmunidad celular (93). La proteína C reactiva produce un fenómeno parecido.

La producción y actividad del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), muestran una variación de este factor, ya que algunos autores reportan su disminución en niños con DPC (94) y otros señalan niveles normales (95). La producción de interferón en respuesta al virus del sarampión no se modifico en niños con DPC (96).

La forma más simple y útil de medir la inmunidad mediada por células " in vivo", es a través de la respuesta de hipersensibilidad tardía a varios antígenos. La reacción con tuberculina, en niños con DPC, se encuentra disminuida. Una decremento sustancial de la hipersensibilidad tardía a diversos antígenos utilizados en la practica como indicadores casi universales de la inmunidad mediada por células ocurre en los niños con DPC. Entre estos antígenos los más comunes son, la

varidasa, la candidina, la tricofitina, la PHA y el virus de la parotiditis (97).

ANTECEDENTES DIRECTOS AL PROBLEMA PLANTEADO.

Los anticuerpos y varios tipos de células efectoras específicas y sus productos son potentes inmunorreguladores. La regulación de los anticuerpos por un mecanismo de retroalimentación depende no sólo de la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno y competir con el receptor para éste presente en las células B, sino que también intervienen funciones asociadas con la porción Fc de los anticuerpos. El fenómeno de supresión puede involucrar la eliminación del antígeno estimulador, la inactivación de las células por complejos antígeno-anticuerpo, y en ocasiones, las moléculas de anticuerpos inhiben la diferenciación de las células B por reacción cruzada con el receptor para el antígeno de las células que portan receptor Fc (98).

Los receptores Fc participan en la interacción de las inmunoglobulinas con las células efectoras fagocíticas, con linfocitos que secretan inmunoglobulinas, y células NK; en donde los receptores Fc γ confieren un elemento de reconocimiento específico mediado por IgG (99).

Los leucocitos humanos tienen tres diferentes receptores para IgG; el Rfc γ I que se encuentra en monocitos y macrófagos y una IgG monomérica con una alta afinidad, el orden de unión en el humano es IgG1 > IgG3 > IgG4 >> IgG2. Un segundo tipo de receptor es el Rfc γ II, que es un receptor de baja afinidad y se encuentra distribuido en una amplia variedad de células,

en las que se incluyen monocitos, plaquetas, neutrófilos y posiblemente células B. El RFc γ III ha sido designado CD16, también es de baja afinidad y se encuentra presente en neutrófilos, macrófago, linfocitos T activados, además en células NK, donde participa en su citotoxicidad (100).

La respuesta de anticuerpos para antígenos timo dependientes puede ser suprimida, por una reducción en el número de células T, en donde la respuesta a un antígeno puede ser inhibida por agentes que bloquean las señales del Fc (101). Por lo que la inmunidad humoral y celular, pueden ser suprimidas por retroalimentación con sus respectivos productos por reacción cruzada; de tal forma que los anticuerpos pueden regular la respuesta de las células T y las células efectoras pueden regular la actividad de las células B (102).

El número de receptores Fc se encuentra incrementado, en las células mononucleares de ratón deficientes en Zinc por lo que se ha sugerido que el defecto en la respuesta inmune en estos animales se debe en parte, a una alteración en la función de la célula T cooperadoras (103). Un cambio en la densidad de la población de los linfocitos, que puede modificar las interacciones celulares, pero su significado biológico no se ha elucidado completamente (104). Sin embargo, planteamos también el cambio de las poblaciones celulares Fc γ^+ o Fc γ^- repercute de algún modo en nuestro modelo de estudio, problema que constituye el interés de nuestras futuras investigaciones.

Por la importancia biológica que tienen los receptores Fc, que permiten diferentes interacciones entre las células

efectoras fagocíticas (monocitos, macrófagos y PMN), células secretoras de anticuerpos y células NK; ya que estos receptores actúan como un elemento de reconocimiento y de modulación de la respuesta inmune en condiciones normales (105); las alteraciones en el número de ellos en los niños con DPC puede ser relevante en los cambios inmunológicos que se presentan en este padecimiento.

Por lo anterior nos interesó cuantificar las células mononucleares con receptor Fc γ y el efecto que se obtiene, variando la densidad de la población de las células mononucleares con RFc γ^+ y RFc γ^- sobre la reactividad linfoblástica en las células de niños con DPC comparada con niños sanos. Hipótesis el número de células mononucleares con receptores Fc γ^+ se encuentran incrementados en niños con DPC respecto a los niños sanos.

DEFECTOS INMUNOLOGICOS EN DPC

	NORMAL	DPC	REFERENCIA
Peso del Timo (%)	96	30	(85)
Atrofia crónica (%)	7	85	(84)
Leucocitos totales/mm	7650-1098	8250-1124	(86)
Linfocitos absolutos/mm	3243-415	2726-686	(86)
Linfocitos T Rosetas E (%)	60.8-1.4	20.9-3.1	(87)
Linfocitos B Rosetas EAC (%)	18.3-1.1	16.0-0.9	(54)
Células NK (%)	9.0-1.1	50.6-3.1	(88)
Prueba de NBT Monocitos (%)	56-16	16-9	(75)
Hipersensibilidad cutánea			
PHA	5.3-0.9	8.4-1.3	(97)
Monilia	4.6-1.3	7.9-1.5	(97)
Inmunoglobulinas			
IgG (mg/100 ml)	977-136	1201-465	(50)
IgA (mg/100 ml)	83-40	203-98	(50)
IgM (mg/100 ml)	64-30	126-118	(50)

Tabla 1.- Esta tabla muestra algunos de los defectos inmunológicos que se presentan en los niños con DPC comparados con los valores de los niños sanos.

III.- OBJETIVOS.

- 1.- Cuantificar el número de células mononucleares con receptores $Fc \gamma^+$ de niños con desnutrición proteicoenergética (DPE) y en niños sanos, por medio del ensayo de rosetas in vitro.
- 2.- Cuantificar la reactividad linfoblástica a PHA de las células mononucleares de niños con DPE y en niños sanos.
- 3.- Investigar la modificación de la reactividad linfoblástica a PHA con diferentes densidades de población de células mononucleares con receptor $RFC \gamma^+$ o $Fc \gamma^-$ obtenidas de sangre periférica de pacientes desnutridos y sanos.

IV.- MATERIAL Y METODOS.

Material Biológico:

- a) Sangre de pollos adultos; proporcionada por Industrial de Abastos; Azcapozalco, México.
- b) Conejo Nueva Zelanda (NZB) macho, de 4 Kg de peso; proporcionado y mantenido por el Bioterio General del Centro Médico Nacional, IMSS.

Material Humano:

2.- Material Humano:

Se formaron dos grupos de niños, el grupo I constituido por 5 niños de 5 a 18 meses de edad, 3 de sexo masculino y 2 de sexo femenino con desnutrición grado III tipo Marasmático. El grupo II formado por 5 niños de sexo y edad similares al del grupo I, sin desnutrición y sin infección.

PREPARACION DE MEMBRANA DE ERITROCITO DE

POLLO PARA LA INMUNIZACION DE CONEJO (105).

Se recolectaron 60 ml de sangre venosa de pollos adultos, y se mezclaron con 60 ml de solución de Alsever pH 7.2. Esta mezcla se centrifugó a 400 x g (R-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge, Sorvall), durante 15 min, posteriormente se adiciono al paquete celular 250 ml de amortiguador salino de fosatos pH 7.2 con ácido Tánico (1:40 000). Se incubó 15 min, se centrifugó a 800 x g, durante 30 min, para la recuperación de las membranas celular. A las membranas sedimentadas se les adicionó 20 ml de PBS pH 7.2 y se homogenizó la mezcla. Luego se esterilizó en autoclave 30 min,

a 10 libras de presión y 103° C. Posteriormente, se cuantificó el número de membranas en un microscopio de contraste de fase, se cuantificarón 38 400 X 10⁶ membranas, en 10 ml de PBS.

PROTOCOLO DE INMUNIZACION PARA LA OBTENCION DE ANTICUERPOS
CONTRA ERITROCITO DE POLLO (106)

La inmunización se hizo en conejos adulto macho de Nueva Zelanda, de 4 Kg de peso, administrandole en cada inmunización, de 10⁸ a 10⁹ membranas/ml.

Programa:

- 0.3 ml, subcutánea, el primer día
- 0.4 ml, intramuscular, el tercer día
- 0.4 ml, intramuscular, en la pata derecha el sexto día
- 0.4 ml, intramuscular, en la pata izquierda el noveno día
- 0.4 ml, intravenosa, el décimo segundo día
- 0.5 ml, subcutánea, el décimo quinto día.

Siete días después de la última inmunización, se procedió al sangrado del conejo y separación del suero para la titulación de anticuerpos por las pruebas de Hemólisis y Hemaglutinación.

PRUEBA DE HEMOLISIS (107)

Los eritrocitos de pollo se lavaron tres veces con PBS pH 7.2 y se centrifugaron 15 min, a 400 x g luego, se ajustaron a una concentración de 2 %. A partir del suero inmune contra eritrocito de pollo, se hicieron las diluciones en PBS hasta una dilución 1:2 560 . A todas las diluciones se les adicionó

0.1 ml de suero normal de cobayo diluido 1:30 como fuente de complemento, más 0.1 ml de la suspensión de eritrocitos de pollo al 2 %. Los tubos se incubaron 1 h, a 37 °C, con agitación cada 10 min. Al finalizar este tiempo, se observó la hemólisis.

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION (108).

Se lavaron los eritrocitos de pollo tres veces con PBS pH 7.2, centrifugando 15 min, a 400 x g, luego, se ajustaron a una concentración de 2 %. Posteriormente se hicieron las diluciones del suero proveniente del conejo inmunizado con eritrocito de pollo, hasta 1: 2 560 utilizando PBS pH 7.2 en un volumen final de 0.2 ml. Luego, se adicionó, a cada uno de los tubos, 0.1 ml de eritrocitos de pollo al 2 %; se mezclaron los tubos incubandolos 1 h, a 37 °C; después de la incubación, se observó el título de aglutinación.

PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO DE GAMAGLOBULINAS (109).

Se tomó una alícuota de 15 ml del suero inmune contra eritrocitos de pollo y se procesó como sigue: el suero se agitó constantemente adicionándole, gota a gota, 7.08 ml de sulfato de amonio saturado para finalmente quedar al 33 %, luego se centrifugó a 550 x g durante 15 min para la recuperar el precipitado; posteriormente, se realizó lavado del precipitado con sulfato de amonio al 40 %, y se centrifugó a 550 x g, durante 15 min. El precipitado se resuspendió y se diálizo durante 24 h a 4 °C, con amortiguador 0.015 M de fosfatos pH 8,0. Finalmente, el el material obtenido fue colocado en una columna DEAE-celulosa.

PREPARACION DE LA DEAE-CELULOSA (110).

A la DEAE-celulosa hidratada se añadió HCl 0.5 N durante 30 min. Posteriormente se lavó la DEAE-celulosa con agua desionizada hasta obtener un pH de 4.5. Eseguida se añadió NaOH 0.5 N durante 30 min, para finalmente lavarla con agua desionizada hasta lograr un pH de 7.0. La muestra del suero se aplicó a una columna empaquetada con DEAE-celulosa equilibrada con amortiguador de fosfatos de potasio 0.015 M pH 8.0 que se utilizó como solución de corrimiento, para la elución de IgG. Las proteínas unidas a la columna se eluyeron con solución salina de fosfatos 0.5 M pH 8.1. Las fracciones colectadas fueron caracterizadas por espectrometría de absorción. El pico activo de IgG fué dializado en agua destilada y se liofilizó.

CUANTIFICACION DE CELULAS MONONUCLEARES RFc γ^+ .

Se recolectaron 5 ml de sangre periférica de niños con DPC y sanos, conteniendo 0.2 ml de heparina 1 000 U/ml. Se colocaron las muestras sanguíneas en tubos cónicos de 15 ml de policarbonato (International), en un gradiente Ficoll-Hypaque (111) $d=(1.076)$ y se centrifugó a 400 x g durante 40 min. Se recuperó el paquete celular con una pipeta Pasteur, luego, se lavaron las células tres veces con Hank's pH 7, centrifugando estas finalmente 400 x g, durante 15 min. Por último se cuantificó el número de células, y se evaluó su viabilidad al tiempo 0 y en los diferentes tiempos de cultivo (24,48 y 72 h) por la técnica de exclusión con azul de tripán (Sigma).

Se ajustaron las células a una concentración de 16×10^6

cel/ml. Se tomaron 0.25 ml y se colocaron en tres tubos (Falcon 12x75 mm), conteniendo cada uno de los tubos 20 ug de IgG (liofilizada) contra eritrocito de pollo. Se incubaron durante 30 min. Posteriormente, se agregaron a los tubos 0.25 ml de eritrocitos de pollo, al 0.05 % , y se incubaron 15 min a 37° C. Se centrifugaron los tubos 2 min, a 110 x g y se incubaron durante de 1 h a 4° C. Al término de este tiempo, se determinó el número de células mononucleares formadoras de rosetas, que poseen probablemente el receptor RFC γ^+ . Se contarón 100 células para obtener el porcentaje y al mismo tiempo se determinó su cantidad en cámara de Neubauer. Los resultados se expresaron por el porciento o por el número de células/mm³. Se consideró una célula mononuclear formadora de roseta, si tenían adherida a su superficie 3 ó mas eritrocitos de pollo.

REACTIVIDAD LINFOBLASTICA A PHA (112).

Se recolectaron 5 ml de sangre periférica humana, de niños de los grupos con DPC y sanos, conteniendo 0.2 ml de heparina 1000 U/ml, y se depositaron en tubos cónicos de 15 ml de policarbonato (International). Se procesaron las muestras sanguíneas sobre un gradiente Ficoll-Hypaque $d=(1.076)$ y se centrifugó a 400 x g durante 40 min. Se recuperó el paquete celular con una pipeta Pasteur, realizando el lavado con medio RPMI-1640 (Gibco), con 50 UI/ml de penicilina (Lakeside) y 50 ug/ml de estreptomicina (Lakeside), a 400 x g, durante 15 min, en una centrifuga International CS. Luego se cuantificó el número de células y se determinó la viabilidad celular por la técnica de exclusión de azul de tripáno (Sigma), en todos

los casos, la viabilidad celular fué mayor ó igual a 90 %.

El número de células se ajustó a 1×10^6 cel/ml en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco), con antibiótico al 1 % y suero fetal de ternera al 10 % (Wellcome). Se colocaron 2 ml de la suspensión en cada tubo (Falcon 12x75 mm). Se empleó, fitohemaglutinina de Phaseolus vulgaris (PHA) en las siguientes concentraciones: 50 ug/ml, 100 ug/ml y 200 ug/ml, se preparó un control sin PHA, se prepararon por triplicado cada una de las concentraciones del mitógeno.

Los tubos se incubaron en atmósfera húmeda, con 5 % de CO_2 , a 37 °C, durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota y se cuantificó la viabilidad celular; en los casos en que esta fué mayor del 50%, se continuó el experimento, agregando en cada uno de los tubos, 50 ul de timidina tritiada (1 uCi/ml New, England Nuclear). Se incubaron los tubos por 18 horas. Finalmente, se colectaron manualmente las células, utilizando filtros de fibra de vidrio (Whatman GF-C de 2.5 mm) y se precipitó el DNA celular, con TCA al 5 % y 70 % de metanol. Los filtros se depositaron en viales de 2 ml con Liquid-Fluor Tolueno (New England) y se les determinó la cantidad de timidina tritiada incorporada en un contador de centelleo.

SEPARACION DE CELULAS MONONUCLEARES Rfc γ^+ PARA CULTIVO

DE CELULAS MONONUCLEARES Rfc γ^+ y Rfc γ^- .

A partir de la suspensión de células mononucleares, de las muestras obtenidas de niños con DPC y sanos se realizó la metodología de formación de rosetas con eritrocitos de pollo;

luego las células mononucleares que formaron rosetas, y las que no, se sometieron a centrifugación en un gradiente Ficoll-Hypaque ($d=1.076$) a $400 \times g$, durante 10 min. Después de la centrifugación se colocó, en diferentes tubos de policarbonato (Internatinal), el paquete que contenía las células mononucleares formadoras de rosetas, posiblemente las células mononucleares $Rfc \gamma^+$, por otro lado se separaron las células mononucleares $Rfc \gamma^-$ y que no formaron rosetas. Se lavaron las células mononucleares con medio RPMI-1640 (Gibco), tres veces, a $400 \times g$, durante 15 min. En el caso del paquete conteniendo las células mononucleares $Rfc \gamma^+$, antes del lavado celular, se trató con cloruro de amonio al 0.81%, en una proporción 1:1, incubando 5 min, a $37^\circ C$, luego, se prosiguió con la cuantificación celular y la viabilidad celular con azul de tripano.

REACTIVIDAD LINFOBLASTICA A PHA EN CULTIVOS DE CELULAS MONONUCLEARES $Rfc \gamma^+$ QUE LLEVAN DIFERENTES PROPORCIONES DE CELULAS MONONUCLEARES $Rfc \gamma^-$.

Las células mononucleares $Rfc \gamma^+$ y $Rfc \gamma^-$, de cuatro muestras de niños sanos, se colocaron en cocultivos en las siguientes condiciones: se ajustaron las células mononucleares $Rfc \gamma^+$ en las proporciones 1:1, 1:2, 1:4 y 1:9 respecto a las células mononucleares $Rfc \gamma^-$, con un número final de células en cada tubo de 2×10^6 cel/2 ml, en medio RPMI-1640 (Gibco), suplementado con antibiótico al 1 % y suero fetal de ternera al 10 % (Wellcome), más PHA (Difco) en las siguientes concentraciones: 50 ug/ml, 100 ug/ml y 200 ug/ml; se siguieron

las demás condiciones de cultivo, señaladas con las poblaciones normales de células.

$$\text{CeL} = \frac{\text{cpm de células mononucleares con PHA}}{\text{cpm de células mononucleares sin PHA}}$$

SANGRE PERIFERICA DE NINOS

DPC Y SANOS

Separación

Ficoll-Hypaque

CELULAS MONONUCLEARES

Incubación

IgG contra

E. pollo

FORMACION DE

ROSETAS

CUANTIFICACION DE

CELULAS MONONUCLEARES Rfc γ^+

Cultivo con PHA

50, 100 y 200 ug/ml

REACTIVIDAD

LINFOBLASTICA

INCORPORACION

DE H³TIMIDINA

SANGRE PERIFERICA DE NINOS

DPC Y SANOS

Separación

Ficoll-Hypaque

CELULAS MONONUCLEARES

Incubación

IgG contra

E. pollo

FORMACION DE

ROSETAS

CUANTIFICACION DE

CELULAS MONONUCLEARES Rfc γ^+

Cultivo con PHA

50, 100 y 200 ug/ml

REACTIVIDAD

LINFOBLASTICA

INCORPORACION

DE H^3 TIMIDINA

SANGRE PERIFERICA

HEPARINA

Separación

Ficoll-Hipaque

CELULAS MONONUCLEARES

FORMACION DE ROSETAS

Gradiente

Ficoll-Hypaque

CELULAS MONONUCLEARES

CELULAS MONONUCLEARES

$\text{RFc}\gamma^+$

$\text{RFc}\gamma^-$

REACTIVIDAD LINFOBLASTICA

PROPORCION CELULAR

$\text{RFc}\gamma^+ : \text{RFc}\gamma^-$

1:1, 1:2, 1:4 Y 1:9

V .- RESULTADOS.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-ERITROCITOS DE POLLO

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION Y DE HEMOLISIS.

La hemaglutinación que se obtuvo con el suero de conejo inmunizado con las membranas de eritrocitos de pollo, fue hasta una dilución de 1: 640 y la hemólisis hasta una dilución 1: 1280.

VIABILIDAD DE CELULAS MONONUCLEARES:

A partir de las muestras de los grupos I y II, se determinó la viabilidad de las células mononucleares en los siguientes tiempos de cultivo: cero, 24, 48 y 72 h. La viabilidad en los diferentes tiempos fue de 98, 79.10, 75.2 y 65.7 % para los niños sanos y para los niños desnutridos los valores fueron los siguientes: 97, 77.15, 70.6 y 62.9 % respectivamente. Esto se ilustra en la gráfica 1.

DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS MONONUCLEARES PARA LA

ESTANDARIZACION DEL METODO DE FORMACION DE ROSETAS.

Se observó una ligera elevación en el número de células mononucleares con Rfc γ^+ , capaces de formar rosetas entre las relaciones de 16×10^6 y 32×10^6 cel/ml, con una media de 29% y 38% respectivamente. Esta determinación fue realizada para la uniformización de la metodología de formación de rosetas con eritrocitos de pollo. Aunque los resultados fueron muy similares, se eligió la cifra de 16×10^6 cel/ml, debido a que con la proporción mayor se formaban grumos que dificultaban la lectura, además de que sería mayor el número de células que se requeriría para esta técnica. Estos datos se muestran en la gráfica 2.

DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS MONONUCLEARES RFc γ^+

EN LOS DOS GRUPOS ESTUDIADOS.

Cada determinación se hizo por triplicado, realizando la lectura de las células mononucleares, que formaron rosetas, de dos formas: 1) lectura en porcentaje, donde las medias aritméticas fueron las siguientes: células mononucleares RFc γ^+ en niños desnutridos 41 % y en niños sanos 28 %; 2) lectura en cámara de Neubauer donde las medias aritméticas fueron: en niños desnutridos de 190 células mononucleares RFc γ^+ por mm^3 y en los niños sanos de 103 células mononucleares RFc γ^+ por mm^3 . Estos datos se muestran en las gráficas 3 y 4. Al comparar los resultados de los niños desnutridos respecto a los sanos, se observaron diferencias significativas ($p < 0.005$).

REACTIVIDAD LINFOBLASTICA A PHA DE LAS CELULAS DE SANGRE

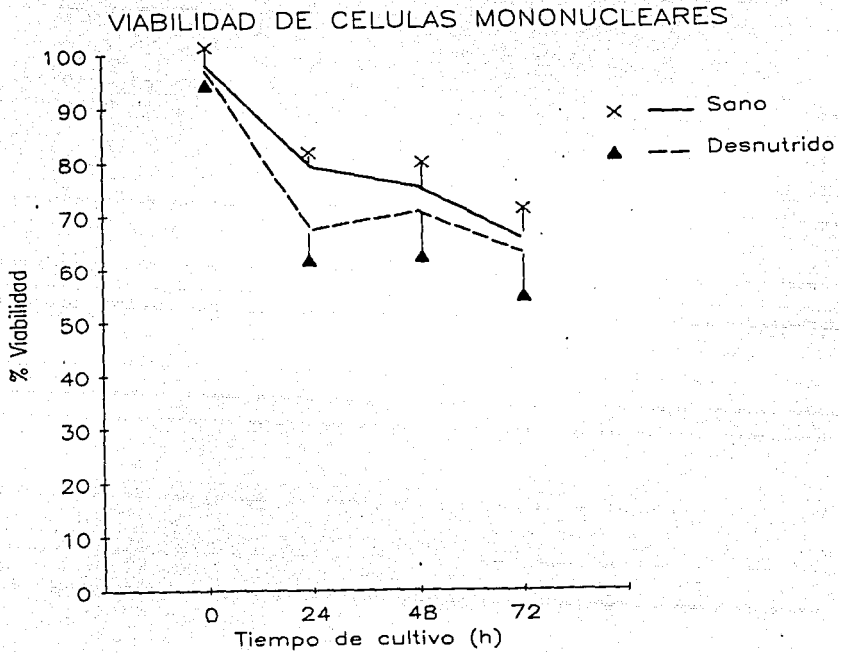
PERIFERICA DE NIÑOS DESNUTRIDOS Y SANOS.

Se observó que la estimulación a la PHA de las células mononucleares de niños sanos fue mayor a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de PHA, con un coeficiente de estimulación de 2.4; mientras que las células mononucleares de los niños desnutridos, la máxima estimulación se observó con una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ de PHA, con un coeficiente de estimulación de 1.20; esto se muestra en la gráfica 5. La diferencia de los valores de ambos grupos, considerando las respuestas a 100 $\mu\text{g/ml}$ de PHA, significativa con un valor de ($p < 0.005$).

REACTIVIDAD LINFOBLASTICA A PHA EN CULTIVO DE CELULAS
MONONUCLEARES Rfc γ^+ QUE LLEVAN DIFERENTES PROPORCIONES DE
CELULAS MONONUCLEARES Rfc γ^- .

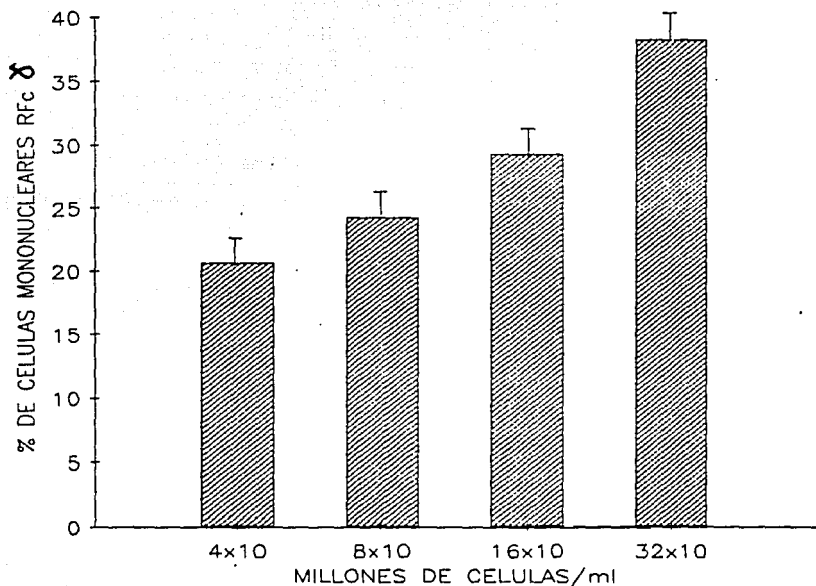
Los datos de los coeficientes de estimulación linfoblástica, de los cultivos de las células mononucleares, de cuatro muestras de niños sanos, se muestra en la gráfica 6. En las que se puede observar que en la proporción celular 1:1 no hubo estimulación linfoblástica; mientras que en las proporciones 1:2 el coeficiente de estimulación fué de un valor de 2.28, en 1:4 de un valor de 2.53, ambas con una concentración de PHA de 50 ug/ml. En la proporción 1:9 la máxima estimulación se obtuvo con una concentración de PHA de 100 ug/ml con un valor de 3.85.

GRAFICA 1



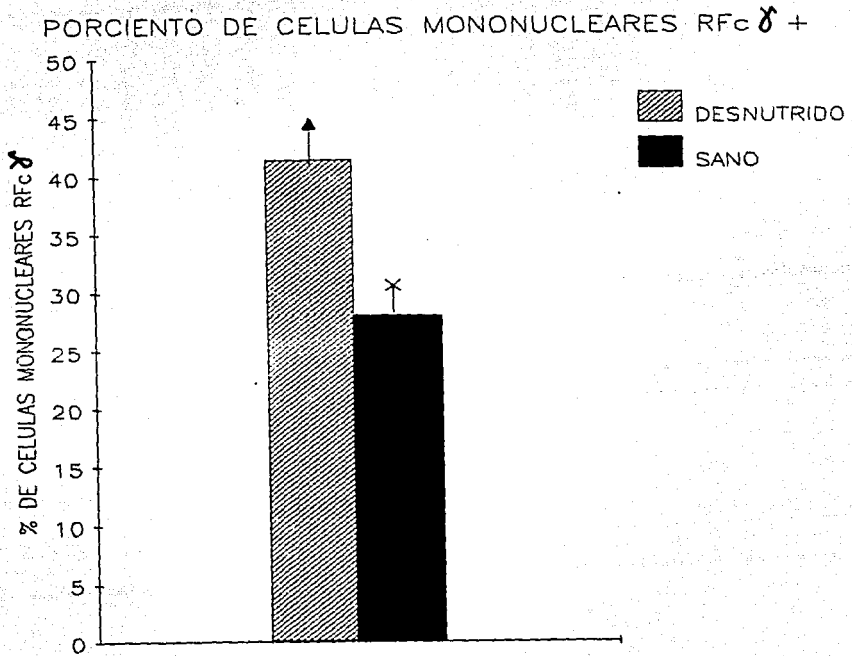
Gráfica 1.- Se muestra los resultados obtenidos de las determinaciones de la viabilidad celular a diferentes tiempos, de células mononucleares de niños desnutridos y sanos, por la técnica de exclusión con el colorante azul de tripán.

NUMERO DE CELULAS MONONUCLEARES
PARA LA FORMACION DE ROSETAS

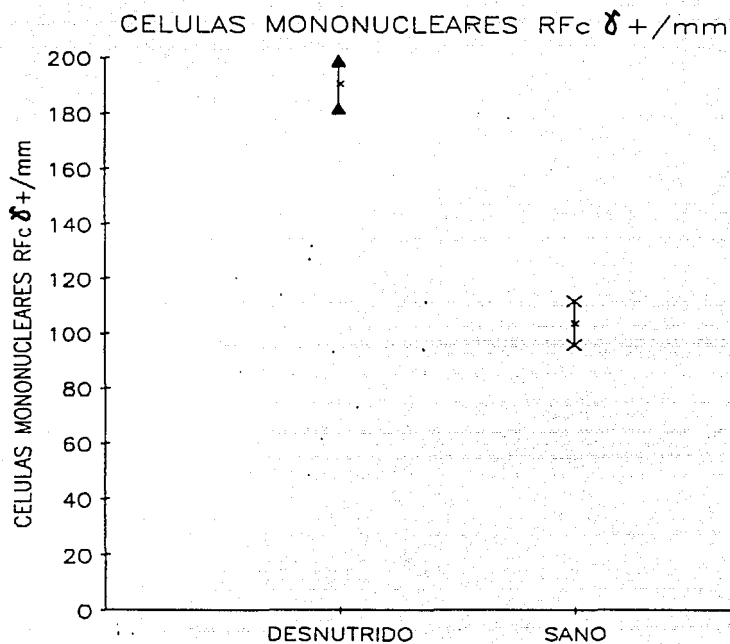


Gráfica 2.- Se muestra los resultados obtenidos de las determinaciones de células mononucleares RfC γ^+ en niños sanos que formaron rosetas empleando diferentes número de células.

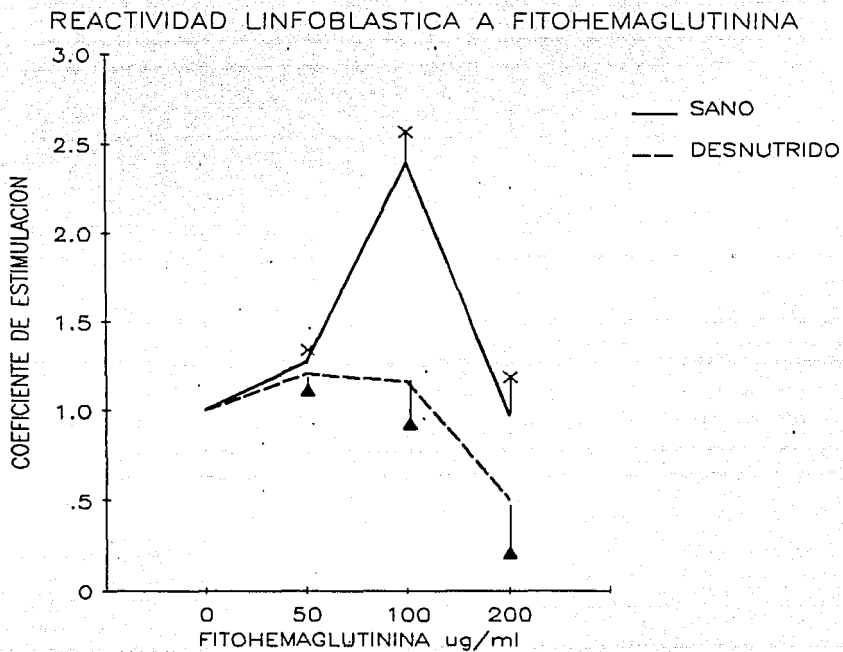
GRAFICA 3



Gráfica 3.- Se muestra la media aritmética y la desviación estándar de las determinaciones en por ciento de las células mononucleares RFc γ^+ que formaron rosetas de los niños desnutridos y sanos.

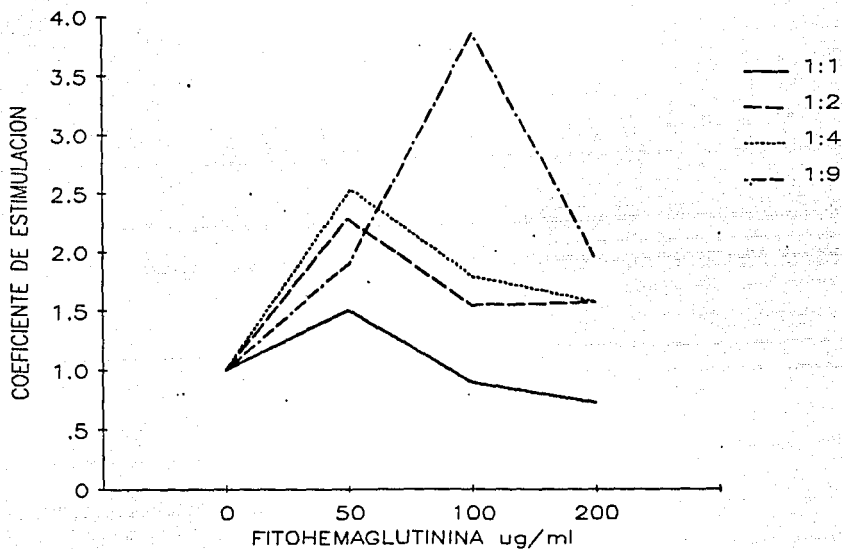


Gráfica 4.- Se muestra la media aritmética y la desviación estandar de las determinaciones, de las células mononucleares RFc γ^+ que formaron rosetas por mm^3 de los niños desnutridos y sanos .



Gráfica 5.- Se muestra la reactividad linfoblástica de las células mononucleares de sangre periférica de los niños desnutridos y sanos a diferentes concentraciones de fitohemaglutinina.

REACTIVIDAD LINFOBLASTICA A PHA
DE CELULAS MONONUCLEARES Rfc γ^+
CON DIFERENTES PROPORCIONES DE CELULAS
MONONUCLEARES Rfc γ^-



Gráfica 6.- Se muestra la reactividad linfoblástica a la PHA de células mononucleares Rfc γ^+ con diferentes densidades de células mononucleares Rfc γ^- de cuatro muestras de niños sanos.

VI.- DISCUSION.

Desde hace algunas décadas se ha observado que los niños desnutridos presentan infecciones con más frecuencia que los bien nutridos, siendo estas infecciones causadas principalmente por microorganismos patógenos intracelulares, a diferencia de las encontradas en los niños con estado nutricional adecuado (2). Esto se ha explicado por alteraciones predominantes en la inmunidad celular. Estas alteraciones se manifiestan a través de la atrofia tímica, la disminución de la actividad de hormonas tímicas (5), la ausencia de hipersensibilidad tardía a antígenos (ej: tuberculina, varidasa y a componentes de *Cándida albicans*) (97) y la disminución del número de linfocitos T formadoras de rosetas E mediadas por la molécula CD2 (87). En los niños con DPC se ha encontrado, además depresión de la respuesta linfoproliferativa a los mitógenos como PHA, Con A y a antígenos como el PPD, también se ha descrito una respuesta variable en la producción y actividad del MIF (96).

La variación en la respuesta proliferativa y en el número de células con marcador CD2, puede ser debido a que el número de estas células se encuentra disminuida en la DPC y a la acción de factores que inhiben la respuesta inmune, como la α -fetoproteína y la proteína C reactiva, las cuales, se han reportado que se encuentran incrementadas en el suero de niños con DPC (93).

Por otra parte, Naeyer y cols (113) demostraron que el periodo en que se instala la desnutrición es determinante sobre

el dano a la respuesta inmune celular, y que esta etapa crítica para los niños, es la intrauterina y la de lactancia. Considerando las edades de nuestro grupo de estudio, que fueron niños entre 5 y 18 meses de edad, podemos, inferir que la desnutrición de estos niños se inició en los primeros seis meses de vida, por lo cual, la disminución de la inmunidad celular persistió hasta el momento del estudio.

Nuestros resultados de respuesta proliferativa a PHA apoya este planteamiento, ya que las células mononucleares de los niños con desnutrición de tercer grado Marasmáticos, presentaron un coeficiente de estimulación máximo de 1.20 comparados con los niños sanos bien nutridos que tuvieron un coeficiente de estimulación de 2.4 .

Los receptores para la porción Fc de IgG (RFc γ), presentan un papel central en la defensa inmune, participando, entre muchos aspectos, en la estimulación y liberación de mediadores de la inflamación, en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, y en la eliminación de complejos inmunes por las células fagocíticas.

Debido a la importancia biológica que tienen los receptores Fc, al estar actuando como elementos de modulación de la respuesta inmune, y con los antecedentes en modelos experimentales de DPC en animales, en donde se describe que el número de células con receptores Fc se encuentra incrementado (103); nos pareció de importancia el estudio de estos receptores celulares, en niños con DPC. Considerando que los cambios inmunológicos que se presentan en este padecimiento,

pueden estar relacionados con la alteración en número de células que portan estos receptores Fc. Al determinar el número de células mononucleares con $\text{RFc } \gamma^+$, por la técnica de la formación de rosetas se observó un incremento significativo en el número de estas células en niños con DPC, que fué de 41 % comparados con los testigos que presentaron un porcentaje de 28, coincidiendo con lo que se había descrito en los modelos experimentales de DPC en ratones.

En humanos se ha determinado que existe una alteración en la densidad de las poblaciones de los linfocitos, en pacientes con DPC (104), antecedente que quisimos corroborar en nuestro estudio. Por lo que después de la cuantificación de las células mononucleares $\text{RFc } \gamma$ y realizar su purificación por un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque, se cuantificaron las células y se prosiguió a variar la densidad de población celulares realizando cocultivos estimulados con PHA variando de la relación de las células mononucleares $\text{RFc } \gamma^+$ y $\text{RFc } \gamma^-$ tanto en pacientes con DPC como en testigos sanos. Sin embargo, debido a problemas personales y de trabajo, no se pudo realizar este estudio en niños desnutridos, por lo que no se alcanzó en su totalidad el objetivo planteado número tres. Se pretendía realizar cocultivos de dos maneras, con poblaciones enriquecidas de células mononucleares $\text{RFc } \gamma^+$ y con poblaciones de células mononucleares $\text{RFc } \gamma^-$, con una previa separación de las células adherentes, variando, luego, las poblaciones celulares de las relaciones $\text{RFc } \gamma^+ : \text{RFc } \gamma^-$ y $\text{RFc } \gamma^+ : \text{RFc } \gamma^-$, con el objeto de verificar en que relaciones celulares se podría observar un efecto supresor.

Sin embargo, planteamos también que el cambio de las poblaciones celulares RFC γ^+ o RFC γ^- , repercute de algún modo en nuestro modelo de estudio, problema que constituye el interés de una futura investigación.

En los ensayos de estandarización y manejo de los controles para la técnica de variación de la población de células mononucleares con RFC γ^+ y RFC γ^- muestran que en la densidad 1:1 no se observó respuesta proliferativa; al incrementar la población de células mononucleares RFC γ^- a 1:2 y 1:4; se incrementó la respuesta proliferativa a PHA con valores de 2.28 y 2.53 de coeficientes de estimulación respectivamente. También se presentó variación en la concentración de PHA necesaria para la máxima estimulación, en donde se observó que estos valores se obtienen con una concentración de PHA de 50 ug/ml, a diferencia de los cultivos con poblaciones normales en donde la máxima estimulación se obtuvo con una concentración de PHA de 100 ug/ml.

En la proporción 1:9 se incrementó el valor de el coeficiente de estimulación a 3.85 con una concentración de PHA de 100 ug/ml.

Es posible que la respuesta proliferativa de los cultivos "in vitro" a mitógenos, dependa no sólo, del número de células totales y la concentración de mitógeno, sino también puede depender de las proporciones celulares presentes en los cultivos y la relación que se guarde entre las diferentes poblaciones células.

El hecho de que nuestros resultados sugieran una

alteración en una determinada población celular que repercutiera en la manifestación de la respuesta celular aunado a lo que se ha demostrado que los niños con desnutrición intrauterina presentan una disminución del factor tímico circulante comparados con los recién nacidos eutróficos (82). También se ha descrito que los linfocitos T de niños con desnutrición intrauterina recuperaban "in vitro" su capacidad de formación de rosetas E, cuando se les incubó con timosina (114). Se podría plantear que si la desnutrición que se adquiere en etapas posnatales, es posible restaurar "in vitro" la función inmune celular, con administración de timosina. Se podría pensar en un posible tratamiento de estos niños con factores estimuladores como timosina, IL-2 entre otros, con el objeto de restaurar la función inmune alterada.

VII.- CONCLUSIONES.

I.- EL NUMERO DE CELULAS MONONUCLEARES $Rfc \gamma^+$ DETERMINADO POR EL METODO DE FORMACION DE ROSETAS DE NINOS DESNUTRIDOS ES MAYOR RESPECTO A EL NUMERO DE CELULAS MONONUCLEARES $Rfc \gamma^+$ DE NINOS SANOS $p < 0.005$.

II.- LAS CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA DE NINOS CON DPC NO PRESENTARON REACTIVIDAD LINFOBLASTICA A PHA RESPECTO A LOS NINOS SANOS.

III.- LA REACTIVIDAD LINFOBLASTICA A PHA DE CELULAS MONONUCLEARES $Rfc \gamma^+$ DE SANGRE PERIFERICA DE NINOS SANOS ES POSIBLE QUE SE MODIFIQUE SI SE VARIA LA DENSIDAD DE POBLACION DE CELULAS MONONUCLEARES $Rfc \gamma^+$ Y $Rfc \gamma^-$.

REFERENCIAS.

- 1.- Chandra, R. K: Nutritional deficiency and resistance to infection. Bulletin WHO. Monograph. 1979;57,167.
- 2.- Deo, M.G: Cell biology of protein-calorie malnutrition. World. Rev. Nutr. Diet. 1978;30:32
- 3.- Neumann, C. G., Lawlor, G. J., Jr., Stiehm, E. R., Swenseid, C. Newton, J., Helber, J., Ammann, A. J. and Jacob, J: Immunologic responses in malnourished children. Am. J. Clin. Nutr. 1975;28:89.
- 4.- Chandra, R. K. and Newberne, P. M: Nutrition, inmunidad and infection. Mechanisms of Interactions. Plenum, New York. 1977.
- 5.- Chandra, R. K: Immunocompetence in undernutrition. J. Pediatr. 1972;81:1194.
- 6.- Khadraoui, S., Lopez, V., Hamza, B. and Smith, N. J: Cellular immunity in protein-calorie malnutrition. Arch. Fran. Pediatr. 1977;34:143.
- 7.- Kronenberg. S. G., Hood, L. E. and Shastri, N: The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. Annu. Rev. Immunol.1986;4:429.
- 8.- Sussman, J. J., Bonifiano, J. S., Schwaerz, J. L., and Ashwell, J. D: Failure to synthesize the T cell CD3 structure and function of a partial T cell receptor complex. Cell. 1988;52:85.
- 9.- Roitt, I., and Brostoff, J. M: Cells involved in the immune response p. 2.6-2.8. Foley, F., Berghe, L.V. ed. Immunology. Grower Medical Publishing. London.1989.

- 10.- Harald Von Baechmer: The development Biology of T lymphocytes. Annu. Rev. Immunol.1988;6:309.
- 11.- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L: TH1 and TH2 cells. Annu. Rev. Immunol. 1989;7:145.
- 12.- William, E. P: T cell derived lymphokines in the immune response. Minireview. 1988;323-326.
- 13.- Miescher, G. C., Rawleigh, H. C. and MacDonalds, R. H: Expression of T-cell receptor. by functionally distinct substes of immature adult thymocytes. Ann. N.Y. Aca. Sci. 1988;8:10.
- 14.- Edward, S. Golub. Lymphocytes.p. 193. Sinaver Assiates, inc. Publishers. Immunology A Synthesis.1988.
- 15.- Marrack, F., and Kappler, J: T cell can distinguish between allogenic major histocompatibility complex products on different cell types. Nature. 1988;322:840.
- 16.- Bjorkman. P. S., Saper, M. A., Bennett, W. S. et al: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature. 1987;329:506.
- 17.- Steinmentz, M., Minard, K., Horvath, S. et al: A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse. Nature. 1982;300:35.
- 18.- Paul. E. W. Lymphocytes and thymus. William E. Paul. p. 71 Fundamental Immunology. ed. Raven. Press. N.Y. 1979.
- 19.- Lechler. R. I: Structure-function relationships of MHC class II molecules. Immunology. 1988;1:25.
- 20.- Germain, R. G: The ins and outs of antigen processing and

- presentation. *Nature*. 1986;322:687.
- 21.- Hammerling, U. and Hoffmann, K. D: Determinant protection a hypothesis for the activity of immune response genes in the processing and presentation of antigen by macrophages. *Scand. J. Immunol.* 1986;24:625.
 - 22.- Bochner, B., Bryan, K. and Schileimer, R. P.: Interleukin 1 production by human ling tissue. *J. Immunol.* 1987;139:2303.
 - 23.- Williams, J. M: Dual parameter flow cytometric analysis of DNA content activation antigen expression, and T cell subset prolipheration in the human mixed lumphocyte reaction. *J. Immunol.* 1984;13:2330.
 - 24.- Biere, B. E. Greenteins, J. L., Sleckman, B. et al: Functional analysis of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Ann. N. Y. Aca. Sci.* 1988;51:199.
 - 25.- Waldmann, A. T: The multi-subunit interleukin-2 receptor. *Annu. Rev. Biochem.* 1989;58:875.
 - 26.- Salmon. M., Kitas, G. D., Gaston, H. S. and Bacon, P. A: Interleukin-2 production and response by helper T-cell subsets in man. *Immunology.* 1988;65:81.
 - 27.- Nishizuka, Y: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature.* 1988;334:661.
 - 28.- Kronke, M. L., Leonard, W. S., Depper, J. L. and Greene, W. C: Sequential expression of genes involved in human T lymphocyte growth and differentiation. *J. Exp. Med.* 1985;161:1593.
 - 29.- Kishimoto, T: Factors affecting B-cell growth and

- differentiation. Annu. Rev. Immunol. 1985;3:133.
- 30.- Mingari, M. C., Moretta, A., Pantaleo, G. and Moretta, L: Identification of a functional T-cell population by the use of surface markers. Annu. Rev. Immunol. 1985;133:147.
 - 31- Lindahl, F. L. and Wilson, D. B: Histocompatibility antigen-activate cytotoxic T lymphocytes. J. Exp. Med. 1977;145:500.
 - 32.- Snow, P. M. and Terhorst, C: The T8 antigen is a multimeric complex of two distinct subunits on human thymocytes but consists of homomultimeric forms on peripheral blood T lymphocytes. J. Biol. Chem. 1983;258:14675.
 - 33.- Blue, M. L., Craing, K. A., Anderson, C. P. et al: Evidence for specific association between class I MHC antigen and the CD8 molecules of human molecules suppressor/cytotoxic cells. Cell. 1988;54:413.
 - 34.- Makgoba, W. M., Sanders, G. E., Gugel, M. A. et al: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) monoclonal antibody inhibits cytotoxic T lymphocytes recognition. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1988;41:426
 - 35.- Wagner, H., and Heeg, K: Two distinct signals regulated induction of IL-2 responsiveness in CD8 murin T cells. Immunology. 1988;64:433.
 - 36.- Moller, G: T cell receptor and genes. Immunol. Rev. 1984;81:1
 - 37.- Germain, R. N. and Benacerraf, B: A single major pathway of T lymphocyte interactions in an antigen specific

- immune suppression. *Scand. J. Immunol.* 1981;13
- 38.- Mohagheghpour, N., Damle, N., Takasa, S. and Engleman, E:
Generation of antigen receptor-specific suppressor T cell
clones in man. *J. Exp. Med.* 1986;164:950.
 - 39.- Nitin, K. D. and Engleman, E. G: Immunoregulatory T cell
circuits in man. *J. Exp. Med.* 1983;158:159.
 - 40.- Asherson, G, L: Antigen-specific T-helper and suppressor
factors in the control of immune response. *Immunology.*
1988;1:53.
 - 41.- Nabel, G. and Buscalo, L. R: Multiple activites of a
cloned cell line medianting natural killer cell function.
J. Exp. Med. 1981;153:1582.
 - 42.- Storkus, W. J. and Sawson, R. J: B cell sensitivity to
natural killing. *J. Immunol.* 1986;136:1542.
 - 43.- Falconi, F., Pawelec, G., Bratting, N. et al:
Functionally distint human T- lymphocyte clones sharing
potent suppressive activity on immunoglobulin secretion.
Immunology. 1985;54:685.
 - 44.- Muchmore, W. A. and Deker, J. M: Uromodulin. *Science.*
1985;129:479.
 - 45.- Katheryn, B. M. and Muchmore, A. V: Uromodulin an
immunosuppressive protein derived from pregnancy urine ,
is an inhibitor of interleukin 1. *Immunology.*
1986;83:9119.
 - 46.- Hartung, P. H., Wolters, K. and Toyka, K. V: Sustance P.
Binding propertier and studies on cellular responses in
guinea Pig macrophages. *J. Immunol.* 1986;136:3856.
 - 47.- Kehrl, J. H., Roberts, A. B., Wakefield. M. L. et al:

- Transforming growth factor B is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J. Immunol.* 1986;137:3855.
- 48.- Keet, M. P and Thom, H: Sero-immunoglobulins in Kwashiorkor, *Arch. Dis. Child.* 1969;44:600.
- 49.- Alvarado, J. and Luthringer, D. G: Serum immunoglobulins in edematous protein-calori malnuorished. *Child. Clin. Pediatr.* 1971;10:174.
- 50.- Aref, G. H., Eldin, K., and Hassan A. J: Immunoglobulins in Kwashiorkor. *J. Trop. Med. Hyg.* 1977;73:186.
- 51- Suskind R., Sirisinha S., Edelman R., Vithayasai V., Dmrongsak D., Charaputana C., and Olson R.E: Immunoglobulins and antibody response in Thai children with protein-calorie malnutrition. In *Malnutrition and the Immune Response*, R. Suskind ed. Raven, New York. 1977;185:191.
- 52.- Suskind, R. M., Sirisinha, S., Charupatana, C. et al: Immunoglobulines and antibody response in children weth protein-caloric malnutrition, *Am. J. Clin. Nutr.* 1976;29:836.
- 53.- Putillo, D. T., Riggs, R. S. and Evans, R: Humoral immunity of parasitized, malnourished children. *Am. J. Trop. Med.* 1976;25:229.
- 54.- Aref, G. M. and Hassan, A. I: Immunoglobulins in kwashiorkor. *J. Trop. Med. Hyg.* 1979;73:186.
- 55.- Mathews, J. D. and Whittingham, S: Protein supplementation and enhanced antibody-producing capacity

- in new guinean school children. *Lancet*. 1972;2:675.
- 56.- Reedy V. and Srikantia, S. G: Antibody response in Kwashiokor. *Indian. J. Med. Res.* 1964;53:1154.
- 57.- Scrimshaw, N. S., Taylor, C. E. and Gordon, J. E: Interaction of nutrition and infection. WHO Monograph Serie. 1968;57:329.
- 58.- Welch, J. S. and Doherty, R. L: Human and cellular immune response to streptococci, influenza and other antigens in Australian aborigin school children, *Aust. Ped. J.* 1970;6:192.
- 59.- Reinhardt, M. C. and Stewart, N. W: Antibody affinity and clearance function in high and low antibody affinity mice the effect of protein deficiency. *Immunology.* 1979;38:735.
- 60.- Sirisinha, S., Suskind, R., Edelman, A. C. and Olson, R. E: Secretory and serum IgA in children with protein-calorie malnutrition. *Pediatrics.* 1975;55:166.
- 61.- Reddy, V., Raghuramulu, N. and Bhaskaram, C: Secretory IgA in protein-calorie malnutrition. *Arch. Dis. Child.* 1976;51:871.
- 62.- Chandra, R. K: Food antibodies in malnutrition, *Arch. Dis. Child.* 1975;50:532.
- 63.- Chandra, R. K: Immunoglobulins and antibody response in protein-calorie malnutrition. p. 168. In *Malnutrition and the Response*, R. Suskind. ed. Raven, New York, 1977.
- 64.- Klein, K., Suskind, R., Kulapongg, P., Mestz, G. and Olson R. E: Endotoxemia, a possible cause of decreased complement activity in malnourished Thai children. *En:*

- Malnutrition and the immune response. Suskind, R.M. ed.,
Raven Press N Y. 1977.
- 65.- Chandra, R. K.: Immunology of nutritional disorders.
Arnold, London. 1980.
- 66.- Kumate, J., Mariscal. C, Hikimura, J. and Yoshida, P:
Desnutrición e inmunidad. I. Complemento hemolitico en
ninos desnutridos. Bol. Med. Hosp. Infant. (Méx)
1964;21:467.
- 67.- Sirisinha., Suskind, R., Edelman, R., Charupatana, C. and
Okon, R. E: Complement C3 proactivator leves in children
with proptein-caloric malnutrition and effect of dietary
treatment, Lancet. 1973;i:1016.
- 68.- Ruddy, S., Gigli and Austin, R: The complement sytem of
man, N. Engl. J. Med. 1972;287,489.
- 69.- Haller, L., R. H. and Lambert, P. H: Plasma leves of
complement components and complement haemolytic activity
in protein-energy malnutrition. Clin. Exp. Immunol.
1978;34:248.
- 70.- Chandra, R. K. ed. The Liver and Bilari System in Infants
and Children. Churchil Livingstone, Edinburgh and London.
1979;69:76.
- 71.- Neuman, S. G., Lawlor, G. J. J., Stiehm, E. R.,
Swendseid, M. E. Newton S. Herbert, J., Aumman, A.J. and
Jacob, M. Immunologic responses in malnourition
children., Am.J. Clin. Nutr. 1975; 28:89.
- 72.- Litzmann, C., Vithayasi, V. and Windrker, P: Phagocytosis
and killing of polymophonucleares leukocytes in Thai

- children with protein calorie malnutrition. En. op. 1978;16:253.
- 73.- Rosen E. U., Geefhuysen. J., Anderson. R., Joffe. M. and Rabson. A. R: Leukocyte function in children with kwashiorkor. Arch. Dis. Child. 1975;50:220.
- 74.- González, M. A., Ramos Z. R., Faratti, G., Urbiola, M. G. y Frenk, S: Estudio de la quimiotaxis y fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares en niños desnutridos. Arch. Invest. Med. (Méx). 1977;8:175.
- 75.- Rosen, E. U., Geefhuysen, J., Anderson, R., Joffer, M. and Rabson, A. R: Leukocyte function in children with Kwashiorkor. Arch. Dis. Child. 1976;50:220.
- 76.- Seth, V. and Chandra, R. K: Opsonic activity, phagocytosis and bactericidal capacity of polymorphs in undernutrition, Arch. Dis. Child. 1972;47:282.
- 77.- Keusch, G. T. Douglas, S. D., Braden, K. and Geller, S. A: Antibacterial functions of Macrophages in experimental protein-calorie malnutrition. Infection. 1978;138:125.
- 78.- Schoffer, M. and Douglas, S. D: In vitro studies of lymphocytes from children with kwashiorkor. Clin. Immunol. Immunopathol. 1961;5:21.
- 79.- Pineda, O., Viteri, F. and Braham, J. E: Leukocyte Enzyme Adaptation to Low Protein-Calorie Diets. Fed. Proc. 1971;30:231.
- 80.- Pincus, S. H. and Klebanoff, S. J: Quantitative leukocytes iodination. N. Engl. J. Med. 1971;284:744.
- 81.- Chandra, R. K.: Serum Thymic hormone activity in protein-energy malnutrition Clin. Exp. Immunol. 1979;38:228.

- 82.- Martinez-Cairo C. S., Carmona, B. P., y Cruz, B. J:
Actividad del factor tímico sérico en niños recién
nacidos desnutridos. Arch. Invest. Méd. (Méx).
1985;16:199.
- 83.- Chandra, R. K.: T and B lymphocyte subpopulations and
leukocyte terminal deoxynucleotidyl transferase in
energy-protein malnutrition. Act. Pediatr. Scand.
1979;68:841.
- 84.- Chandra, R. K.: Interference of malnutrition with specif
immune response in the impact of malnutrition on immune
defense in parasitic infection. Helve. Pediatr. Acta.
1981;10:104.
- 85.- Chandra, R. K.: Immunocompetence as a functional index of
nutritional status. Br. Med. Bull. 1981;37:89.
- 86.- Symthe, P. M. and Schonland, R.: Thymolymphathic
deficiency and depression of cell-mediated immunity in
protein-calorie malnutrition. Lancet. 1971;2:939.
- 87.- Salimoni, L. S: The propetier of E rosette inhibitory
substance in the sera of malnoused children. Clin. Exp.
Immunol. 1982;47:626.
- 88.- Chandra, R. K.: Serum thymic hormone activity in protein-
energy malnutrition. Clin. Exp. Immunol. 1979;38:228.
- 89.- Olusi, S. O. and Thurman, G. B: Effect of thymosin on T-
lymphocyte rosette formation in children with
Kwashiorkor. Cli. Immunol. Immunophatol. 1980;15:687.
- 90.- Chandra, R. K.: Serum thymic activity and cell-mediate
immunity in healthy newborns, pre-term, and small-for

- gestation infants. *Pediatric*. 1981;64:86.
- 91.- Kulapongs, P. and Edelman, R: Defective local leukocyte mobilization in children with Kwashiorkor. *Am. Clin. Nutr.* 1977;30:367.
- 92.- Heyworth, B., Brown, J: Jejunal microflora in malnourished gambian children. *Arch. Dis. Child.* 1975;59:27.
- 93.- Chandra, R. K. and Bhurjala, R. A.: Elevated serum α_2 -fetoprotein and impaired immune response in malnutrition. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 1977;53:180.
- 94.- Chandra, R. K. Au, B.: Single nutrient deficiency and cell-mediate immune responses. *Am. J. Clin. Nutr.* 1980;33:736.
- 95.- Chandra, R. K.: Interactions of nutrition, infections and immune response. Immunocompetence in nutritional deficiency, metodological considerations and intervention strategies. *Acta. Ped. Scand.* 1979;68:137.
- 96.- Whittle, H. C., and Mee, J: Immunity to measles and malnourished children. *Clin. Exp. Immunol.* 1980;42:144.
- 97.- Martinez-Cairo, S., Alaniz, F., Sanchez, R., y Munoz, O: Linfocitos T periféricos formadores de rosetas, en niños con sarampión. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 1977;34:467.
- 98.- Askona, B. A.: T-cell differentiation and effector functions. *Immunology.* 1988;1:51-52.
- 99.- Anderson, C. L. and Looney, G. R.: Human leukocyte IgG Fc receptors. *Immunol. Today.* 1986;7:264.
- 100.- Unkeless, J. C. and Scingliano, E.: Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Ann. Rev.*

Immunol. 1988;6:251.

- 101.- Sinclair, N. R. and Panoskaltzis, A.: In mediators of immune regulation and immuthery. p. 169. Singhal, S.K. and Delovith, T.L.ed. Elsevier Science Publishers. 1986.
- 102.- Sinclair, R. N. and Panoskaltzis, A.: The immunoregulatory apparatus and autoimmunity. Immunol. Today. 1988;9:260
- 103.- Fernandez, G., H: Impairment of cell-mediated immunity funtions by dietary zinc deficiency in mice. Proc. Nath. Acad. Sci. 1979;76:457.
- 104.- Mahalanabis, D. and Jalan, K. N: Evidence for altered density characteristics of the peripheral blood lymphocytes in Kwashiorkor. Am. J. Clin. Nutr. 1979;32:992.
- 105.- Herbert, W. J.: Passive hemagglutination with special reference to the tanned cell technique.p. 20.1. Weir, D. M. Ed. Immunochemistry. Blackwell Scientific Publications, London. 1973.
- 106.- Buther, W. T.: Hemmagglutination studies with formalinized erythrocytes. Effect of bisdiazobenzidine and acid treatment on titation by soluble antigen. J. Immunol. 1973;90:663.
- 107.- Stanvistky, A. B.: Micromethods for the study of protein and antibodies. J. Immunol. 1974;72:360.
- 108.- Kwapinski, J. B.: Methodology of immunochemical and immunological research. p. 245. Wiley. Inetscience, Inc. New. York. 1972.

- 109.- Parath, J., Bennich, H.: Recycling chromatography. Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1982;1:152.
- 110.- Peterson, E. A.: Column chromatography of protein substituted cellulose. Academic Press New York. 1962;3:27.
- 111.- Boyum, A.: Ficoll-Hypaque for separationg mononuclear cells and granulocytes from human blood. p. 77. Scan. J. Clin. Lab. Invest. 1966.
- 112.- Janossy, G. M., Greaves, M. J. and Snajar, J: Lymphocyte activation. Clin. Exp. Immunol. 1973;14:581.
- 113.- Naeye, R. L., Dienet, M. M: Relation of and race to birth weight and organ cell structure in the newborn. Pediatr. Res. 1971;5:17.
- 114.- Moscatelli, P., Bricarelli, F. D: Defective immuno competence in foetal undernutrition. Helv. Pediatr. Act. 1976;15:687.