



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

***SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS CIRCULANTES EN NIÑOS
SEVERAMENTE DESNUTRIDOS***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

(BIOLOGIA)

P R E S E N T A

MARIA CRISTINA GONZALEZ TORRES

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL BETANCOURT RULE

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

	Pag.
I.- Antecedentes	
a) Aspectos generales de la desnutrición	1
b) Efectos de la desnutrición a nivel celular	6
c) Inmunología y desnutrición	10
d) Características de los linfocitos	14
II.- Justificación	18
III.- Objetivo	19
IV.- Hipótesis	19
V.- Material y Métodos	
Características de los niños estudiados	20
Procesamiento de las muestras	24
VI.- Resultados	26
VII.- Discusión	30
VIII.- Referencias bibliográficas	37
IX.- Anexos	43

I.- ANTECEDENTES

a) ASPECTOS GENERALES DE LA DESNUTRICION

La desnutrición calórico-proteica (DCP) es una enfermedad que afecta a cuando menos 100 millones de niños menores de 5 años en el mundo (Griesel y Richter, 1987), y representa en los países subdesarrollados uno de los principales problemas de salud pública. Estudios realizados en Latinoamérica revelan que la DCP es la responsable directa o indirecta, de más de un tercio de las muertes de niños de cero a cinco años de edad (Arrieta y Cravioto, 1982; Read, 1977). Otros datos muestran que en los países de Africa, entre 50 y 200 niños de cada 1000 nacidos vivos mueren, y de estos, aproximadamente el 60% corresponden a defunciones por neumonía o gastroenteritis agravadas por la desnutrición (Griesel y Richter, 1987).

Se conoce con el nombre de DCP al conjunto de síntomas y signos clínicos y bioquímicos que se observan en niños y adultos, a consecuencia de una deficiente ingestión y/o utilización de dietas de variados contenidos calóricos y bajo contenido protéico, lo que conduce finalmente a que las células del organismo no cuenten con las cantidades de nutrientes esenciales para realizar sus funciones metabólicas normales (Arrieta y Cravioto, 1982). Así mismo, la desnutrición se caracteriza por ser un estado de desequilibrio en el que el organismo requiere una mayor cantidad de nutrientes de los que recibe. Las causas de la misma pueden ser divididas en dos categorías: Primarias y Secundarias.

Dentro de las causas Primarias se encuentran aquellas que conducen a una deficiente alimentación (en calidad y/o cantidad), tales como pobreza e ignorancia, ésta última se relaciona directamente con la adquisición de malos hábitos alimenticios. Las causas

secundarias abarcan defectos a nivel metabólico que provocan excreción excesiva o absorción reducida de nutrientes (Gómez et al., 1956). En el Cuadro 1, se muestran las diferentes causas de la desnutrición, incluyendo ambas categorías.

Cualquiera que sea la causa, la nutrición inadecuada conduce a la disminución de las reservas tisulares o autofagia, fundamentalmente de tejido adiposo y muscular (Arrieta y Cravioto, 1982). Distintos órganos y tejidos sufren las consecuencias de la desnutrición a diferentes tiempos y velocidades, al parecer relacionadas con la cinética de proliferación celular, la cantidad y la tasa de síntesis de proteínas y con el papel de los nutrientes específicos en las vías metabólicas (Chandra, 1991 a).

Se han delimitado tres grados de desnutrición (Gómez et al., 1956), con características particulares que a continuación se describen:

Desnutrición de Primer Grado - Desnutrición moderada o que ha afectado por poco tiempo al organismo; el individuo que la padece presenta un déficit de peso corporal del 10 al 24% del correspondiente para su edad cronológica.

Desnutrición de Segundo Grado - Desnutrición más marcada que la anterior. Déficit de peso del 25 al 39% del promedio correspondiente para la edad del paciente, el cual frecuentemente requiere hospitalización.

Desnutrición de Tercer Grado (Severa) - Las reservas nutricionales del organismo están prácticamente agotadas, el déficit de peso es de más del 40% del promedio correspondiente para la edad. Se presentan serios cambios a nivel somático y funcional e

Cuadro 1. Causas de la desnutrición.

Incremento en las necesidades dietéticas (variación individual) crecimiento, enfermedad, embarazo, lactancia

Anorexia

Pobreza

DESNUTRICION

Ignorancia

Defectos congénitos:
Errores metabólicos,
defectos
gastrointestinales.

inclusive psicológicos. Los pacientes requieren hospitalización y la tasa de mortalidad para

estos, es mucho más elevada que para las dos categorías anteriores.

Es importante señalar el papel preponderante que tienen las infecciones en el desencadenamiento de los casos de desnutrición de tercer grado, ya que la infección por sí misma tiende a agotar la energía metabólica del organismo y de esta forma los individuos con desnutrición de segundo grado pueden pasar rápidamente a ser casos severos con alto riesgo de mortalidad. Además se ha determinado que la nutrición deficiente altera la respuesta inmune, y esto se asocia con una mayor prevalencia y gravedad de las infecciones (Chandra, 1980).

De la desnutrición de tercer grado, se conocen dos variantes: el Marasmo y el Kwashiorkor (llamado por algunos autores Síndrome Pluricarenal de la Infancia) (Behar e Icaza, 1972; Jelliffe, 1981).

La desnutrición de tipo Marasmo se debe fundamentalmente a una dieta baja, tanto en contenido proteico como en calorías, se presenta comúnmente durante el primer año de vida y se le llama Marasmo incipiente; no obstante llega a observarse incluso en adultos (Marasmo tardío) a causa del hambre.

El Kwashiorkor, palabra de origen africano que significa "enfermedad que aparece cuando se reemplaza a un niño por otro en el pecho materno", es producido por una dieta muy baja en proteínas, pero rica en carbohidratos. Usualmente se presenta entre el primer y tercer año de vida del niño (Jelliffe, 1981). En el cuadro 2 se enlistan los signos característicos de los tipos Kwashiorkor y Marasmo.

Cuadro 2. Signos característicos de las dos formas de desnutrición calórico-protéica severa: Kwashiorkor y Marasmo (Tomado de Manocha, 1972)

KWASHIORKOR

- Se presenta, en general, entre el primer y el tercer año de vida del niño
- Desgaste muscular poco evidente. Edema presente.
- La gravedad de la desnutrición no se refleja en el déficit de peso, pero el niño presenta talla baja para su edad.
- Pueden presentar manchas oscuras y descamación de la piel.
- Cambios prominentes en la textura, color, fuerza y resistencia del cabello.
- Usualmente el enfermo es apático de aspecto anoréxico, desinteresado de su ambiente y muy irritable
- Presentan gran retención de agua, pérdida de potasio y retención de sodio. El sodio reemplaza parcialmente al potasio intracelular.
- Reducción general de las proteínas plasmáticas, sobre todo de albúmina.
- Hígado agrandado y graso.
- Transporte de lípidos en sangre defectuoso. Nivel bajo de vitaminas liposolubles
- Los tejidos con recambio rápido de proteínas son los más afectados. Los niveles de aminoácidos libres en el plasma están disminuídos.
- Niveles bajos de vitaminas, hierro y cobre.

MARASMO

- Se presenta comúnmente en el primer año de vida.
- Gran desgaste muscular, con pérdida de peso hasta del 40%.
- Fuerte disminución en el peso y la talla del paciente.
- Generalmente sin cambios aparentes en la piel.
- Sin cambios importantes en las características del cabello
- Enfermos poco alertas, desinteresados e irritables.
- Pérdida de sodio, especialmente cuando hay complicaciones con diarrea.
- Disminución de las proteínas plasmáticas pero no tan notable como en el Kwashiorkor.
- Hígado de tamaño normal sin síndrome de hígado graso.
- El transporte de lípidos no es normal pero está menos afectado que en el Kwashiorkor.
- Mayor cantidad de aminoácidos libres en el plasma que en el Kwashiorkor.
- Las reservas de vitaminas y minerales descienden gradualmente.

Algunos autores consideran que en el Kwashiorkor, la única característica más

relevante presente es el edema, ya que el déficit de peso se observa sólo en las primeras etapas de la recuperación nutricional, cuando el edema comienza a desaparecer (Welcome-Trust, 1970).

En general el Marasmo predomina en las áreas urbanas en tanto que el Kwashiorkor prevalece en las áreas rurales, con tendencia a ser desplazado por el Marasmo a medida que disminuye la alimentación al seno materno (Arrieta y Cravioto, 1982).

Diversas investigaciones indican que niños que han presentado cuadros de desnutrición severa durante las primeras etapas de su vida, presentan en su capacidad intelectual, fisiológica y neuromuscular, un déficit de entre el 10 y el 25% con respecto a los niveles observados en los niños bien nutridos (eutróficos) (Manocha, 1972).

b) EFECTOS DE LA DESNUTRICION A NIVEL CELULAR

Los daños causados por la desnutrición se dan en primera instancia a nivel molecular y celular, por ésta razón los estudios en estas áreas son de vital importancia.

Durante las tres décadas anteriores se ha estudiado con gran detalle la importancia de la desnutrición en el desarrollo y el funcionamiento del cerebro, actualmente es claro que juega un papel determinante en el crecimiento y la organización funcional del sistema nervioso (SN). En humanos se determinó que al presentarse la desnutrición entre la concepción y los dos primeros años de vida, se produjeron daños en la función del cerebro, debido a que la DCP afectó adversamente la maduración del sistema nervioso central

(SNC) y su desarrollo funcional (Morgane et al., 1992), al alterar el desarrollo bioquímico del mismo, provocando disminución del número total de células y cambios en las proporciones de las mismas que existen normalmente en las diferentes regiones del cerebro (Castilla et al., 1979). Se propone que estos daños pueden traer como consecuencia diferentes grados de retraso mental (Galler, 1984).

Sin embargo, recientemente se reportó que se tienen muy pocas evidencias de que la DCP ocasione algún daño permanente a este nivel (DeLong, 1993). Morgane y colaboradores (1992) sugieren que para hacer una correcta evaluación de los efectos producidos por la desnutrición sobre el SNC, es necesario tomar en cuenta los siguientes factores: Primero, el tipo de desnutrición, si es producto de la carencia de proteínas o calorías, o bien, de la combinación de ambas. Segundo, el momento en el desarrollo biológico del organismo en el que se presenta (ya sea gestacional o postnatal). Tercero, la duración del cuadro de desnutrición. Cuarto, la severidad de la desnutrición, y Quinto, considerar otros factores ambientales, tales como las infecciones, que suelen aumentar la severidad de la desnutrición.

En ratas desnutridas durante la lactancia se observó reducción severa del crecimiento corporal, mientras que el crecimiento del cerebro fué considerablemente menos afectado, los autores señalan que esto indica que los recursos nutricionales se utilizaron primordialmente en el desarrollo del SNC (Forbes et al., 1977).

Por otra parte, al evaluar el daño genético causado por la desnutrición por medio del análisis de aberraciones cromosómicas (AC) en linfocitos de sangre periférica de niños, Armendares et al (1971) y Betancourt et al (1972) observaron una mayor frecuencia de AC en los niños desnutridos, que en los controles eutróficos en un estudio similar no

encontraron diferencia entre los grupos (Khouri y McLaren, 1973).

En médula ósea de ratas, se observó una mayor frecuencia de AC en los organismos desnutridos experimentalmente (Sadasivan y Raghuram, 1973; Vijayalaxmi, 1975); a diferencia de Betancourt et al (1979) quienes reportaron que no observaron diferencia en la frecuencia de AC entre ratas bien nutridas y ratas severamente desnutridas. A pesar de la variabilidad de los resultados obtenidos en los diferentes estudios, se observó que las frecuencias de AC fueron mayores en las células provenientes de organismos con DCP.

Así mismo, se ha estudiado el daño genético producido por la DCP, por medio de la evaluación frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH), en linfocitos de niños desnutridos. Mutchinick et al (1979) y González-Torres et al (1983) no encontraron diferencias entre los niños desnutridos y sus testigos bien nutridos. Pero por otro lado Murthy et al (1980) y Ortíz et al (1993) observaron una frecuencia de ICH significativamente mayor en los linfocitos de los niños desnutridos.

En animales desnutridos Murthy y Srikantia (1981) y Betancourt et al (1986) obtuvieron una mayor frecuencia de ICH en las células de los organismos desnutridos. Este daño aparentemente fué reversible ya que en ratas desnutridas durante la lactancia y recuperadas de la desnutrición durante 21 días, se observaron valores semejantes a los que se obtuvieron en las ratas bien nutridas (Betancourt et al, 1989). Posteriormente Ortíz y Betancourt (1990), reportaron que en ratas lactantes, a las que se sometió a tiempos de incorporación de bromodesoxiuridina que fluctuaron entre 25 y 40 horas, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Aunque existe variabilidad entre los datos obtenidos en diferentes estudios, al

analizar los valores es evidente que la frecuencia de ICH tiende a ser mayor en las células de los organismos a los que se ha inducido experimentalmente la DCP, que en los organismos eutróficos. Ya que existe heterogeneidad en los resultados que han obtenido diversos investigadores, al analizar AC e ICH Betancourt y Ortíz (1991) sugirieron que las diferencias podrían deberse a alguna o algunas de las siguientes causas: tipo de análisis estadístico utilizado, variables metodológicas tales como tiempo de cultivo, duración de la exposición de las células a la bromodesoxiuridina, dosis de la misma, tipo de desnutrición, y al tipo de estudio, si este se realizó in vivo o in vitro.

En otros estudios, donde se evaluó la velocidad de proliferación celular, Ortíz y Betancourt (1984) observaron retraso en la proliferación de las células de la médula ósea de ratas severamente desnutridas durante la lactancia. En linfocitos de niños con desnutrición de tipo Kwashiorkor, Murthy et al (1982) observaron también retraso, mientras que González et al (1990) reportaron una mayor velocidad de proliferación en las células de los niños desnutridos. Adicionalmente se determinó que la DCP, aumentó el tiempo de duración del ciclo de proliferación de las células, al afectar principalmente a las fases G2 y S; además, se determinó que la fase G2 es más sensible a la carencia de proteínas (Deo et al, 1975). Así mismo se observó, que al presentarse la desnutrición durante las etapas tempranas de la vida, se impidió la división celular, efecto que es irreversible; sin embargo, al actuar en estados juveniles o adultos se provocó la reducción del tamaño celular, del cual el organismo puede recuperarse (Winick y Noble, 1966).

c) INMUNOLOGIA Y DESNUTRICION

En el aspecto inmunológico, los primeros estudios realizados en organismos desnutridos mostraron una marcada disminución en el tamaño del timo (Vint, 1937; Trowell *et al.*, 1954; Watts, 1969). Este fenómeno había sido previamente observado en 1845 por Simon, quien llamó al timo "el barómetro de la desnutrición", debido a la sensibilidad de esta glándula al estado nutricional de los individuos (Chandra, 1991a).

En general tanto en el hombre como en animales de laboratorio, la DCP se manifiesta en la disminución del tamaño y peso del timo. El grado de atrofia observado dependerá de la edad en la que se presenta la desnutrición, así como de su duración (Mugerwa, 1971). A nivel histológico, en este mismo órgano, se ha observado pérdida en la diferenciación de las regiones cortical y medular, mostrando pocos linfocitos y cuerpos de Hassal alargados, degenerados y ocasionalmente calcificados. Aún cuando los efectos de la DCP sobre el timo son graves, no parecen ser permanentes ya que en pacientes que presentaron DCP y que posteriormente fueron sometidos a tratamientos nutricionales se obtuvo recuperación del tamaño y del peso del timo, hasta alcanzar los niveles normales (Hoffmann-Goetz, 1986).

Pero no sólo el timo presenta alteraciones, ya que se ha determinado que la DCP provoca daños en todo el tejido linfoide (Mugerwa, 1971). En el bazo se presenta disminución de las células linfoides alrededor de los capilares. En los ganglios linfáticos las áreas paracorticales dependientes del timo muestran un bajo número de linfocitos (Chandra, 1991a).

Aunado a lo anterior, se ha observado que la respuesta mediada por células en los

organismos con DCP, se halla considerablemente dañada, y que se manifiesta por la disminución en la reacción de hipersensibilidad retardada, en la baja respuesta in vitro de sus linfocitos a mitógenos, así como en la pobre actividad del complemento. Estas alteraciones suelen ser mucho más graves en los pacientes con Kwashiorkor que las que se han observado en los niños con Marasmo (Touraine y Gay, 1981; Chandra, 1991a).

Posiblemente la disminución de la respuesta inmune mediada por células en los niños con DCP se deba a la reducción en el número de linfocitos T maduros y totalmente diferenciados, lo que se traduce en la disminución en el número total de linfocitos circulantes. Mientras que la proporción de células "nulas" que corresponden a células inmaduras que no presentan las moléculas marcadoras de membrana de linfocitos T o B, está aumentada, así como la concentración de la enzima desoxinucleotidil-transferasa-terminal, la cual se presenta normalmente en las células de la médula ósea y del timo. Estos hallazgos sugieren el aumento de linfocitos T inmaduros circulantes en los niños desnutridos (Neumann et al., 1975; Chandra, 1979; Chandra, 1991a).

Se ha observado que los niños con Kwashiorkor presentan menos linfocitos T que los niños con Marasmo, y estos menos que los eutróficos. En cuanto a los linfocitos B, en niños desnutridos no infectados se presentaron porcentajes similares a los de niños bien nutridos, mientras que en niños desnutridos infectados el porcentaje fué significativamente mayor (Bang et al., 1975). En relación a las subpoblaciones de linfocitos circulantes en niños desnutridos se observó una disminución significativa en el número de linfocitos T cooperadores/activadores, T supresores/citotóxicos y T totales, pero la subpoblación más fuertemente alterada fué la primera, lo que posiblemente se debió a una diferenciación incompleta de los precursores de los linfocitos T (Chandra, 1983). Se ha determinado que estas anomalías fueron rápidamente revertidas cuando se sometió a los pacientes a

terapias de nutrición adecuada (Bang *et al.*, 1975; Chandra, 1983).

Una prueba que se utiliza para evaluar la capacidad funcional de las células T, y que correlaciona con la respuesta inmune mediada por células, es la respuesta de los linfocitos *in vitro* a mitógenos tales como la fitohemaglutinina (PHA) o la Concanavalina A (Roitt *et al.*, 1989). En individuos con desnutrición severa, los resultados a este nivel, al igual que en otras áreas como ya se ha señalado, son controversiales, ya que, como se comenta a continuación, algunos autores encuentran disminución, mientras que otros reportan aumento en la respuesta.

Smythe *et al.* (1971) reportaron que los pacientes con DCP presentaron mayor cantidad de linfocitos que no respondieron a la PHA. Raffi *et al.* (1977) mostraron que los cultivos de linfocitos de niños desnutridos incorporaron una cantidad de timidina tritiada significativamente mayor que los cultivos de linfocitos de niños bien nutridos, además de que observaron porcentajes normales de linfocitos B y disminución significativa de linfocitos T en los desnutridos.

En 1978 Beatty y Dowdle reportaron que el suero de niños con Kwashiorkor fué ineficiente para permitir que los linfocitos de niños eutróficos proliferaran normalmente *in vitro*, además, observaron que los linfocitos de los niños con Kwashiorkor respondieron de manera normal cuando se les cultivó con suero de adultos sanos. Por esto concluyeron que la función intrínseca de los linfocitos de pacientes con desnutrición de tipo Kwashiorkor es normal, y que los efectos de la desnutrición se observaron en la disminución de factores del plasma que son esenciales para la proliferación de los linfocitos. Otra posibilidad sería que este fenómeno se debiera a la presencia de factores en el suero que inhibieron su proliferación (Chandra, 1991a).

Empleando timidina tritíada Gorodezky *et al.* (1986), mostraron que en cultivos de linfocitos de niños con DCP en los que se utilizó plasma autólogo, se tuvo una baja respuesta al mitógeno, aún cuando en estos mismos niños no se observó disminución en el porcentaje de linfocitos circulantes.

Murthy y colaboradores (1982) utilizaron en cultivos de linfocitos de niños con Kwashiorkor marcaje con Bromodeoxiuridina (BrdU) y observaron aumento en la duración de su ciclo celular, sugirieron que esto se debió al incremento en la duración de alguna o algunas de las fases del ciclo de división, estos resultados parecen indicar que los linfocitos de estos niños presentaban algún problema intrínseco que les impidió responder adecuadamente a la PHA.

En otro estudio en que se utilizó también BrdU (González *et al.*, 1990) se apreció que la respuesta de los linfocitos de niños con desnutrición severa fué mayor que las de los eutróficos. Las evidencias que se tienen parecen indicar que su ciclo de proliferación es más corto, ya que al aplicar la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas se observó a 35 h de incubación prácticamente un 100% de células en primer ciclo, en ambos grupos, mientras que a 48 h el porcentaje de células en segundo ciclo fué de 50% para los desnutridos y de 21% para los eutróficos, lo que indica que aparentemente hay una mayor velocidad de proliferación en los linfocitos de los niños con DCP (Betancourt y González, 1986). Por otro lado, al comparar el índice de estimulación, que refleja la fracción de células que respondieron al mitógeno y por tanto que proliferaron en cultivo, fué similar entre niños eutróficos y niños con desnutrición que además presentaban algún tipo de infección, mientras que en los niños desnutridos que no presentaban infección, el índice de estimulación disminuyó conforme el tiempo de cultivo avanzó (Ortiz *et al.*, 1993).

Otro método que se ha utilizado para evaluar in vitro la respuesta de los linfocitos a la PHA, ha sido la cuantificación de la concentración de ADN a diferentes horas de incubación, para determinar el incremento de la población celular. Tello-López y colaboradores en un estudio de este tipo observaron que a pesar de haber iniciado los cultivos de los niños desnutridos y de los bien nutridos con el mismo número de leucocitos totales, al pasar el tiempo de cultivo la concentración de ADN fué mayor en todos los puntos de cosecha.

A diferencia de la respuesta a nivel celular, la inmunidad humoral es prácticamente normal en los niños con DCP (Neumann et al., 1975). En términos generales la respuesta de los anticuerpos séricos está prácticamente intacta en ellos. Mientras que la concentración de inmunoglobulina A después de que los niños son inmunizados con vacunas virales es muy baja, esto podría ser un factor importante de la elevada frecuencia de septicemias observadas en los niños desnutridos. El proceso de fagocitosis está afectado, así como los componentes del complemento están disminuídos, especialmente C3, C5, factor B y la actividad hemolítica total. En animales experimentales y en humanos se ha demostrado que la producción de varias citocinas, incluyendo a las Interleucinas 1 y 2, y el Interferón están también disminuidas en pacientes con DCP (Chandra, 1991b).

d) CARACTERISTICAS DE LOS LINFOCITOS

Los linfocitos se originan en los órganos linfoides primarios (timo y médula ósea) en grandes cantidades (aproximadamente 10^9 por día). Algunas de estas células migran vía circulación sanguínea hacia los órganos linfoides secundarios como el bazo y los ganglios

linfáticos. En promedio, una persona adulta posee 10^{12} linfocitos, y en total su tejido linfoide representa alrededor del 2% de su peso corporal total. Los linfocitos representan cerca del 20% del total de los leucocitos circulantes en un adulto y en niños aproximadamente el 40 %, muchos de ellos son de vida larga y pueden persistir como células de memoria por algunos años (Roitt et al., 1989).

El tamaño de los linfocitos varía de 6 a 12 μm , y presentan heterogeneidad morfológica, pudiendo observarse diferencias en la relación núcleo/citoplasma, en el grado de tinción del citoplasma con diversos colorantes y a nivel histoquímico en la presencia o ausencia de gránulos azurófilos. Los linfocitos al igual que otros leucocitos presentan una gran cantidad de moléculas marcadoras en su superficie, algunas de las cuales aparecen momentáneamente en etapas particulares de la diferenciación o de la activación celular. Los marcadores de membrana (proteínas) pueden usarse para distinguir a las diferentes poblaciones celulares y muchos de ellos pueden ser identificados por medio de anticuerpos monoclonales específicos. A estas proteínas de los linfocitos T se les ha llamado antígenos de diferenciación de células T (CD - cell differentiation). Dentro de estos antígenos se incluyen los siguientes: CD2 (T11 ó Leu-5), CD4 (T4 ó Leu-3), CD8 (T8 ó Leu-2) y el CD3 (T3 ó Leu-4) (Parnes, 1987; Roitt et al., 1989).

En primera instancia se han dividido a los linfocitos en dos subpoblaciones, la de linfocitos T y la de linfocitos B. Los linfocitos T expresan receptores para los eritrocitos de carnero, ellos son los responsables de la formación de rosetas cuando se ponen en contacto ambos tipos celulares, a estos receptores se le ha denominado antígenos CD2. El antígeno CD2 se encuentra en la superficie de todos los timocitos y en las células T maduras. Aproximadamente se encuentran 4×10^5 de estas moléculas en la superficie de los linfocitos T no activados, mientras que al producirse la activación celular esta misma

molécula se incrementa hasta un valor de 250×10^6 por célula (Parnes, 1987; Roitt et al., 1989).

Los linfocitos T, a su vez, pueden dividirse en dos distintas subpoblaciones dependiendo de la expresión de los antígenos CD4 y CD8, ambas proteínas se presentan en la mayoría de los timocitos, mientras que las células maduras expresan sólo una de ellas. La expresión del antígeno CD4 correlaciona con la función cooperadora/inductora, mientras que la expresión de CD8 con la función citotóxica/supresora. Aún cuando esta subdivisión es correcta generalmente los datos de muchos laboratorios indican que la expresión de estas moléculas de superficie correlaciona mejor con la clase de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) que son reconocidos por estas células T. En general, las células T que reconocen a las proteínas clase I del CMH expresan CD8, mientras que aquellas que reconocen las proteínas clase II expresan el antígeno CD4. Aún cuando las funciones de las proteínas CD4 y CD8 no se conocen, la relación entre su expresión y las propiedades de reconocimiento específico de las subpoblaciones de células T sugiere que deben estar involucradas en el proceso de reconocimiento inmunológico. La molécula CD8 se expresa en alrededor del 80% de los timocitos y en el 30% de los linfocitos periféricos (Parnes, 1987).

Así mismo, con base en las linfocinas que producen in vitro, a las células CD4 se les ha dividido en dos poblaciones las TH1 y TH2. Las CD8 se dividen en aquellas que reconocen antígenos en asociación con las moléculas del CMH y que producen IL-2 (y además manifiestan el antígeno CD28), el segundo grupo está formado por células que no reconocen a los antígenos en asociación con las moléculas del CMH, ni producen IL-2, éstas son además CD11b (Roitt et al., 1989).

El antígeno CD3 se manifiesta en todos los linfocitos T maduros, y se halla en estrecha asociación con el receptor para antígenos de la célula T. La aparición de esta molécula está relacionada con la adquisición de la competencia inmunológica de los timocitos en desarrollo. No se conoce con exactitud la función de la molécula CD3, sin embargo se sabe que los anticuerpos monoclonales que la reconocen inhiben la proliferación de las células T y la función efectora de las células T citotóxicas (Parnes, 1987).

Los linfocitos B representan entre el 5 y el 15% de los linfocitos circulantes, y se caracterizan por presentar insertas en su membrana plasmática inmunoglobulinas endógenas, las que actúan como receptores específicos de antígenos. La mayoría de las células B llevan antígenos del CMH clase II, y también receptores para las moléculas del complemento C3b y C3d. Los principales marcadores que se usan para identificar a los linfocitos B humanos son los antígenos CD19, CD20 y CD22, que son exclusivos de este tipo celular (Roitt et al., 1989).

II.- JUSTIFICACION

La desnutrición representa un serio problema de Salud Pública en países subdesarrollados, como lo demuestran diversos estudios. Estos permiten apreciar que provoca alteraciones a diversos niveles, en los organismos que la han padecido. Sin embargo, a nivel de daño genético o inmunológico, se observan resultados controversiales, por lo que es necesario obtener una mayor cantidad de información, para esclarecer las causas de la divergencia de los resultados obtenidos.

En este caso particular considerando que en un estudio previo (González, et al., 1990) encontramos que los linfocitos de niños desnutridos estimulados con PHA presentaron una proliferación más activa que los linfocitos provenientes de niños eutróficos, se consideró analizar las subpoblaciones de linfocitos circulantes en niños desnutridos esperando encontrar diferencias entre ellas que permitieran explicar la respuesta a la PHA observada in vitro .

Lo que permitirá, contribuir al conocimiento de los efectos de la DCP sobre las diferentes subpoblaciones de linfocitos circulantes.

III.- OBJETIVO

El objetivo fundamental de este trabajo consistió en analizar en muestras de sangre periférica de niños con DCP, para evaluar, la proporción de células que corresponden a las siguientes subpoblaciones de linfocitos:

T totales (T11)

B totales (B1)

T cooperadores / activadores (T4)

T supresores / citotóxicos (T8)

T inmunocompetentes (T3)

Adicionalmente, debido a que los niños con DCP presentan generalmente infecciones asociadas se pretende analizar el posible efecto de ellas sobre la proporción de las subpoblaciones de linfocitos circulantes. Se propone una revisión similar con respecto a los medicamentos que se les administraban a los niños al momento de la toma de la muestra.

IV.-HIPOTESIS

Debido a que en un estudio previo se apreció una alta proliferación en los cultivos de linfocitos de niños desnutridos, se espera observar una alta proporción de linfocitos T en estos, incluso posiblemente mayor que en los niños eutróficos.

V.- MATERIAL Y METODOS

CARACTERISTICAS DE LOS NIÑOS ESTUDIADOS

Se tomó una muestra de sangre a 10 niños que presentaban DCP tipo Marasmo (Cuadro 3), seis de ellos del sexo femenino y cuatro del sexo masculino, sus edades estuvieron comprendidas entre los 6 y los 45 meses. Presentaron déficit de peso entre el 37 y el 62% del esperado para su edad. Todos presentaban algún tipo de infección: gastrointestinal, respiratoria, neurológica o de vías urinarias, o bien, en algunos casos combinaciones de ellas, tres de los niños no se encontraban tomando medicamentos al momento de la toma de la muestra (Cuadro 4). El número de leucocitos fluctuó en estos niños de 3.9 a 21.4 X 10⁶/ml de sangre.

Cuadro 3. Características de los niños con DCP al momento de la toma de la muestra.

Muestra	Sexo	Edad (meses)	*Peso Kg	% Déficit de peso	Leucocitos 10 ⁶ /ml
**JPR	M	6	2.7	60	3.9
HMD	M	6	4.8	38	7.9
NHS	M	6	3.6	54	21.4
CCM	F	7	3.3	58	7.7
AST	F	7	3.8	48	5.0
ART	F	9	4.5	39	10.7
**ECA	F	11	3.3	62	4.2
JML	M	15	6.8	37	12.2
AVG	F	16	6.4	39	7.8
**GMS	M	45	8.8	44	ND

* Peso al momento de la toma de la muestra.

** Todos los niños a excepción de estos tres se encontraban tomando antibióticos.

ND No determinado

Cuadro 4. Infecciones presentes y medicamentos administrados a los niños con DCP, al momento de la toma de la muestra.

Muestra	Infecciones	Medicamentos
JPR	Moniliasis oral amibiasis y gastroenteritis bacteriana	Sin medicamentos
HMD	Colitis amibiana	Metronidazol, fumarato ferroso
NHS	Meningoencefalitis	Ampicilina, cloranfenicol, dexametasona
CCM	Neuroinfección, bronconeumonía, faringitis	Penicilina sódica
AST	Gastroenteritis infecciosa	Metronidazol, amikacina, cimetidina
ART	Bronconeumonía, amibiasis, infección en vías urinarias	Penicilina sódica, metronidazol, trimetropin sulfametoxazol
ECA	Gastroenteritis bacteriana	Sin medicamentos
JML	Gastroenteritis	Ampicilina, sulfato ferroso, acetaminofén
AVG	Amibiasis	Metronidazol
GMS	Faringitis	Sin medicamentos

Para el grupo de comparación, se colectaron 23 muestras de niños eutróficos clínicamente sanos, 16 de sexo femenino y 7 de sexo masculino (Cuadro 5). La edad de las

niñas osciló entre los 6 y los 24 meses, y la de los niños, entre 6 y 19 meses. Estos niños fueron considerados como eutróficos, por presentar el peso y la talla esperados para su edad cronológica (Ramos-Galván, 1975). El número de leucocitos fluctuó en ellos, entre 5.7 a 15.4 X 10⁶/ml de sangre. Al momento de la toma de la muestra ninguno presentaba infecciones ni se encontraban tomando medicamentos.

El diagnóstico del estado nutricional y del estado de salud de los niños fué proporcionado por los médicos de la Clínica 31 del IMSS y del Hospital Pediátrico "Iztacalco" del DDF, quienes proporcionaron las muestras para la realización del estudio.

Cuadro 5. Características de los niños eutróficos al momento de la toma de la muestra. Se presentan los datos agrupados por edades, en los casos en que se tenía más de un niño de la misma edad se calcularon promedios y desviaciones estándar.

Sexo femenino				
Edad (meses)	n	Peso (Kg)	Talla (cm)	Leucocitos 10^6 /ml
6	4	7.7 ± 0.4	64 ± 5.2	8.4 ± 1.1
7	1	8.5	70	11.2
12	4	9.6 ± 0.1	75 ± 4.2	6.8 ± 1.1
14	2	9.9 ± 0.1	81 ± 4.9	10.1 ± 2.2
18	3	10.9 ± 1.1	83 ± 2.5	6.6 ± 1.2
23	1	13.0	85	5.7
24	1	12.8	82	8.3
Sexo masculino				
Edad (meses)	n	Peso (Kg)	Talla (cm)	Leucocitos 10^6 /ml
6	1	7.8	59	7.7
7	2	8.5 ± 0.1	62 ± 0.5	14.9 ± 0.7
10	1	9.0	68	7.3
18	2	11.7 ± 0.3	82 ± 3.5	ND
19	1	11.2	80	8.4

n Número de niños
 ND No determinado
 ± D.E.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Tanto a los niños con DCP como a los niños eutróficos se les extrajeron aproximadamente 3 ml de sangre periférica con jeringas previamente heparinizadas, e inmediatamente se realizó el conteo de leucocitos totales en una cámara de Neubauer.

A partir de estas muestras se aislaron los linfocitos de la siguiente manera: en un tubo de centrifuga se colocó el gradiente de densidad linfograd (Microlab) la sangre obtenida de cada uno de los niños se diluyó con medio McCoy 5a modificado (Microlab) en proporción 1:1, Esta suspensión celular se puso cuidadosamente en el tubo de centrifuga que contenía el linfograd. Se procedió a centrifugar durante 30 min a 1500 rpm en una centrifuga (marca Jouan). Los linfocitos aislados se resuspendieron en el medio de cultivo antes señalado, con el cual se lavaron dos veces más, centrifugando a 1 500 rpm durante 10 min, en cada uno de ellos. Las células obtenidas se llevaron a un volumen de 3 ml con medio de cultivo, de esta suspensión celular se hicieron cinco alícuotas de 600 μ L cada una en tubos para microcentrifuga. Las alícuotas se centrifugaron durante 10 min para retirar el sobrenadante, y las células se pusieron en contacto con 200 μ L de la solución concentrada (Anexo 1) de anticuerpos monoclonales (Coulter), para identificar las siguientes subpoblaciones de linfocitos:

T totales (T11)

B totales (B1)

T cooperadores / activadores (T4)

T supresores / citotóxicos (T8)

T inmunocompetentes (T3)

Las células se mantuvieron en estas condiciones durante 30 min a 4°C. Transcurrido este tiempo se lavaron con un ml de una solución de suero fetal de bovino (SFB) al 2% preparada en solución buffer de fosfatos (PBS) (Anexo 2) . Por último, las células se mantuvieron durante otros 30 min a 4°C en 200 μ L de una solución al 2% de anticuerpo anti-IgG de ratón, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma) (Anexo 3). Se lavaron dos veces con PBS y finalmente se fijaron con una solución de formaldehído al 10% preparada en PBS.

Se hicieron preparaciones de la suspensión celular y se observaron al microscopio de epifluorescencia (Zeiss). Se contaron 100 células consecutivas, clasificándolas en positivas o negativas, para cada uno de los anticuerpos utilizados. Los resultados del análisis de las subpoblaciones fueron comparados con la prueba U de Mann-Whitney (Zar, 1984). Por otra parte, con la finalidad de establecer en cada subpoblación, si alguno o algunos de los valores observados en los datos de los niños desnutridos era estadísticamente diferente a los otros de este mismo grupo, se utilizó la prueba de "Z" (Spiegel, 1984).

VI.- RESULTADOS

El déficit de peso de los niños desnutridos fué calculado, comparando el de cada niño con el peso promedio reportado para una población de niños mexicanos (Ramos-Galván, 1975). Aún cuando algunos de ellos no presentaban el 40% de déficit (Cuadro 3) para ser clasificados como desnutridos severos o de tercer grado (Gómez *et al.*, 1956), fueron considerados para la realización del estudio debido a que presentaban los signos característicos de desnutrición tipo Marasmo.

El número de leucocitos totales fué normal en ocho de los niños desnutridos (Cuadro 3), mientras que en las muestras de JPR y ECA los valores estuvieron por debajo de lo esperado, ambos niños se caracterizaron por ser los que presentaban el mayor déficit de peso del grupo.

Respecto al número de leucocitos totales en los niños eutróficos, los valores se encontraron dentro del intervalo normal, de acuerdo a lo reportado por el IMSS para la población mexicana. El número de leucocitos en los niños durante su primer año de vida puede fluctuar entre 9 y $30 \times 10^6/\text{ml}$, después y hasta los cinco años de edad los valores fluctúan entre 6 y 18×10^6 leucocitos/ml (Laboratorio Clínico. IMSS, 1973).

Los resultados del análisis de las subpoblaciones de linfocitos por medio de los anticuerpos monoclonales, para los niños con DCP se muestran en el Cuadro 6 y los datos agrupados de los niños eutróficos en el Cuadro 7. La proporción de linfocitos T totales (Fig. 1), en los niños eutróficos fluctuó entre 59 y 89%. En los desnutridos se observó una dispersión semejante sin diferencia estadística significativa ($p > 0.05$), apreciándose sólo la muestra de un niño desnutrido (ART) ubicada en el extremo inferior de la dispersión con

un 42%. Al aplicar la prueba de "Z" se encontró que este valor fué estadísticamente diferente de los del resto de este grupo de niños ($p < 0.001$). Con respecto a los linfocitos B totales (Fig. 2) en los eutróficos se obtuvo una variación del 1 al 7%, sin diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) con respecto a la de los niños desnutridos que fué del 2 a 9%.

Cuadro 6. Resultados del análisis de las subpoblaciones de linfocitos por medio de anticuerpos monoclonales, en los niños con DCP tipo Marasmo.

Muestra	Anticuerpo				
	T11	B1	T4	T8	T3
	Porcentaje de células				
JPR	86	2	45	21	67
HMD	79	9	71	12	66
NHS	72	4	44	18	60
CCM	86	2	51	25	ND
AST	84	2	65	9	82
ART	42@	6	20ç	16	38
ECA	80	7	62	50*	25*
JML	80	3	56	43	84
AVG	74	2	51	7	68
GMS	81	ND	60	19	77

@ $p < 0.001$; ç $p < 0.01$; * $p < 0.05$

Los valores señalados con estos símbolos resultaron ser diferentes a nivel estadísticamente significativo, al compararlos con los otros datos de la misma subpoblación de linfocitos.(Prueba de "Z")

Cuadro 7. Datos obtenidos del análisis de las subpoblaciones de linfocitos en los niños eutróficos (datos agrupados).

Anticuerpos					
T 11		B 1		T 4	
%	n	%	n	%	n
59-63	1	1-2	11	48-52	7
64-68	2	3-4	8	53-57	5
69-73	3	5-6	2	58-62	2
74-78	3	7-8	2	63-67	6
79-83	7			68-72	2
84-88	4			73-77	1
89-92	3				

Anticuerpos					
T 8		T 3			
%	n	%	n		
10-14	9	61-68	6		
15-19	7	69-73	5		
20-24	3	74-78	4		
25-29	2	79-83	5		
30-34	1	84-88	2		
35-39	1	89-93	1		

% Porcentaje de células
n Número de niños

Las células T4 (Fig. 3) en los niños eutróficos fluctuaron entre 48 y 73% y en los desnutridos entre 20 y 71%. Aunque no hubo diferencia estadística entre ambos grupos, se apreció que un niño desnutrido (ART) presentó un porcentaje muy bajo (20%) de estos linfocitos, este valor resultó ser estadísticamente diferente a los otros del grupo. La proporción de linfocitos T8 (Fig. 4) varió en los eutróficos entre 10 y 37%, siendo semejante en los desnutridos, aún cuando se observó que el niño ECA de este último grupo presentó un valor diferente (50%) a nivel estadístico ($p < 0.05$). Finalmente, las células T3 (Fig. 5) presentaron una distribución semejante en ambos grupos, observándose en un niño desnutrido (ECA) un porcentaje muy bajo (25%), que al ser comparado con los otros de esta misma población mediante la prueba de "Z" mostró ser diferente a nivel estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

En el Cuadro 8 se muestran los valores promedio que correspondieron a cada subpoblación para los dos grupos de niños estudiados, con sus desviaciones estándar. Como ya se señaló anteriormente no se encontró diferencia estadística ($p > 0.05$), al aplicar la prueba U-Mann Withney para analizar los datos de manera grupal.

Cuadro 8. Valores promedio que correspondieron a cada subpoblación, para los dos grupos de niños estudiados.

	Niños Desnutridos	Niños Eutróficos
Anticuerpos		
T11	76.4 ± 12.9	79.1 ± 8.2
B1	4.1 ± 2.6	3.1 ± 1.7
T4	52.5 ± 14.3	48.4 ± 7.7
T8	22 ± 14.1	18.4 ± 6.8
T3	63 ± 19.8	74.9 ± 7.6

VII.- DISCUSION

Para realizar este trabajo se utilizaron únicamente muestras de niños con DCP tipo Marasmo, debido a que los hospitales en que se colectaron las muestras están ubicados en el área urbana del Distrito Federal, y en esta zona, como lo mencionan Arrieta y Cravioto (1982) la forma de desnutrición severa predominante es precisamente el Marasmo.

En el laboratorio, el primer aspecto que se analizó en las muestras de sangre, fué el determinar en ellas el número de leucocitos totales, esto mostró que hay dos niños (JPR y ECA) con una concentración baja de glóbulos blancos (3.9 y $4.2 \times 10^6/\text{ml}$ respectivamente). Estos niños como se mencionó en los resultados se caracterizaron por presentar el mayor déficit de peso y además por no estar recibiendo medicamentos al momento en que se les tomó la muestra de sangre. En 1990 Campbell y Hawley señalan que valores de 3.5 a $4 \times 10^6/\text{ml}$ se observan frecuentemente en pacientes desnutridos no infectados y en pacientes con problemas hepáticos. Sin embargo, la disminución del número de leucocitos en el torrente sanguíneo (ó leucopenia) resulta ser una condición muy poco usual en individuos infectados, ya que la mayoría de las enfermedades infecciosas provocan un aumento en el número de leucocitos circulantes (leucocitosis) (Dacie y Lewis, 1991). Por esto es notorio el que aún cuando los niños estudiados en el presente trabajo estaban infectados, tengan un número de leucocitos menor, o bien, semejante al de los niños eutróficos. Este hecho podría estar indicando que los niños desnutridos presentan alteraciones a nivel de la médula ósea, ya que es a partir de ella que se generan los leucocitos. Otra razón por la cual hay un número bajo de leucocitos en estos niños, cuando debiera estar aumentado, podría atribuírse también a los medicamentos que se les administraban, algunos de los cuales se sabe que tienen la propiedad de disminuir el

recuento leucocítico, tales como: metronidazol, ampicilina, penicilina, cloranfenicol y trimetoprim sulfametoxazol (Hamilton y Rose, 1987).

En relación a las proporciones de las diferentes subpoblaciones de linfocitos circulantes se observó que son semejantes entre los niños desnutridos infectados y los niños eutróficos. Los valores obtenidos muestran intervalos de variación bastante amplios, en algunas de las subpoblaciones. Sin embargo, como puede apreciarse en el Cuadro 9, semejantes a los reportados por otros autores, Chandra (1979, 1983) utiliza como controles niños eutróficos, mientras que en el resto de los estudios los valores fueron obtenidos en adultos sanos. Bang *et al.* (1975) señalan que utilizaron muestras de adultos sanos para compararlas con las de los niños desnutridos, ya que comparativamente, no encontraron diferencia con los valores obtenidos en muestras de niños sanos. No obstante se considera que las variaciones observadas entre un laboratorio y otro, no son limitantes para utilizar el análisis de las subpoblaciones de linfocitos como una prueba confiable, ya que es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores normales (Karbowski y Appel, 1988).

Aún cuando a nivel de los grupos de niños estudiados no se encontraron diferencias estadísticas, en la distribución de los datos de los niños con DCP se observa la presencia de valores extremos, con porcentajes bajos como en las subpoblaciones T11 y T4, o bien con valores altos como en los linfocitos T8, lo que parecería indicar una diferente susceptibilidad individual a presentar alteraciones en las proporciones de las diferentes subpoblaciones de linfocitos circulantes en esos niños. Los pacientes ECA y ART fueron los únicos que presentaron alteraciones significativas en sus subpoblaciones y no fué posible establecer una relación alguna entre ambos pacientes, que permitiera señalar a un factor común, como el responsable de las alteraciones observadas.

Cuadro 9. Proporciones de las diferentes subpoblaciones de linfocitos presentes en muestras de individuos clínicamente sanos. Bang *et al.*, (1975) reportan intervalos, mientras que en los otros trabajos se proporcionan valores promedio, y las respectivas desviaciones estándar.

	Bang <i>et al.</i> 1975	Chandra, R.K. 1979	Chandra, R.K. 1983	Weitblen et al. 1988
T11	65 - 70	73.7 ± 2.8	75 ± 1.9	80 ± 8
B1	30 - 35	4.0 ± 0.7	11 ± 0.9	19 ± 8
T4	-----	-----	46 ± 5.1	44 ± 8
T8	-----	-----	21 ± 3.4	24 ± 6
T3	-----	-----	-----	69 ± 12

	Karbowiak y Appel 1988	Reichert <i>et al.</i> 1991	González 1993
T11	-----	-----	79.1 ± 8.2
B	-----	14 ± 4.2	3.1 ± 1.7
T4	50 ± 10	43 ± 7.5	48.4 ± 7.7
T8	21 ± 7	33 ± 7.5	18.4 ± 6.8
T3	60 ± 12	73 ± 6.2	74.9 ± 7.6

Los datos de uno de los pacientes desnutridos (ART) correlacionan con lo reportado anteriormente (Chandra, 1979; Chandra, 1983), donde se observó en los niños desnutridos una disminución de aproximadamente el 46% de los linfocitos T totales, con una reducción preferencial de linfocitos T4, el autor atribuye este efecto a que la desnutrición provoca daños al timo, lo que impide la maduración de los linfocitos T en general. En ambos estudios, a diferencia del presente trabajo, se utilizaron muestras de niños desnutridos no infectados. Sin embargo, como lo señalan Bang y colaboradores (1975) las infecciones no determinaron mayores diferencias en la proporción de las subpoblaciones de linfocitos circulantes y al parecer éstas alteraciones numéricas se producen como un efecto de la desnutrición por sí misma, ya que en pacientes desnutridos infectados se advirtió también disminución en el porcentaje de linfocitos T circulantes, obteniéndose valores más bajos en los pacientes que presentaban desnutrición de tipo Kwashiorkor (Linfocitos T - 34%), mientras que en los marasmáticos (Linfocitos T - 44%) la reducción fué menos drástica.

Las alteraciones numéricas en las subpoblaciones de linfocitos en dos niños desnutridos se podrían tratar de explicar al analizar el efecto que tienen las infecciones y los medicamentos sobre ellas. Así, un aumento en la proporción de linfocitos T8 se ha observado en pacientes con amibiasis, además de disminución de los linfocitos T totales (Ganguly *et al.*, 1981; Ortíz-Ortíz *et al.*, 1990), esta alteración se apreció en el niño ECA, quien no fué diagnosticado con este tipo de infección, pero no se podría descartar la posibilidad de que presentara la infección sin tener manifestaciones clínicas de la misma, en el momento de la toma de la muestra.

Por otro lado, se ha observado disminución en el porcentaje de linfocitos T4 en infecciones por hongos (Bova *et al.*, 1991), sin embargo en ART, que es el paciente que

presenta una notoria disminución de este tipo de linfocitos, no se establece en su expediente que tenga infección de este tipo.

En lo referente al papel de otros tipos de infecciones sobre las proporciones de linfocitos se ha observado que en un estado grave de meningitis se produce un fuerte aumento en la proporción de células T4 (Bamborschke et al., 1990), mientras que la infección por estafilococo provoca disminución de los linfocitos T11 y T8, sin embargo, ninguno de estos efectos pudo ser apreciado en los niños estudiados. En relación al papel de los antibióticos Sugiyama y colaboradores (1990) mencionan que la eritromicina provoca aumento en la proporción de linfocitos T8, mientras que otro antibiótico usado en casos de infecciones de vías respiratorias (Valcke et al., 1992) provoca disminución en la cantidad de leucocitos circulantes, así como incremento en el porcentaje de linfocitos T11 y T4.

El que no se manifiesten las alteraciones esperadas en los niños desnutridos estudiados, como es el aumento en la proporción de los diferentes tipos de linfocitos en casos de amibiasis y meningitis, podría atribuirse a alteraciones de la médula ósea, que le impiden producir células, a partir de las cuales se originaran los linfocitos. Mientras que no observar disminución de las subpoblaciones esperadas en niños con amibiasis (linfocitos T11) o en el niño infectado por hongos (T4), tal vez se deba a que hasta el momento en que se tomaron las muestras no se había producido la variación.

Con respecto a esto, el que los niños con DCP presenten deficiencias nutricionales múltiples y además infecciones, a las que habría que sumar los medicamentos que en ocasiones les son administrados, dificulta el establecer claramente el efecto de cada deficiencia nutricional específica ó de las infecciones sobre los componentes de la

inmunidad celular.

En el presente estudio ocho niños con DCP tipo Marasmo, no mostraron alteraciones en la proporción de las subpoblaciones de linfocitos circulantes, lo que indica, en primera instancia, que no hay deficiencias en el proceso de maduración linfocitaria en ellos. Esto es muy importante debido a que apoya los resultados que previamente hemos obtenido con respecto a su proliferación, ya que, aún cuando los linfocitos de los niños desnutridos han sido cultivados en presencia de plasma autólogo, se ha obtenido una mayor respuesta a la PHA que en los linfocitos de niños eutróficos (González *et al.*, 1990), porque se sabe que sólo los linfocitos diferenciados tienen la capacidad de responder a mitógenos (Stites *et al.*, 1985). Los resultados del presente trabajo permiten establecer que la proliferación observada en los cultivos de los niños desnutridos se efectúa por células diferenciadas. Aún cuando estos resultados no explican el porque se tiene una proliferación mas activa en los cultivos de los niños desnutridos, sí es posible correlacionar esta con un alto número de células maduras como era lo esperado. Sin embargo, es claro que los niños desnutridos presentan alguna alteración inmunológica que los hace mas susceptibles a infecciones, y por esto se podría sospechar en ellos la existencia de problemas inmunoregulatorios, que no están relacionados con la proporción de células que manifiestan antígenos que permiten identificarlas como linfocitos maduros circulantes. Esta sospecha se ha estado confirmando recientemente, ya que en un estudio en el que se están haciendo corrimientos electroforéticos de medios condicionados por linfocitos de niños desnutridos infectados y de niños eutróficos infectados, se ha observado que los desnutridos producen una menor cantidad de factores.

En otro orden de ideas y para tratar de explicar el porque de las diferencias del los resultados del presente trabajo y los de otros investigadores, se ha establecido que los

estudios en niños desnutridos, a nivel de la proliferación de sus linfocitos in vitro, parecen ser contradictorios, sin embargo, no es sólo en este tipo de estudios en los que se ha observado divergencia. Hoffman-Goetz (1986) analiza la deficiencia de nutrientes específicos sobre la capacidad de los linfocitos de responder a mitógenos, y menciona que existen también controversias, por ejemplo, la deficiencia de Zinc parece tener efectos sobre su proliferación, ya que en linfocitos humanos (Cunningham-Rundles et al., 1979) y en linfocitos de animales de laboratorio (Carlomagno y McMurray, 1983; Despasquale-Jardieu y Fraker, 1979) se observó una marcada disminución de la mitogénesis de sus linfocitos T in vitro. En contraste, Kramer (1984) reportó que los linfocitos de bazo de ratas alimentadas con dietas deficientes en Zinc mostraron una respuesta a mitógenos equivalente, y en algunos casos, aumentada significativamente, cuando se les comparó con animales controles. Con respecto a la deficiencia de Cobre, los resultados son ambiguos, Lukasewycs y Prohaska (1983) reportaron disminución en la respuesta a mitógenos de los linfocitos de ratones alimentados con dietas deficientes en este elemento, mientras que Vyas y Chandra (1983) encontraron respuestas semejantes a la PHA en linfocitos de rata, entre un grupo deficiente en Cobre y otro control alimentado ad libitum.

Los resultados obtenidos en diversos estudios muestran que las manifestaciones tanto en los niños con DCP, pueden ser heterogéneas cuando se analiza una cierta característica, ya sea inmunológica, genética, o bioquímica. Esto muestra que posiblemente existe: a) Variabilidad en la forma en que responden los organismos ante los estímulos de la DCP, b) Factores étnicos o costumbres, que pudieran influir en el tipo de alimentos que se consumen, o bien, c) Divergencias en los diseños experimentales utilizados por diferentes investigadores, siendo determinante las características de los niños que son incluidos en los estudios (por ejemplo: presencia o ausencia de infecciones, déficit de peso, etc.). Las infecciones son factores que no han sido suficientemente evaluados y que incluso

habría que retomar su análisis para poder determinar su papel en los fenómenos observados.

VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Armendares, S.; Salamanca, F. y Frenk, S. 1971. Chromosomal abnormalities in protein calorie malnutrition. *Nature* 232: 271- 273.

Arrieta, R. y Cravioto, J. 1982. Clínica de la desnutrición protéico-calórica de la infancia. Manuscrito proporcionado por los autores.

Bang, B.; Mahalanabis, D.; Mukherjee, K. y Bang, F. 1975. T and B lymphocyte rosetting in undernourished children. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 149: 199-202.

Beatty, D.W. y Dowdle, E.B. 1978: The effects of kwashiorkor serum on lymphocyte transformation in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 32: 134-143.

Behar, M. e Icaza, S. 1972. Nutrición. Interamericana. México. pp 130-147.

Betancourt, M.; De la Roca, J. M.; Saénz, M. E.; Díaz, R. y Cravioto, J. 1972. Aberraciones cromosómicas en desnutrición protéico-calórica avanzada. *Bol. Med. Hosp. Inf. (Mex.)* 29: 517-524.

Betancourt, M.; Hernández, G. y Cravioto, J. 1979. *Rev. Invest. Clin. (México)* 31: 46-52.

Betancourt, M.; Balvanera, P. y Ortiz, R. 1986. Frequency of sister-chromatid exchange (SCE) in bone marrow cells of severely malnourished animals during early life. *Mutat. Res.* 175: 29-31.

Betancourt, M. y González, M.C. 1986. Estudio de la proliferación celular en las primeras horas de cultivo de linfocitos de niños desnutridos. IX Congreso Nacional de Genética Humana. Puebla, Pue.

Betancourt, M.; Ortíz, R.; Gómez, J. L.; Hernández, M. E. y Cravioto, J. 1989. Effect of renutrition on cellular proliferation and SCE in bone marrow cells from malnourished rats. *Nutr. Rep. Int.* 40: 959-964.

Betancourt, M. y Ortiz, R. 1991. Efectos de la desnutrición severa en el nivel citogenético. *Ciencia* 42: 367-373.

Bova, A.J.; Mistschenko, A.S.; Palacios, M.F.; Estévez, M.E.; Tirabochi, N.I.; Sen, L.; Negroni, R. y Diez, R.A. 1991. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidiodomycosis. *Micr. and Immunol.* 35(3): 167-174.

Campbell, J. y Hawley. 1990. *Clinical diagnosis by laboratory methods.* W.B. Saunders Company. Philadelphia.

Carlomagno, M.A. y McMurray, D.N. 1983. Chronic zinc deficiency in rats: Its influence on some parameters of- and cell- mediated immunity. *Nutr. Res.* 3: 69-78.

Castilla, L.; Cravioto, A. y Cravioto, J. 1979. Efectos a corto plazo de la interacción estimulación- desnutrición proteico-calórica sobre el desarrollo bioquímico del SNC. *Gaceta Médica de México* 115 (5): 225-233.

Chandra, R.K. 1979. T and B lymphocyte subpopulations and leukocyte terminal deoxynucleotidyl-transferase in energy-protein undernutrition. *Acta Paediat. Scand.* 68: 841-845.

Chandra, R.K. 1980. *Inmunología de los trastornos nutricionales. El Manual Moderno.* México. pp. 1-48.

Chandra, R.K. 1983. Numerical and functional deficiency in T helper cells in protein energy malnutrition. *Clin.Exp.Immunol.* 51: 126-132.

Chandra, R.K. 1991a. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 1087-1101.

Chandra, R.K. 1991b. Immunocompetence is a sensitive and functional barometer of nutritional status. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.* 374: 129-132.

Cunningham-Rundles, L.C.; Cunningham-Rundles, S.; Garofals, J.; Iwwata, T.; Incefy, G.; Twomey, J. y Good, R.A. 1979. Increased T lymphocyte function and thymopoietin followin zinc repletion in man. *Fed. Proc.* 38: 1222-1225.

DeLong, G.R. 1993. Effects of nutrition on brain development in humans. *Am. J. Clin. Nutr. Suppl.* 1993. 57: 286S-290S.

Deo, M.; Bijlani, V. y Ramalingaswami, V. 1975. Nutrition and cellular growth and development. En *Growth and Development of the brain.* Editado por M.A.B. Brazier. Raven Press. New York, pp. 1- 15.

Despasquale-Jardieu, P. y Fraker, P.J. 1979. The role of corticosterone in the loss of immune function in the zinc- deficient A/J mouse. *J. Nutr.* 109: 1847-1855.

Forbes, W.B.; Tracy, C.; Resnick, O. y Morgane, P.J. 1977. Effects of maternal dietary protein restriction on growth of the brain and body in the rat. *Brain. Res. Bull.* 2: 131-135.

Galler, J.R. 1984. The behavioral consequences of malnutrition in early life, en: *Nutrition and Behavior*, editado por J.R. Galler. Plenum Press. New York. pp. 61-118.

Gómez, F.; Ramos-Galván, R.; Frenk, S.; Cravioto, J.M.; Chávez, R. y Vázquez, J. 1956. Mortality in second and third degree malnutrition. *J. Trop. Pediat.* London 2: 77.

González, C.; Villaseñor, L. y Betancourt, M. 1990. Cinética de proliferación de linfocitos de niños desnutridos. *Rev. Inv. Clin. (México)* 42: 18-22.

González-Torres, M.C.; Villaseñor, L. y Betancourt, M. 1983. Proliferación celular de linfocitos e intercambio de cromátidas hermanas en niños desnutridos. *Mem. Asoc. Invest. Pediátrica* 57: 49-71.

Gorodezky, C.; Betancourt, M.; Salazar-Mallén, M.; Amezcua, M. E. y Cravioto, J. 1986. Blast transformation in mexican malnourished children. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 28: 217-220.

Griesel, R.D. y Richter, L.M. 1987. Psycho-social studies of malnutrition in Southern Africa. *Wld. Rev. Nutr. Diet.* 54: 71- 104.

Hoffman-Goetz, L. 1986. Malnutrition and immunological function with special reference to cell-mediated immunity. *Yearbook of Physical Antropology* 29: 139-159.

Jelliffe, D. 1981. *Nutrición infantil en países en desarrollo*. Limusa. México. pp

Karbowiak, I. y Appel, S. 1988. Determination of lymphocyte subpopulations by enzyme immunoassay. *J. Immunol. Methods* 112: 31-35.

Khoury, F. P. y McLaren, D. S. 1973. Cytogenetics studies in protein-calorie malnutrition. *Am. J. Genet.* 25:465-470.

Kramer, T.R. 1984. Re-evaluation of zinc deficiency on concanavalin A - induced rat spleen lymphocyte proliferation. *J. Nutr.* 114: 953-963.

Laboratorio Clínico. *Cifras Normales*. 1973. Instituto Mexicano del Seguro Social. Subdirección General Médica.

Lukasewycz, O.A. y Prohaska, J.R. 1983. Lymphocytes from copper-deficient mice exhibit decreased mitogen reactivity. *Nutr. Res.* 3: 335-341.

ESTADO LIBRE ASOCIADO DE PUERTO RICO
SECRETARÍA DE LA SALUD
39

Manocha, S. 1972. Malnutrition and retarded human development. Publish. Charles C. Thomas. E.U.A.

Morgane, P.J.; Austin-La France, R.J.; Bronzino, J.D.; Tonkiss, J. y Galler, J.R. 1992. Malnutrition and the developing central nervous system, en: *The Vulnerable Brain and Experimental Risks*, Vol.1: Malnutrition and Hazard Assesment, editado por Robert L. Issacson y Kael F. Jensen. Plenum Press, New York. pp 3-44.

Mugerwa, J.W. 1971. The lymphoreticular system in Kwashiorkor. *J. Path.* 105: 105-109.

Murthy, P. B.; Bhaskaran, P. y Srikantia, S. G. 1980. Sister chromatid exchanges in protein-energy malnutrition. *Human. Genet.* 55: 405-406.

Murthy, P. B. y Srikantia, S. G. 1981. SCE frequency in malnourished mice. *Metabolism.* 30: 1-2.

Murthy, P.B.; Rahiman, M.A. y Tulpule, P.G. 1982. Lymphocyte proliferation kinetics in malnourished children measured by differential chromatid staining. *Br. J. Nutr.* 47: 445-450.

Mutchinick, O.; Lisker, R.; Ruz, L.; Salamanca, F. y Armendares, S. 1979. Frequency of sister chromatid exchanges in severe protein calorie malnutrition. *Ann. Genet.* 22: 129-132.

Neumann, Ch.; Lawlor, G.; Stiehm, E.; Swendseid, M.E.; Newton, C.; Herbert, J.; Ammann, A.J. y Jacob, M. 1975. Immunologic responses in malnourished children. *Am. J. Clin. Nutr.* 28: 89-104.

Ortíz, R. y Betancourt, M. 1984. Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. *J. Nutr.* 114: 472-476.

Ortíz, R. y Betancourt, M. 1990. *Mutat. Res.* 232: 71-75.

Ortíz, R.; Campos, C.; Gómez, J.L.; Espinoza, M.; Ramos, M. y Betancourt, M. 1993. Sister chromatid exchanges and cell proliferation in lymphocytes from infected and non infected children with severe protein-calorie malnutrition. Aceptado para su publicación en *Mutat. Res.*

Parnes J. 1987. T-cell differentiation antigens: Proteins, genes and function. *BioEssays* 4(6): 255-259.

Raffi, M.; Hashemi, S.; Nahani, J. y Mohaghehpour, N. 1977. Immune responses

in malnourished children. Clin. Immunol. Immunopathol. 8: 1-6.

Ramos-Galván, R. 1975. Somatometría pediátrica. Arch. Inv. Med. Suppl. 1 (revisada en 1978).

Read, M. 1977. Desnutrición, aprendizaje y comportamiento. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica No. 352. Washington, D.C. E.U.A.

Reichert, T.; DeBruyere, M.; Veneys, V.; Tötterman, T.; Lydyard, P.; Yuksel, F.; Chapel, H.; Jewell, D.; VanHove, L.; Linden, J. y Buchner, L. 1991. lymphocyte subset reference range in adult caucasians. Clin. Immunol. Immunopathol. 60: 190-208.

Roitt, I.M.; Brastoff, J. y Male, D.V. 1989. Immunology. Gower Medical Publishing. New York.

Sadasivan, G. y Raghuram, T. 1973. Chromosomal aberrations in malnutrition. Lancet 2: 574.

Spiegel, M.R. 1984. Estadística. McGraw-Hill. México.

Smythe, P.M.; Schonland, M.; Brereton-Stiles, G.G.; Coovadia, H.M.; Grace, H.J.; Loening, W.E.K.; Mafoyane, A.; Parent, M.A. y Vos, G.H. 1971. Thymolymphatic deficiency and depression of cell mediated immunity in protein-calorie malnutrition. Lancet, 2: 939-944.

Stites, D.; Stobo, J.D.; Fudenberg, H.H. y Wells, V.J. 1985. Inmunología Básica y Clínica. 5a ed. Interamericana. México.

Tello-López, A.; Guzmán, J. y Betancourt, M. 1983. Determinación de la transformación blastoide en linfocitos de niños desnutridos. Memorias de la LVII Reunión Reglamentaria de la Asociación de Investigación Pediátrica. San Miguel de Allende, Gto.

Touraine, J.L. y Gay, G. 1981. Deficit immunitaire secondaire a la malnutrition. Gastroenterol. Clin. Biol. 5: 835- 838.

Trowell, H.C.; Davies, J.N.P. y Dean, R.F.A. 1954. Kwashiorkor. London. p. 155.

Vijayalaxmi, R. 1975. Chromosomal aberrations in malnutrition. Metabolism. 24: 1415-1417.

Vint, F.W. 1937. Post-mortem findings in natives of Kenya. E. Afr. Med. J. 13: 332.

Vyas, D. y Chandra, R.K. 1983. Thymic factor activity lymphocyte stimulation response and antibody producing cells in copper deficiency. *Nutr. Res.* 3: 343-349.

Watts, T. 1969. Thymus weights in malnourished children. *J. Trop. Pediat.* 15: 155.

Welcome Trust. Sponsored Working Party. 1970. Classification of infantile malnutrition. *Lancet* 2: 302-303.

Winick, M. y Noble, A. 1966. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J. Nutr.* 89: 300-306.

Weiblen, B.; Debell, K.; Giorgio, A. y Valeri, C.R. 1984. Monoclonal antibody testing of lymphocytes after overnight storage. *J. Immunol. Methods* 70: 179-183.

Zar, J. 1984. *Biostatistical Analysis*. 2a ed. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. U.S.A.

IX .- ANEXOS

Anexo 1

Solución concentrada de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales liofilizados (Coulter) fueron resuspendidos en 500 μL de agua destilada. Esta solución se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 minutos, para eliminar complejos de gran tamaño (indicación del productor). Posteriormente se hicieron alicuotas de 600 μL , de la siguiente manera:

15 μL de la solución de anticuerpo

585 μL de PBS (pH = 7.3)

Las alicuotas fueron almacenadas en un ultracongelador (Revco) a -60°C , hasta que fueron utilizadas. Antes de poner el anticuerpo en contacto con las células se descongelaba a temperatura ambiente.

Anexo 2

Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

Para preparar la solución se usaron los siguientes reactivos:

NaCl	7.4 g
Na ₂ HPO ₄	1.4 g
NaH ₂ PO ₄	0.5166 g

Se aforó a 1 000 ml con agua destilada. Se ajustó el pH de la solución a 7.3 utilizando Na₂HPO₄.

Anexo 3

Solución de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)

El anticuerpo (Sigma, Chem. St. Louis Mo.) viene disuelto en PBS. De ahí se tomaron 0.5 ml y se mezclaron con 24.5 ml de una solución Tris-salina. Se mezclaron y así se obtuvo una solución al 2% del anticuerpo conjugado con isotiocianato de sodio.

Para preparara solución Tris-salina se pesaron los siguientes reactivos:

Trizma base	4.84 g
Na Cl	36.0 g
Na N	0.8 g

La solución se llevó a un volumen final de 4 L.