



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y DE LA SALUD

“Evaluación de la actividad inmunomoduladora de *Urtica dioica* L. en ratas desnutridas”

T E S I S

Que para obtener el grado de:
Doctora en Biología Experimental

P R E S E N T A

M. en Biol. Exp. Sara Beatriz Herrera Solís

COMITÉ TUTORAL:

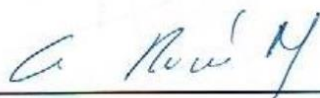
Co-Directores
Dra. Leonor Rodríguez Cruz
Dr. Rodolfo Velasco Lezama

Asesor externo:
Dra. Ma. del Carmen García Rodríguez

Iztapalapa, Ciudad de México, Diciembre de 2018

JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Evaluación de la actividad inmunomoduladora de *Urtica dioica* L. en ratas desnutridas", que presentó: M. en B. E. Sara Beatriz Herrera Solís, el día 19 de diciembre de 2018.



PRESIDENTA. Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa
Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias
Biológicas y de la Salud, arom@xanum.uam.mx



SECRETARIA. Dra. María del Carmen García Rodríguez

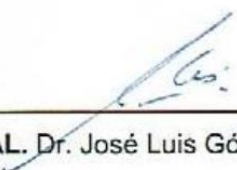
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza". Unidad de
Investigación en Genética y Toxicología Ambiental,
carmen.garcia@unam.mx

COMITÉ TUTORIAL

Secretaría de Educación

Secretaría de Investigación Científica

Comité de Ética



VOCAL. Dr. José Luis Gómez Olivares

Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa

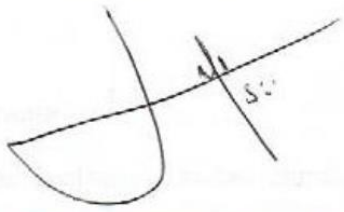
Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias

Biológicas y de la Salud, gool@xanum.uam.mx

Dr. Roberto Flores Sáenz

Unidad de Investigación de Modelos de Atención a la Salud

Comité de Ética



VOCAL. Dr. José Luis Eduardo Flores Sáenz

Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa

Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias


Biológicas y de la Salud, luisflosaenz@gmail.com

Asesoría Académica

Dr. Julio César Almanza Pérez

Unidad de Investigación de Modelos de Atención a la Salud

Comité de Ética



VOCAL. Dr. Julio César Almanza Pérez

Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa

Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias

Biológicas y de la Salud, jcap@xanum.uam.mx

COMITÉ TUTORAL

Co-Directores:

Dra. Leonor Rodríguez Cruz.

Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento de Ciencias de la Salud.

leor@xanum.uam.mx

Dr. Rodolfo Velasco Lezama.

Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento de Ciencias de la Salud.

velr@xanum.uam.mx

Asesor externo:

Dra. Ma. del Carmen García Rodríguez

Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza"

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental

carmen.garcia@unam.mx

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo fue realizado en los Laboratorios de Biología Celular-Citometría de Flujo y Hematología Experimental, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Leonor Rodríguez Cruz y del Dr. Rodolfo Velasco Lezama, en **El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana que pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 235029 y CVU: 330957.**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco con todo mi corazón a mi Padre Celestial, en el nombre de mi Señor Jesucristo, por la realización y culminación de este trabajo, porque sé que si Dios no estuviera conmigo: nada podría hacer (Juan 15).

Por medio de este himno, expreso mi amor y agradecimiento a mi Dios y Salvador.

AGRADECIMIENTO

Al meditar Dios mío en las cosas que me has dado,
mi corazón se inflama turbado de emoción
Pues no encuentro palabras como expresar mi Cristo,
el agradecimiento de mi alma para ti.
Cambiaste tú mi vida, me diste esperanza,
y desde aquel instante mi alma recibió
un gozo tan sublime que al pasar de los años,
ha sido cual la fuente de mi felicidad.

CORO

Agradecimiento hay en mi corazón,
canto de alegría elevo con mi voz
Muchas son las cosas que mi Dios me ha dado,
// Y en agradecimiento // le sirvo a mi Señor.

A veces que la prueba que has puesto en mí camino,
en vez de ser derrota han sido bendición
Que ni por un momento tú me has dejado sólo,
y así tu santa mano ha sido mi sostén.
Permíteme que mi alma ponga por servirte,
y muy dentro de mi mente presente siempre estén
Los múltiples favores y tu misericordia,
que ya sin merecerlo tuviste para mí.

fuentes: musica.com

Por supuesto, no puedo dejar de agradecerle al **Dr. Rodolfo Velasco Lezama** todo el apoyo (moral, académico, económico, consejos, etc.) que me ha brindado. Desde el día que llegué al Laboratorio de Hematología Experimental (2006), hasta este día tan importante en mi vida. Gracias Dr. Rodolfo (lo digo llorando), porque siempre me ha apoyado, le debo mucho, y desde ahora le digo que lo mucho o poco que pueda lograr en mi carrera profesional y familiar, también son méritos suyos. Gracias a Dios que lo puso en mi camino.

A la **Dra. Leonor Rodríguez Cruz** por la co-dirección de esta tesis y apoyarme en mi desarrollo profesional, deja en mí una grande huella de excelencia.

A la **Dra. María del Carmen García Rodríguez** por su apoyo, comentarios, sugerencias, disponibilidad, en fin todas las contribuciones que hizo para que este proyecto mejorara en gran manera.

A los doctores: **Alda Rocío Ortíz Muñíz, José Luis Gómez Olivares, José Luis Flores Sáenz** y **Julio César Almanza Pérez**, por el tiempo que dedicaron a la revisión de esta tesis y por sus valiosos comentarios.

A la Profesora **Rafaela Tapia Aguilar**, por su gran apoyo en la realización de mis experimentos, sin Ud. no hubiera podido avanzar, Gracias Profesora. Siempre ha mostrado ser para mí un gran ejemplo a seguir.

Al Ing. **Rafael Eugenio Parrilla Arroyo**, Director general de Bosque Esmeralda, Amecameca, Estado de México, por las facilidades otorgadas para la colecta de la planta.

A la **Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera**, primero gracias por ser mi amiga y gracias por demostrármelo con todo el apoyo que me diste.

A la **M. en C. Ana María González**, a la **Dra. Edith Cortés** y a la **Dra. Elsa Cervantes**, por todo el apoyo que recibí de ustedes.

A las Licenciadas **Angélica Ostos Sánchez** y **Violeta Luna Caballero**, porque siempre están dispuestas a apoyar a cada alumno en todos los trámites escolares necesarios.

Sin duda alguna, la realización de este trabajo involucró la colaboración de muchas personas que participaron directa e indirectamente: a todos ustedes... Muchas gracias.

DEDICATORIAS

A mi amor: **Jesús Rafael Parrilla**, porque somos uno solo, porque juntos emprendimos este viaje

y juntos seguiremos alcanzando nuestros sueños, porque sé que siempre puedo contar

contigo (en las buenas, en las malas y en las de: ya ni modos 😊). Te amo

A mis niñas hermosas: **Sara Elizabeth Rafael Herrera** y **Abigail Rafael Herrera**, porque todo lo

que hago es para ustedes dos. Las amo

A mis padres: **Oliva Solís Méndez** y **Sergio Herrera Campos**, por todo su amor.

A mis suegros: **Martha Parrilla Aguilar** y **Pablo Rafael Huaroco**, por todo su apoyo.

A mis hermanos: **Jesús A.**, **Sergio A.**, **Laura** y **Tania**, porque de una u otra manera ahí estuvieron

conmigo, al igual que mis niñas; **Brenda**, **Karen**, **Vanessa**, **Valeria** y **Jimena**.

LOS AMO A TODOS

RESUMEN

Introducción. La desnutrición grave es la principal causa de inmunodeficiencia en niños menores de cinco años en países en vías de desarrollo, y se le asocia con atrofia generalizada de los tejidos linfoides. A su vez, *Urtica dioica* L. es una planta medicinal con múltiples propiedades farmacológicas, entre ellas, como modulador de la respuesta inmunológica, particularmente la proliferación de linfocitos T *in vitro*.

Objetivo: Determinar la capacidad de *Urtica dioica* L. para modular la respuesta inmunológica de ratas con desnutrición grave en los primeros 21 días de vida.

Métodos: Se indujo desnutrición de tercer grado (grave) durante la lactancia por competencia de alimento y se trató esta condición con *Urtica dioica* L. Se utilizaron ratas Wistar de un día de nacidas, se asignaron aleatoriamente en tres grupos: a) Bien nutridas, b) Desnutridas sin tratamiento y c) Desnutridas tratadas con *Urtica dioica* L. (0.2 g/mL), los días 14, 16, 18 y 20 de la lactancia. En el día 21, las ratas fueron anestesiadas y sacrificadas. Se obtuvieron el timo, el bazo, la sangre y médula ósea para las siguientes determinaciones: 1) Registro del peso de timo y bazo, 2) Subpoblaciones de linfocitos T en timo, 3) Subpoblaciones de leucocitos en sangre, 4) Citometría hemática, 5) Células nucleadas totales de médula ósea y 6) Capacidad de proliferación de linfocitos de bazo *in vitro*.

Resultados: Las ratas con desnutrición grave tratadas con *Urtica dioica* L., presentaron: 1) Ganancia de peso en timo y bazo, 2) Menor proporción de linfocitos T CD4-CD8- en timo, 3) Incremento de linfocitos T CD4+CD8+ en timo, 4) En sangre incremento en el número de linfocitos CD4+, monocitos y linfocitos T totales, 5) Aumento en el número de

leucocitos, eritrocitos y algunos parámetros eritroides en sangre, 6) Disminución de células nucleadas totales de médula ósea y, 7) Estimulación en la proliferación *in vitro* de células de bazo; $p \leq 0.05$.

Conclusión: *Urtica dioica* L. presenta actividad inmunoestimulante, ya que contrarresta los efectos de la desnutrición sobre la respuesta inmunológica en timo, bazo, sangre y médula ósea, conduciendo a la normalización en el individuo desnutrido.

Palabras clave: Desnutrición grave, inmunodeficiencia, actividad inmunomoduladora, linfocitos T, *Urtica dioica* L.

ABSTRACT

Introduction. Severe malnutrition is the leading cause of immunodeficiency in children under five in developing countries, and is associated with widespread atrophy of lymphoid tissues. In turn, *Urtica dioica* L. is a medicinal plant with multiple pharmacological properties, including as a modulator of the immune response, particularly the proliferation of T lymphocytes *in vitro*.

Objective: Determine the ability of *Urtica dioica* L. to modulate the immune response of malnourished rats in first 21 days of life.

Methods: Third degree malnutrition (severe malnutrition) was induced during lactation by food competition and this condition was treated with *Urtica dioica* L. One day old Wistar rats were used, randomly assigned in three groups: a) Well nourished, b) Malnourished without treatment and c) Malnourished treated with *Urtica dioica* L. (0.2 g / mL), days 14, 16, 18 and 20 of lactation. On day 21, the rats were anesthetized and sacrificed. The thymus, spleen, blood and bone marrow were obtained for the following determinations: 1) Thymus and spleen weight record, 2) T lymphocyte subpopulations in thymus, 3) Blood leukocyte subpopulations, 4) Blood cytometry, 5) Total nucleated bone marrow cells and 6) Spleen lymphocyte proliferation capacity *in vitro*.

Results: Rats with severe malnutrition treated with *Urtica dioica* L., presented: 1) Weight gain in thymus and spleen, 2) Lower proportion of CD4-CD8- T lymphocytes in thymus, 3) Increase in CD4+CD8+ T lymphocytes in thymus, 4) In blood increase in the number of CD4+ lymphocytes, monocytes and total T lymphocytes, 5) Increase in the number of leukocytes, erythrocytes and some erythroid parameters in blood, 6) Decrease of total

nucleated bone marrow cells and, 7) Stimulation of spleen cells proliferation *in vitro*; $p \leq 0.05$.

Conclusion: *Urtica dioica* L. presents immunostimulant activity, since it counteracts the effects of malnutrition on the immune response in thymus, spleen, blood and bone marrow, leading to normalization of the malnourished individual.

Key words: Severe malnutrition, immunodeficiency, immunomodulatory activity, T lymphocytes, *Urtica dioica* L.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1 DESNUTRICIÓN.....	2
2.2 ETIOLOGÍA.....	3
2.3 DESNUTRICIÓN INFANTIL.....	4
2.3.1 CLASIFICACIÓN DE LA DESNUTRICIÓN INFANTIL DE ACUERDO A SU INTENSIDAD.....	7
2.3.2 MODELOS EXPERIMENTALES DE LA DESNUTRICIÓN INFANTIL.....	9
2.4 EFECTOS DE LA DESNUTRICIÓN INFANTIL A NIVEL INMUNOLÓGICO.....	10
2.4.1 Composición y función del sistema inmunológico.....	10
2.4.2 Efectos de la desnutrición en la respuesta inmunológica.....	20
2.5 AGENTES INMUNOMODULADORES.....	29
2.6 <i>Urtica dioica</i>	29
2.6.1 Características botánicas.....	30
2.6.2 Composición química.....	30
2.6.3 Usos y propiedades medicinales.....	31
2.6.4 Propiedades biológicas y farmacológicas.....	31
2.6.5 Actividad inmunomoduladora <i>in vitro</i>	32
III. JUSTIFICACIÓN.....	32
IV. HIPÓTESIS.....	33
V. OBJETIVOS.....	34

5.1 OBJETIVO GENERAL.....	34
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
6.1 Material biológico.....	35
6.2 Reactivos.....	35
6.3 MÉTODO.....	36
6.4 Estudio comparativo del efecto de la decocción de <i>Urtica urens</i> y el extracto de <i>Urtica dioica</i> L. sobre la capacidad de proliferación de células de bazo de ratas con desnutrición grave durante la lactancia.....	38
6.5 Evaluación del efecto de <i>Urtica dioica</i> L. (0.2g/mL) sobre la modulación de los elementos de la respuesta inmunológica en ratas con desnutrición grave	39
6.6 Cuantificación de polifenoles totales en las cápsulas de <i>Urtica dioica</i> L.....	42
6.7 Análisis estadístico.....	43
VII. RESULTADOS.....	44
7.1. Comparación del efecto de la decocción de <i>U. urens</i> y el extracto de <i>U. dioica</i> L. sobre la proliferación de células de bazo y sobre el número de células nucleadas totales de médula ósea de ratas desnutridas.....	44
7.2 Efecto de <i>Urtica dioica</i> L. sobre la modulación de los elementos de la respuesta inmunológica en ratas con desnutrición grave	46
VIII. DISCUSIÓN	54
IX. CONCLUSIONES.....	64
X. PERSPECTIVAS.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	66
ARTÍCULO PUBLICADO.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
Figura 1.	Sinapsis inmunológica	18
Figura 2.	Proliferación de células de bazo de ratas desnutridas con y sin Concanavalina A.	51
Figura 3.	Células nucleadas totales de médula ósea de ratas desnutridas tratadas con <i>U. urens</i> y <i>U. dioica</i> L.,	52
Figura 4.	Peso del timo y el bazo de ratas desnutridas	55
Figura 5.	Porcentaje promedio de subpoblaciones de timocitos de ratas desnutridas tratadas con <i>U. dioica</i> L.	56
Figura 6.	Porcentaje de glóbulos blancos circulantes en ratas tratadas con <i>U. dioica</i> L.	57
Figura 7.	Proporción de linfocitos/neutrófilos de ratas desnutridas	59
Figura 8.	Total de células nucleadas de médula ósea de ratas desnutridas.	60
Figura 9.	Proliferación de células del bazo de ratas desnutridas.	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
Cuadro 1.	Peso corporal en ratas bien nutridas, en ratas desnutridas sin tratamiento y tratadas con <i>U. dioica</i> L.	54
Cuadro 2.	Hemocitometría de ratas desnutridas tratadas con <i>U. dioica</i> L.	58

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APC	Alofococianina
BN	Ratas bien nutridas
C-BN	Camada de crías bien nutridas.
CD	Células dendríticas
CD25	Molécula también denominada IL-2R α o subunidad α del receptor para la interleucina-2.
CD28	Molécula coestimuladora de fundamental importancia en la activación del linfocito T virgen.
CD3	Molécula cuya presencia define a la estirpe T (Linfocitos T)
CD45	Antígeno leucocitario común que está implicado en la transmisión de señales intercelulares T-B
CD45RA	Isoforma CD45 que caracteriza a las células T vírgenes
CD45RO	Isoforma asociada con los linfocitos T de memoria.
CD62L-	Molécula de adhesión presente en todos los leucocitos circulantes salvo en una subpoblación de linfocitos memoria. También se denomina selectina-L.
CD71	Receptor de transferrina

CD95	Receptor perteneciente a la superfamilia de receptores de muerte.
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas.
C-DN	Camada de crías desnutridas.
ConA	Concanavalina A
CPA	Célula presentadora de antígeno
DAG	Diacilglicerol
DCP	Desnutrición Calórico Proteínica
DN	Grupo de ratas desnutridas
DNUd	Grupo de ratas desnutridas tratadas con <i>Urtica dioica</i> L.
DNUu	Grupo de ratas desnutridas tratadas con <i>Urtica urens</i> L.
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter. Clasificador de células activado por fluorescencia
FAO	Organización de las Naciones Unidas para La Agricultura y la Alimentación
FAS	Receptor de muerte celular, o Apo-1. Miembro de la familia del factor de necrosis tumoral.
FASL	Ligando de FAS.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLyC o PLyC	Fosfolipasa Cy

FSC	Dispersión de luz frontal
HLADR	Human Leukocyte Antigen – DR isotype
IFN-γ	Interferón gamma, también llamado interferón inmunitario o de tipo II
IL10	Interleucina 10
IL2	Interleucina 2
IL2R	Receptor de interleucina 2
IL4	Interleucina 4
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IP3	Trifosfato de Inositol
MHC I	Complejo principal de histocompatibilidad tipo I.
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad tipo II.
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells.
NK	Natural Killer o Células asesinas.
OMS	Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
PIP	Fosfatidilinositol

PKC	Proteína cinasa C
PMA	Programa Mundial De Alimentos
SI	Sistema Inmunológico
T CD4+	Linfocitos T cooperadores. Establecen y maximizan las capacidades de defensa del sistema inmunológico.
T CD8+	Linfocitos T citotóxicos. Neutralizan células infectadas por microorganismos intracelulares, atacan a las células infectadas.
TCR	Receptor de linfocitos T
UD	<i>Urtica dioica</i> L
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (United Nations Children's Fund).

I. INTRODUCCIÓN

Frecuentemente, la desnutrición es la consecuencia más directa de una dieta insuficiente, que conduce a un estado patológico con manifestaciones clínicas de gravedad variable (Gómez y col., 1946; Kouam y col., 2014). Durante la infancia tiene impacto irreversible sobre el crecimiento físico y mental del individuo. Incluso aumenta la probabilidad de muerte del infante a causa de infecciones graves y/o prolongadas en los primeros días o semanas de vida en comparación con aquellos que tienen peso y talla adecuados (Walson y Berkley, 2018). Se ha observado que la Desnutrición Calórico-Proteínica (DCP) en recién nacidos y niños preescolares provoca atrofia del timo asociada con la disminución celular ligada a un desarrollo deficiente de los órganos linfoides periféricos, por lo tanto, la respuesta proliferativa de los linfocitos T se encuentra alterada en forma variable (Savino, 2002). Se han observado efectos en:

- a) Disminución de linfocitos circulantes y tisulares.
- b) Respuestas cutáneas de hipersensibilidad retardada disminuidas en proporción a la severidad de la malnutrición.
- c) Disminución en la producción de anticuerpos y en la producción de citocinas.
(Vásquez y col., 2008)

El uso de agentes inmunoestimuladores o inmunopotenciadores, es una herramienta terapéutica para personas inmunocomprometidas, entre ellas, las afectadas por la DCP. Se incluyen agentes químicamente definidos, extractos de plantas, preparaciones microbianas, etc. (Tan y Vanitha, 2004; Chin y col., 2006). Funcionalmente estos

agentes pueden agruparse entre aquellos que actúan sobre; Las células T, células B, células NK, macrófagos o aquellos que son específicos o inespecíficos en su acción (Sánchez y col., 2002). *Urtica dioica* L. (Descrita por Carolus Linnaeus en 1750) es una planta estudiada ampliamente en Europa y Asia, con propiedades antioxidantes, antibacterianas, citotóxicas y estimulante de la fagocitosis en neutrófilos (Basaran y col., 1997; Gülcin y col., 2004), entre otras; contiene una gama amplia de compuestos, entre ellos, hierro, ácidos grasos, vitaminas, etc., los cuales pueden contribuir al estado de salud del individuo y/o modulación del sistema inmunológico afectado por la desnutrición infantil. Por tanto, la finalidad del presente trabajo es determinar la actividad inmunomoduladora de *Urtica dioica* L. en células de timo, bazo y sangre de ratas lactantes con desnutrición grave.

II. ANTECEDENTES

2.1 DESNUTRICIÓN

La desnutrición (DES) se define como la asimilación deficiente de alimentos que conduce a un estado patológico con manifestaciones clínicas de gravedad variable (Gómez y col., 1946; Kouam y col., 2014), es producida por un desequilibrio entre la cantidad de nutrientes requerida y la cantidad que se recibe (Mehta y col., 2014). La desnutrición es considerada también como un estado en el que el individuo tiene deficiencia de nutrientes. Este término expresa todas las condiciones en las que existe

deficiencia en la ingesta, absorción o asimilación de los mismos, así como una situación de consumo o pérdida excesiva de calorías, que afecta el aporte y metabolismo de los principales nutrientes (Hernández y col., 1998).

2.2 ETIOLOGÍA

La DES se relaciona con los fenómenos sociales y culturales que caracterizan a una nación, población y a la familia. El estado de nutrición está determinado por factores ambientales, genéticos, neuroendocrinos y por el momento de desarrollo en el que se encuentre el individuo. La DES es un estado patológico, sistémico y potencialmente reversible, que se origina como resultado de la deficiente incorporación de los nutrimentos a las células del organismo y se presenta con diversos grados de intensidad y manifestaciones clínicas variadas. De acuerdo con los factores que la causan, la desnutrición puede clasificarse en primaria o secundaria (Márquez y col., 2012).

a) Desnutrición Primaria

Se produce desnutrición primaria cuando el aporte de nutrientes es insuficiente para llenar los requerimientos del individuo, lo cual puede deberse a alimentación deficiente en calidad o cantidad, o en ambas.

b) Desnutrición Secundaria

La desnutrición secundaria o condicionada se debe a alteraciones en la fisiología normal del organismo, como son: Dificultad para la ingestión, absorción inadecuada,

utilización incorrecta de los nutrientes, aumento del catabolismo (Müller y Krawinkel, 2005).

Las formas primarias surgen más bien en países en desarrollo y en casos de guerra o hambruna. La desnutrición secundaria, la principal forma encontrada en países industrializados, no fue reconocida hasta inicios de 1970, cuando se observó que las personas con consumo adecuado de alimentos pueden presentar desnutrición como consecuencia de enfermedades crónicas o agudas que alteran el consumo o metabolismo de nutrientes, en particular enfermedades que causan inflamación aguda o crónica (Müller y Krawinkel, 2005). En general, la desnutrición es el resultado del consumo insuficiente de alimentos, se presenta en individuos de todas las razas y en cualquier parte del mundo, siendo su mayor incidencia en niños menores de cinco años (Kanan y Oswar, 2016).

2.3 DESNUTRICIÓN INFANTIL

En la Infancia Temprana, durante los primeros cinco años de vida del individuo, ocurre la mayor tasa de crecimiento y desarrollo psicomotor e inmunológico, por lo que se considera como la etapa más importante en el ciclo vital donde se requiere mayor aporte de nutrientes. El desarrollo temprano saludable –En lo físico, socioemocional y lingüístico-cognitivo- es fundamental para alcanzar bienestar no sólo durante la infancia sino a lo largo de la vida (UNICEF-WHO-The World Bank Joint Malnutrition Estimates, 2012).

Al estado en el que el peso o talla corporal del niño es menor a lo normal para la edad, como consecuencia de un retraso en el crecimiento se le denomina Desnutrición Infantil. Este retraso de crecimiento es causado principalmente por una asimilación deficiente de nutrientes. Este padecimiento daña las funciones celulares de manera progresiva, afectando el depósito de nutrientes, el metabolismo energético, los mecanismos de comunicación y de regulación celular, el crecimiento, la proliferación celular, la capacidad de respuesta al estrés, por lo que, de no controlarse a tiempo, puede provocar la muerte del organismo que la padece (Black y col., 2013).

Cada año, la desnutrición es responsable de entre 3.5 y 5 millones de muertes de niños menores de cinco años (Shamah y col., 2012; Rodríguez y col., 2011) y es un problema de salud pública principalmente en países en desarrollo, donde un tercio de todos los niños menores de 5 años presentan retraso en el crecimiento, dándose las mayores tasas de retraso del crecimiento infantil en África y Asia. Sin embargo, en el año 2000 fue estimado que 182 millones de niños en edad preescolar de los países en desarrollo sufrieron de desnutrición; de esos niños, 7.3 millones se encontraban en América Latina y el Caribe (De Onis, 2000).

La Organización de las Naciones Unidas (ONU) en el año 2003, por medio del Programa Mundial de Alimentos (PMA), dio a conocer el grave panorama del hambre: cada hora mueren en el mundo 25 mil personas, de las cuales 18 mil tienen menos de cinco años de edad debido a la desnutrición crónica que afecta principalmente a la población de países pobres.

En América Latina las estadísticas muestran una situación difícil, sobre todo en algunos países de Centroamérica en donde los porcentajes de desnutrición alcanzan el 46 por ciento de la población infantil. De acuerdo con datos de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) hay más de 840 millones de personas en el mundo que están crónicamente subalimentadas, y 200 millones de niños menores de cinco años padecen desnutrición extrema (FAO, 2003).

En México, en el año 2002 se estimaba que había poco más de 3 millones de niños menores de 5 años con algún grado de desnutrición, de los cuales 800,000 sufrían de desnutrición de alto riesgo (Instituto Nacional de Salud Pública, 2002; FAO, 2003). Donde más de la mitad de los niños del medio rural mexicano están desnutridos. Se estima que la desnutrición en comunidades no indígenas oscila entre 35 y 50% de los niños que aún no cumplen 5 años. En las zonas indígenas afecta del 70% al 80% de la población infantil. Los principales estados en donde existe desnutrición en México son: Chiapas, Oaxaca, Yucatán, Veracruz y Estado de México (UNICEF, 2016). De esto el 90% de los casos de DES son ocasionados principalmente por una sub-alimentación del infante, ya sea por deficiencia en la cantidad o calidad de los alimentos consumidos. A su vez, esta sub-alimentación está influida por diversos factores, entre ellos, alimentación baja en nutrientes, falta de conocimiento de los requerimientos nutricionales para la edad del infante y técnica en la alimentación. El 10% restante de las causas de la DES son: infecciones enterales o parenterales, defectos congénitos, nacimiento prematuro, entre otros.

El poder destructivo de la desnutrición se manifiesta no sólo en la muerte de muchos infantes, sino también en millones de sobrevivientes que padecen propensión a contraer enfermedades o quedan mermados intelectualmente.

2.3.1 CLASIFICACIÓN DE LA DESNUTRICIÓN INFANTIL DE ACUERDO A SU INTENSIDAD

Se ha observado que el infante puede pasar por diferentes grados de desnutrición clasificados de acuerdo con la deficiencia de peso en relación con el peso de individuos bien nutridos, en mismas condiciones de edad y grupo étnico.

- Desnutrición de primer grado o desnutrición leve: Es aquella en la que el infante presenta pérdida de peso entre el 10 y 25% que debería tener para su edad.
- Desnutrición de segundo grado o desnutrición moderada: Se determina cuando el déficit de peso se encuentra entre el 25 y 40% para su edad. En este caso, el infante es blanco de infecciones respiratorias y gastrointestinales que acentúan la desnutrición pasando fácilmente a la desnutrición de tercer grado (Gómez, 1946).
- Desnutrición de tercer grado o desnutrición grave: Es considerada como aquella en la que el déficit de peso del individuo es mayor al 40%, en donde las reservas nutricias están agotadas comprometiendo la sobrevivencia del infante. La DES

grave a su vez, tiene dos manifestaciones clínicas: el marasmo y el kwashiorkor (Gómez, 1946; Golden, 2002).

- Los niños con desnutrición tipo marasmo, lo cursan dentro del primer año de edad principalmente y es producto de una dieta pobre en proteínas y calorías; se caracteriza por un importante retraso del crecimiento. Estos niños presentan cuadros de infecciones frecuentes, diarreas, pérdida de grasa corporal, inflamación estomacal, ojos hundidos, pérdida de peso, cambios en el color del cabello y una apariencia física de inanición severa (Gámez y col., 2003).
- El kwashiorkor es un término aplicado a un niño cuya ingesta de carbohidratos es variable pero no tiene proteínas en su dieta, generalmente se registra en niños de 1 a 5 años de edad (Golden, 2002). Se caracteriza por edema en abdomen y extremidades (Sauerwein y col., 1997) además de la presencia de otros síntomas como son: cambio en el color del cabello el cual cae con facilidad al tocarlo, piel deshidratada y descamación. (Sauerwein y col., 1997).
- La desnutrición calórico-proteínica es un síndrome nutricional caracterizado por un estado multifactorial donde predomina el déficit proteico-energético, como resultado de una dieta inadecuada en cantidad y/o calidad de macro y micronutrientes que impide cubrir las necesidades del individuo para su crecimiento y desarrollo adecuado de acuerdo a su edad o etapa de vida (Waterlow, 1996).

2.3.2 MODELOS EXPERIMENTALES DE LA DESNUTRICIÓN INFANTIL

Desde el momento que se logró definir la desnutrición infantil, se ha intensificado el estudio de las enfermedades relacionadas con las deficiencias en la nutrición, de tal forma que actualmente se cuenta con criterios clínicos que la identifican y se conoce su impacto en el desarrollo mental infantil, así como en la respuesta inmunológica en la niñez (Vega, 1999). También se han desarrollado indicadores y parámetros estándar o de referencia para establecer comparaciones entre diversas poblaciones como los criterios de Gómez, la propuesta de Waterloo (1977) y las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1986); en gran medida por el uso de modelos experimentales.

El uso de animales de laboratorio principalmente: ratas y ratones, en el estudio de la desnutrición representa un elemento fundamental para avances en la prevención y tratamiento de este padecimiento. Estos modelos permiten el estudio de la desnutrición en diferentes etapas de la vida (prenatal, postnatal y adulta) además; brindan la posibilidad de realizar estudios *in vitro* y/o *in vivo*, facilitan el estudio de los efectos de la desnutrición en diferentes grados y órganos afectados, no se requieren altos ingresos económicos para su manejo y se obtienen resultados en corto tiempo debido al ciclo de vida de estos animales (Birke, 2003).

La desnutrición experimental durante la lactancia se puede inducir principalmente bajo los siguientes modelos; 1) Alimentación de baja calidad nutritiva (Feliu y Slobodianik, 2002), 2) Camada alimentada por una madre desnutrida (Araújo y col., 2010) y 3)

Reducción de la cantidad de alimento disponible al incrementar el número de crías que compiten por ser alimentadas por una nodriza y con ello, la cantidad de leche consumida por cría es menor (Ortiz y col. 1999). El laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la UAM-Iztapalapa, ha utilizado este último método para estudiar los efectos de la desnutrición, evidenciando que se trata de un método eficaz y reproducible para inducirla, presentando ventajas: Provee altas cantidades de ratas desnutridas de segundo y tercer grado, con bajo índice de mortandad (Ortiz y col. 1999), las ratas con desnutrición grave muestran signos, como pelo escaso, fragilidad en los huesos y poca actividad motora, semejantes a lo observado en niños con condiciones nutricionales similares, pero sobretodo con este método se han determinado diversos efectos de la desnutrición en el Sistema Inmunológico que se extrapolan a la deficiencia inmunológica observada en los niños menores de cinco años que la padecen (Ortiz y col. 2000).

2.4 EFECTOS DE LA DESNUTRICIÓN INFANTIL A NIVEL INMUNOLÓGICO

2.4.1 COMPOSICIÓN Y FUNCIÓN DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO

El Sistema Inmunológico (SI) comprende los mecanismos de defensa biológicos destinados a mantener la integridad estructural y funcional de los individuos, mediante la neutralización y eliminación de agentes infecciosos, células y moléculas extrañas como detritus y productos moleculares de células propias envejecidas o tumorales al reconocer algunas partes expuestas en su superficie, denominadas epítomos o

determinantes antigénicos. El SI consta de varios tipos de moléculas, células y órganos, diseñados para generar estas reacciones de defensa (Abbas y Lichtman, 2008; Roitt, 2008).

a) Mecanismos de defensa inmunológica

La respuesta inmunológica inicia con el reconocimiento o primer contacto con el patógeno o del material extraño, desencadenándose las diversas reacciones para eliminarlo. Dichas reacciones se dividen en dos categorías: respuestas inmunológicas innatas (o no adaptativas) y las respuestas inmunológicas adquiridas o adaptativas (Bonham y col., 2002).

Primera línea de defensa. Constituida por barreras físicas y químicas, como son la piel y las mucosas (nasal, intestinal, etc.), sus secreciones (pH ácido del estómago, lisozima, y otros componentes antibacterianos del sudor y otras secreciones) y la flora autóctona protectora. Una vez que los patógenos han atravesado esta primera barrera, el sistema inmunitario pone en marcha los mecanismos de defensa activa (Palomo y col., 2009; Rytter y col., 2014).

Respuesta inmunológica innata. Cuenta con células fagocíticas, que incluyen a los granulocitos –neutrófilos, basófilos y eosinófilos– monocitos y macrófagos. Su sistema de reconocimiento es de baja especificidad, funciona a través de mecanismos estándar de ingestión y destrucción, sin necesidad de que haya habido una exposición previa al patógeno y, por tanto, actúa de forma rápida y no se modifica tras la exposición repetida a un determinado agente infeccioso. Esto les permite unirse a una amplia variedad de productos microbianos (Palomo y col., 2009; Rytter y col., 2014).

Por otro lado, dicha respuesta no sólo cumple su función defensiva poco después de una infección, sino que también advierte de esta “invasión” o daño celular con el objetivo de organizar una respuesta inmunológica adaptativa posterior. Por ende, los distintos componentes de la respuesta inmunológica innata suelen reaccionar de un modo diferente contra los diversos patógenos (p. ej., las bacterias o los virus) y esto direccionará el tipo de respuesta inmunológica adaptativa que se requiera (Palomo y col., 2009; Rytter y col., 2014).

Respuesta inmunológica adaptativa. Incluye células más especializadas, los linfocitos, que actúan mediante un reconocimiento específico del microorganismo que ha invadido el organismo y la generación de clones de células (células de memoria) que responden de forma específica frente al invasor en cuestión. Este tipo de respuesta no aparece de forma tan rápida, pero es más efectiva, se basa en la actividad de dos sistemas: humoral y celular. La inmunidad humoral está mediada por proteínas solubles llamadas inmunoglobulinas o anticuerpos, producidas por las células plasmáticas. La inmunidad celular recibe este nombre debido a que sus mediadores son células, a diferencia de la inmunidad humoral cuyos mediadores son moléculas. Las células T o linfocitos T, son los principales efectores de la inmunidad celular (Abbas y Lichtman, 2008).

b) Origen de las células que participan en la respuesta inmunológica

Las células del sistema inmunitario se forman a partir de las células hematopoyéticas pluripotentes, mediante dos principales vías de diferenciación:

- La estirpe linfoide da lugar a linfocitos.

- La estirpe mieloide da lugar a los fagocitos (monocitos, macrófagos y granulocitos y las plaquetas).

Los linfocitos se clasifican en linfocitos T, linfocitos B y células asesinas (NK, del inglés natural killer). Las células T se desarrollan a partir de precursores en el timo, mientras que las células B se diferencian en el hígado fetal y en la médula ósea de los adultos. Estos órganos en los que se diferencian los linfocitos se denominan órganos linfoides centrales o primarios. En ellos, los precursores de las células T y B adquieren la capacidad para reconocer antígenos, mediante la adquisición de receptores de superficie específicos (Abbas y Lichtman, 2008; Rodak, 2005).

Los linfocitos se producen a diario en grandes cantidades en estos órganos linfoides centrales y algunas de estas células migran hasta los órganos linfoides periféricos o secundarios (bazo, ganglios linfáticos, amígdalas y tejido linfoide asociados a mucosas) a través del torrente sanguíneo. Las células linfoides constituyen del 20% al 40% de los leucocitos circulantes totales. Muchas células linfoides maduras son de vida larga y pueden persistir como células de memoria durante varios años o incluso durante toda la vida del individuo (Abbas y Lichtman, 2008; Rodak, 2005).

Los linfocitos T se dividen a su vez en “cooperadores” (o helper; se distinguen por la presencia de la molécula CD4 en su superficie) y “citotóxicos/supresores” (caracterizados por la molécula CD8 en su superficie); ambos participan en la inmunidad mediada por células o inmunidad celular. Cada una de estas subpoblaciones tiene diferencias importantes en su función. Los linfocitos T CD8+ tienen una actividad citotóxica, puesto que se encargan de matar células que muestran moléculas extrañas

en su superficie, cumpliendo así un papel importante en las infecciones virales (Parslow y col., 2002). En cambio, los linfocitos T CD4+ promueven la proliferación, maduración y función inmunológica de otros tipos celulares, a través de citocinas que tienen propiedades hormonales (Parslow y col., 2002). Los linfocitos T CD4+ se subdividen a su vez en subclases, que se distinguen con base en su función y las citocinas que producen (Parslow y col., 2002; Rodríguez, 2005). La subclase más conocida son los Th1, que producen INF- γ , IL-2 y TNF- β , y los Th2, que producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-12 (Mosmann, 1991; Mosmann, y col., 1986). Durante los últimos años se han añadido a la lista más fenotipos efectores diferenciados estables (Mosmann y col., 2009; Reiner, 2007).

Los linfocitos B sintetizan las inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos, componentes fundamentales de la inmunidad humoral. Estas inmunoglobulinas son moléculas que circulan solubles en el plasma e infiltran los tejidos, pero son producidos por los linfocitos B o las células plasmáticas en los ganglios linfáticos. Incluso algunos anticuerpos pueden proceder de antiguas células de memoria (Rytter y col., 2014; Karim y Fadi, 2015).

La tercera población de linfocitos, las células NK no expresan receptores de antígeno, por lo tanto, carecen de especificidad y de memoria por lo que son incluidas dentro de la inmunidad inespecífica. Estas células proceden de precursores linfoides de la médula ósea, morfológicamente presentan el aspecto de linfocitos granulosa grandes. Tienen acción citotóxica y regulan la respuesta inmunológica a través de las citocinas que producen (Rytter y col., 2014; Vivier y col., 2008).

c) Activación de los linfocitos

Las células T y B se activan cuando se unen a sus antígenos específicos. Las células T necesitan detectar al antígeno asociado a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de las células presentadoras de antígeno, mientras que las células B son capaces de unirse a antígenos libres, pero suelen necesitar la colaboración de células T para ser activados, salvo en el caso de ciertos antígenos polímeros o moléculas con capacidad intrínseca mitogénica (Jenkins y col., 2001).

Los linfocitos B y los linfocitos T presentan receptores para antígenos específicos, como son la IgM de membrana que forma parte del BCR (Receptor de células B) y el TCR (Receptor de células T), respectivamente. Para que se produzca la activación de las células T y B, además de la unión específica del antígeno a las células T y B, es precisa la intervención de otras moléculas de superficie como CD28 para las células T. La activación y la proliferación inducidas por el antígeno se suelen producir en los tejidos linfoides (LeBien y Tedder, 2008).

La interacción entre un linfocito en reposo y un antígeno desencadena una serie de acontecimientos bioquímicos tempranos, que conducen a la formación de “segundos mensajeros” en el seno de la célula B o T, induciendo cambios a nivel del ADN celular. Varias vías importantes están implicadas en la activación linfocitaria, de inicio se activan tirosina cinasas citoplásmicas, estas fosforilan a moléculas adaptadoras e inician la cascada de señalización (Cantrell, 2003). La fosfolipasa C γ (FL γ C o PL γ C) se activa en este proceso y rompe al fosfatidilinositol (PIP) para liberar diacilglicerol (DAG) y

trifosfato de inositol (IP3), esto a su vez inicia dos vías de señalización (Billadeau y col., 2007).

El DAG activa a la vía de la proteína cinasa C (PKC), que dirige la fosforilación de varios sustratos intracelulares y se induce la expresión de genes importantes en la respuesta del linfocito T. Por otro lado, el IP3 activa a su receptor en el retículo endoplásmico, que favorece la liberación de Ca^{2+} al citoplasma (Winslow y col., 2003). La señal de calcio activa a la calcineurina fosfato dependiente de Ca^{2+} /calmodulina. La calcineurina desfosforila al factor de transcripción NFAT lo que permite que se acumule en núcleo y que una promotores del gen de la interleucina 2 (IL-2) (Cahalan y Chandy, 1997; Panyi y col., 2004). Esto último incrementa la secreción de esta hormona linfoftrófica implicada en la generación de fenotipos efectores de las células T estimuladas por el antígeno y a su proliferación y maduración (Figura 1).

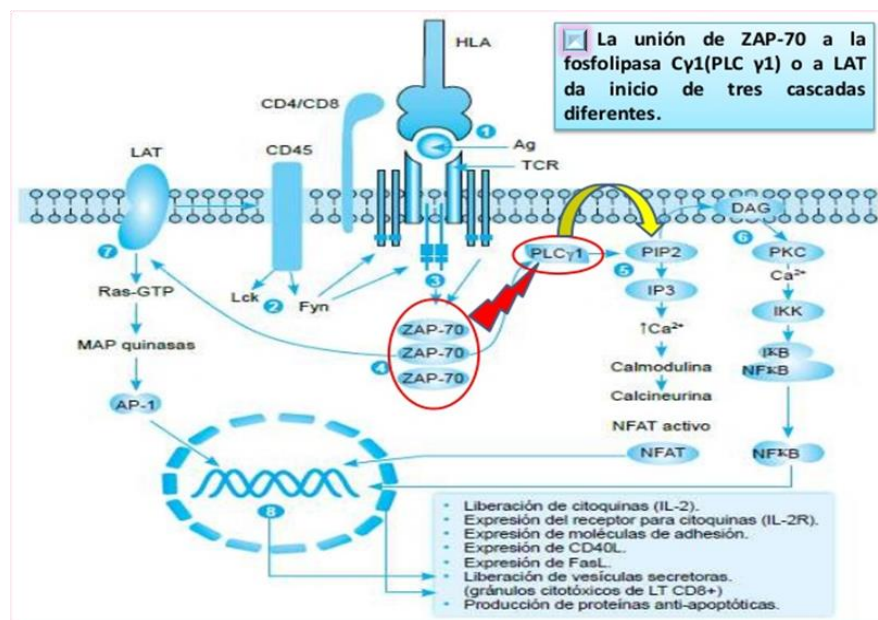


Fig. 1. Sinapsis inmunológica. Tomada de: Orozco, 2015.

d) Órganos linfoides (Timo y Bazo)

El sistema linfoide está organizado en forma de órganos encapsulados aislados y con acumulaciones de tejido linfoide difuso. Se clasifica en órganos y tejidos linfoides primarios (centrales) y secundarios (periféricos) (Palomo y col., 2009).

Los órganos linfoides primarios: Timo y médula ósea; son los lugares en los que se produce mayoritariamente la linfopoyesis (producción de linfocitos). En ellos, se encuentra el microambiente idóneo para que los linfocitos se diferencien a partir de células madre linfoides, proliferan y dan lugar finalmente, a células maduras funcionales, al adquirir el repertorio de receptores específicos de antígeno, que utilizarán para enfrentarse a los antígenos con los que se encuentren a lo largo de su existencia (Palomo y col., 2009).

Los órganos linfoides secundarios son el bazo, los ganglios linfáticos y los tejidos asociados a mucosas. Estos órganos proporcionan a los linfocitos el entorno para interactuar entre sí, con las células accesorias y con los antígenos. Para que se produzca una respuesta inmunológica en los órganos linfoides secundarios es necesaria la presencia de macrófagos fagocíticos, células presentadoras de antígenos (CPA) y células T y B maduras (Palomo y col., 2009).

Timo. El timo de los mamíferos es un órgano bilobulado, situado en la cavidad torácica, por encima del corazón y los grandes vasos sanguíneos. Cada uno de sus lóbulos principales está compuesto a su vez de lobulillos, separados a su vez por trabéculas de tejido conjuntivo. En cada uno de estos lobulillos, las células linfoides (timocitos) se

encuentran distribuidas en una corteza de gran densidad celular y una médula de menor densidad celular. Existe un gradiente de maduración de estas células tímicas que van desde las más inmadura en la corteza hasta las que se encuentran en una etapa de maduración más tardía en la médula. Tanto en la corteza como en la médula se encuentra una red de células no linfoides que constituyen el estroma tímico, y que consta de varios tipos celulares:

- Células reticuloepiteliales: 1) Células nodriza (tipo I y II), 2) Células corticales epiteliales (tipo III y IV) y 3) Células medulares epiteliales (tipo V y VI).
- Células dendríticas interdigitantes sobre todo en el límite córtico-medular.
- Macrófagos, con una localización similar a las dendríticas.

Todas estas células no linfoides del estroma expresan en sus superficies moléculas CMH de tipo I y/o II, y participan en la maduración y selección de los timocitos hacia células T maduras (Abbas y Lichtman, 2008; Zdrojewicz y col., 2016).

El timo desarrolla su máxima actividad durante los primeros años de vida, lo que se refleja en la producción de linfocitos que, en un individuo de 35 años de edad, corresponde al 20% de la generada en el neonato. Conforme avanza la edad, disminuye el número de linfocitos T vírgenes, por lo que la respuesta inmunológica celular en etapas avanzadas depende, principalmente, de los linfocitos T de memoria (Abbas y Lichtman, 2008; Zdrojewicz y col., 2016)

Bazo. El bazo es el mayor de los órganos linfoides ubicado dentro de la cavidad abdominal. Tiene dos tipos de tejidos, el que corresponde a la pulpa blanca está

constituido por una arteriola central cubierta con una vaina de tejido linfoide periarteriolar, los linfocitos T se encuentran alrededor del vaso sanguíneo y las células B confluyen y forman folículos primarios. En el sitio de transición entre ambas zonas hay un gran número de macrófagos que presentan antígenos a los linfocitos y fagocitan células deterioradas, principalmente eritrocitos. La otra zona del bazo denominada pulpa roja está integrada por sinusoides vasculares que finalmente conectan con la vena esplénica, lo que permite la salida de la sangre que ingresa, constantemente, a través de la arteria. El bazo filtra sangre de manera similar a como los ganglios filtran linfa, y este mecanismo es uno de los más efectivos para depurar al organismo de gérmenes que de alguna manera llegan a la circulación. Cada día la mitad del volumen sanguíneo corporal total pasa por este órgano y en él se lleva a cabo la fagocitosis, no sólo de antígenos sino también de células senescentes o dañadas (Bronte y Pittet, 2014).

A grandes rasgos podemos ver que el timo como órgano central del sistema inmunológico y el bazo como órgano de mayor tamaño del sistema linfático; son de vital importancia para el individuo para la producción, maduración, diferenciación y activación de los linfocitos, células indispensables para combatir diferentes antígenos extraños que puedan invadir el organismo. Por lo tanto, defectos en uno o más de los componentes del SI conlleva a enfermedades graves, ocasionalmente fatales y una nutrición inadecuada influye adversamente sobre la mayoría de las funciones inmunológicas (Palomo y col., 2009; Cunningham y col., 2005).

2.4.2 EFECTOS DE LA DESNUTRICIÓN EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA

La desnutrición calorífico-proteínica causa atrofia generalizada de los tejidos linfoides, fundamentalmente en niños. El timo, el bazo, las amígdalas, las placas de Peyer y los nódulos linfáticos se ven seriamente afectados; por lo tanto, además de las primeras barreras de defensa, las respuestas inmunológicas: innata y adaptativa, se ven también gravemente comprometidas (Cortés y col., 2013).

a) Efecto de la desnutrición en la primera línea de defensa

Se ha observado que la DCP altera la integridad tisular de la piel y de las mucosas. No solo se altera la permeabilidad de la piel sino se reduce la secreción de las mucosas y algunas de ellas pierden los cilios (ej. mucosa respiratoria). En la mucosa gastrointestinal se ha observado reducción de la secreción de ácido gástrico que conduce a una mayor susceptibilidad a algunos patógenos (Peterson y Artis, 2014). Por ejemplo, una dieta deficiente en proteínas, zinc, vitamina A o folato altera la tasa de proliferación celular y la replicación del ADN en el epitelio intestinal lo que hace que este tejido sea particularmente vulnerable. Un modelo de cerdo con retraso del crecimiento severo (cerdos alimentados únicamente con harina de maíz) mostró que la desnutrición condujo a la atrofia de la mucosa del intestino delgado (Lykke y col., 2013). Ratas sometidas a una dieta baja en proteínas sufrieron alteración de la proliferación de células epiteliales gástricas (Kasai y col., 2012). La interrupción de la barrera epitelial intestinal se asocia con una pérdida de tejido linfoide y una microbiota intestinal alterada (Mondal y col., 2012), las cuales influyen en el riesgo de infección entérica. Dawson y Blapg (1950) probaron la actividad bactericida de la saliva de niños desnutridos y niños

eutróficos contra diversos agentes microbianos y reportaron que la saliva de los primeros casi no poseía actividad antibacteriana en relación a la de los controles sanos.

Las deficiencias de nutrientes también conducen a diversas manifestaciones dermatológicas (Heath y Sidbury, 2006.). Según Ibrahim y col., 2017, no hay estudios que hayan evaluado el riesgo de infección cutánea en niños desnutridos. Sin embargo, se puede suponer que los cambios cutáneos relacionados con la desnutrición, especialmente el edema, la descamación y la dermatosis grave de "escamas" de kwashiorkor, predisponen a la entrada de patógenos e infecciones. Estudios experimentales en animales identificaron el efecto de la desnutrición en la barrera física de la piel. El adelgazamiento de la dermis y la reducción de los niveles de colágeno fueron evidentes en ratas alimentadas con dietas bajas en proteínas o (Leite y col., 2011). La desnutrición también tiene una influencia perjudicial sobre la curación de heridas, ya que ratas que recibieron restricción de proteínas en la dieta mostraron una cicatrización tardía de la herida que incluía contracción de la herida deteriorada, mayor número de células inflamatorias, deposición de colágeno deficiente, una matriz extracelular edematosa, etc. (Mechanick, 2004).

b) Desnutrición y la respuesta inmunológica innata

Varios estudios en humanos y estudios experimentales en animales han identificado déficits en la función inmunológica innata relacionados con la desnutrición. Hay gran impacto de la DCP en la función del complemento y las células inmunológicas innatas; monocitos/macrófagos, los neutrófilos, las células NK y las células dendríticas (CD) (Reid y col., 2002; Abe y col., 2003; Ibrahim y col., 2013).

En los mediadores inflamatorios sanguíneos, complemento, y proteínas de fase aguda:

La respuesta de fase aguda es una respuesta sistémica a la infección u otras causas de inflamación. Conduce a la supresión del apetito y al balance energético negativo. Los niños con desnutrición severa a menudo tienen una respuesta febril leve a la infección. De acuerdo con esta observación clínica, algunos estudios han informado sobre la producción reducida de proteínas de fase aguda y citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF) en niños con kwashiorkor y marasmo (Jahoor y col., 2008; Reid y col., 2002).

En monocitos/macrófagos: Varios estudios clínicos y experimentales en animales demostraron un número reducido de monocitos y macrófagos en huéspedes desnutridos. Infantes menores de un año con DCP presentaron niveles elevados del marcador apoptótico CD95 (Fas) en neutrófilos, linfocitos y monocitos de sangre periférica, que disminuyeron después de la rehabilitación nutricional (Nassar y col., 2009). Esto sugiere que la vida útil de los monocitos se reduce en niños desnutridos. Se determinó que ratones con deficiencia proteínica tenían un número reducido de monocitos sanguíneos circulantes (Cunha y col., 2013). Ratones con una dieta deficiente en diferentes nutrientes (proteína, hierro y zinc) tuvieron un número reducido de macrófagos residentes (subcorticales) y del seno subcapsular en sus ganglios linfáticos en comparación con los de los controles bien alimentados (Ibrahim y col., 2013). Las ratas expuestas a la restricción de proteínas en la dieta durante la lactancia tenían menos macrófagos alveolares (de Melo y col., 2013).

La función efectora de macrófagos también se ve reducida en el huésped desnutrido. Los macrófagos peritoneales de ratones con DCP mostraron una fagocitosis alterada (Redmond y col., 1991) y disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno y en la producción de óxido nítrico (Andstead, 2003).

Neutrófilos. La quimiotaxis de los neutrófilos y la actividad microbicida se ve deteriorada en niños con DCP (Nayak y col., 1989). Se han observado deficiencias en la síntesis de enzimas lisosomales y una actividad glucolítica reducida en neutrófilos de niños desnutridos (José y col., 1975). El ácido retinoico juega un papel crítico en la maduración de los neutrófilos. Los neutrófilos de ratas deficientes de vitamina A mostraron quimiotaxis deteriorada, fagocitosis y generación de especies reactivas de oxígeno (Twining y col., 1997). Una dosis única de suplementos de vitamina A mejoró la capacidad fagocítica de los neutrófilos en 68 niños en edad preescolar evaluados en una clínica de nutrición venezolana (el 25% tenía deficiencia de vitamina A) (Jiménez y col., 2010). Ratas deficientes en folato también tuvieron un número menor de neutrófilos y eosinófilos (Abe y col., 2013). A la inversa, se demostró que las ratas con deficiencia de zinc aumentaron los recuentos de neutrófilos en circulación, lo que probablemente fue el resultado de un aumento de los niveles de corticosterona y una mayor liberación de la médula ósea (Someya y col., 2009). Los recuentos de granulocitos circulantes (y los niveles elevados de corticosterona) volvieron a la normalidad después de 2 semanas de alimentación con una dieta con suficiente zinc (Sakakibara y col., 2011).

Células asesinas naturales (NK, Natural Killer). Los niños de 8 a 36 meses de edad con desnutrición moderada o grave no mostraron una disminución en el número de células

NK circulantes pero si su actividad (Salimonu y col., 1982) la cual fue recuperada con intervención nutricional terapéutica (Salimonu y col., 1983). El número de células NK y la actividad citotóxica se redujeron en los pulmones y el bazo de ratones con restricción energética en respuesta a la infección por el virus de la influenza (Ritz y col., 2008). El número y la actividad de las células NK esplénicas también se redujeron en ratas deficientes en vitamina A y se normalizaron después de la reposición de esta vitamina (Bowman y col., 1990). El número total de células NK y su citotoxicidad se redujeron en ratas alimentadas con una dieta deficiente en folato (Kim y col., 2002).

Células dendríticas (CD). Los niños gravemente desnutridos de Zambia tuvieron un número reducido de CD que se recuperaron después de un tratamiento nutricional (Hughes y col., 2009). En una subpoblación de estos niños con evidencia de endotoxemia, las CD mostraron una maduración deficiente (incapacidad para regular el HLA-DR (Human Leukocyte Antigen – DR isotype)) y una capacidad reducida para estimular la proliferación de células T (Hughes y col., 2009). El efecto de la DCP en la capacidad de presentación de antígeno de DC y la inducción de la activación de las células T se encontró que era nula o deteriorada (Abe y col., 2003; Niiya y col., 2007).

c) Desnutrición y alteraciones en la respuesta inmunológica adaptativa

La inmunidad adaptativa o adquirida se caracteriza por respuestas inmunitarias celulares y mediadas por anticuerpos, generadas por los linfocitos T y B, respectivamente. Estas respuestas reaccionan con alta especificidad hacia patógenos y crean una memoria inmunológica de larga duración. El sistema inmunitario adquirido también orquesta la tolerancia hacia lo propio y a otros materiales no patógenos como

la microbiota intestinal (Murphy, 2012). Diferentes artículos describen el efecto de la desnutrición en la inmunidad adquirida; hablan en general del sistema timo-linfático, de la respuesta de hipersensibilidad retardada, de linfocitos circulantes, de inmunoglobulinas en la sangre y citocinas, etc (Rytter y col., 2014; Ibrahim y col., 2013).

Timo. Se ha determinado que el timo es el barómetro de la desnutrición, este órgano linfático central se ve gravemente afectado por esta condición nutricional. En recién nacidos y niños preescolares la DCP provoca atrofia en el timo, asociada a la disminución celular y un mal desarrollo de los órganos linfoides periféricos (Savino, 2002). Esto inicia una cadena de defectos inmunológicos caracterizados por leucopenia, disminución de la proporción de linfocitos T CD4+ y CD8+ e incremento del número de células T doble negativas e inmaduras en la periferia (Schaible y Kaufmann, 2007). Se observa, además una relación directa entre la desnutrición, la supresión de la respuesta inmunológica y la infección (Keusch, 2003).

Estudios de autopsia en niños desnutridos describen atrofia tímica profunda, agotamiento de timocitos y una alteración de la matriz extracelular (Lyra y col., 1993). Sin embargo, muchos de estos niños murieron a causa de infecciones graves, que en sí mismo es la causa de atrofia tímica aguda (Savino y col., 2007).

El agotamiento de los timocitos relacionados con la desnutrición y la infección es causado por el aumento apoptosis de las poblaciones de timocitos CD4-CD8- (doble negativas) y CD4+CD8+ doble positiva (Ortiz y col., 2008). La reducción de la proliferación de timocitos también contribuye a la hipocelularidad del timo (Mitsumori., 1996). Las deficiencias en proteínas dietéticas y zinc conducen a apoptosis de timocitos

(Nodera y col., 2001). La apoptosis de timocitos durante la desnutrición es impulsada por niveles elevados de glucocorticoides circulantes (Barone y col., 1993) y niveles reducidos de leptina (da Silva y col., 2013). El tratamiento con leptina a ratas desnutridas a causa de una dieta deficiente en proteínas disminuyó la apoptosis de timocitos (Howard y col., 1999).

Linfocitos T. Resultados en niños desnutridos hospitalizados con infección bacteriana no mostraron diferencias en el número de linfocitos T CD8 + y CD4 + en sangre (Nájera y col., 2004), pero tenían números reducidos de linfocitos T de memoria CD4 + CD45RO + (Nájera y col., 2001) y números reducidos de subconjuntos de linfocitos T efectoras (CD4 + CD62L- y CD8 + CD28-) (Nájera y col., 2007). Niños anémicos con deficiencia de vitamina A mostraron aumentos notables en el número total de linfocitos T CD4 + y linfocitos T CD8 + después de la suplementación con vitamina A (de Azevedo y col., 2010). De acuerdo a estos datos y que la desnutrición altera la función de las células presentadoras de antígenos, podría ser que la respuesta adaptativa de las linfocitos T es imposibilitada no debido a un cambio intrínseco en la función de las linfocitos T. Estudios en células mononucleares de sangre periférica de niños desnutridos con infección bacteriana tuvieron niveles reducidos de citocinas clave requeridas para la diferenciación Th1 (IL-7, IL-12, IL-18 e IL-21) y la función (IFN- γ e IL-2) (Badr y col., 2011; González y col., 2013) y sobreexpresión de las citocinas Th2 IL-4 e IL-10 (González y col., 2008). Estudios en ratones con dieta restringida de proteínas condujo a atrofia esplénica con números variables de linfocitos T (Taylor y col., 2013, Cuervo y col., 2014). Ratas con DCP y deficiencia de zinc presentaron disminución en el nivel de

producción de linfocitos T CD4+CD8+ inmaduras debido a una mayor tasa de apoptosis de estos timocitos y una menor capacidad proliferativa (Ortiz y col., 2008). La capacidad de linfocitos T para responder a los estímulos inflamatorios también se ve afectada negativamente por la desnutrición. La desnutrición grave inhibe la activación de las células T dependientes del metabolismo de la glucosa (proliferación y producción de citoquinas) (Saucillo y col., 2014; Jacobs y col., 2008). La activación *in vitro* de células T de ratones en ayunas durante 48 h mostró un deterioro en la producción de las citocinas Th1 IL-2 e IFN- γ que fueron recuperadas por leptina exógena (Saucillo y col., 2014).

Linfocitos B y la respuesta de anticuerpos. Niños desnutridos con infección bacteriana respiratoria o gastrointestinal presentaron un número reducido de linfocitos B en comparación con niños infectados bien nutridos (Nájera y col., 2014). La función de los linfocitos B generalmente parece mantenerse en niños con DCP, aunque la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos específicos puede verse afectada. Los niveles de inmunoglobulinas de tipo Th2 (IgG1 e IgE) aumentan, mientras que los niveles de inmunoglobulinas de tipo Th1 (IgG2a e IgG3) no se modifican (Neyestani y Woodward, 2005). Se reducen los números de células secretoras de IgA y las concentraciones de IgA secretora (Green y Heyworth, 1980, 59). Sin embargo, la administración oral del probiótico *Lactobacillus pentosus* a ratones deficientes en proteínas restauró los niveles de IgA intestinal y el número de células esplénicas B y Th2 a los niveles de los controles (Shimosato y col., 2011). Esto sugiere que la desnutrición media su efecto sobre la inmunidad de la mucosa al afectar la microbiota intestinal. Ratas deficientes en folato

tuvieron un número menor de células B y T que las de los controles (Abe y col., 2013). Ratonés deficientes en vitamina A produjeron una respuesta deficiente de IgG que se restauró con la reposición de vitamina A (Chun y col., 1992).

La DES provoca disminución tanto de linfocitos circulantes como tisulares, las respuestas cutáneas de hipersensibilidad retardada están disminuidas en proporción a la severidad de la DES. La respuesta proliferativa de los linfocitos T se encuentra alterada en forma variable.

d) Efectos de la desnutrición sobre la síntesis de citocinas

Investigaciones previas han demostrado que en la DCP, la actividad de los macrófagos se encuentra alterada, hay disminución en la fagocitosis y en la producción de citocinas (IL-1 e IL-6). También se ha demostrado que en células mononucleares de sangre periférica de niños desnutridos, existe disminución en la síntesis de IL-1 (Palacio y col., 2002).

En 2005, Rodríguez y col., reportaron disminución en la síntesis de IL-2 e IFN- γ y aumento de IL-4 e IL-10 en sangre periférica de niños desnutridos. Trabajos realizados con cobayos desnutridos han demostrado que la producción de varias citocinas, incluyendo TNF- α , interferón y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) está reducida. Otro estudio muestra que existe disminución significativa en el contenido de IL-6 en el sobrenadante de cultivos de células mononucleares de sangre periférica de niños desnutridos (Ortiz y Rodríguez, 2008).

2.5 AGENTES INMUNOMODULADORES

La actividad inmunomoduladora es un término general que indica un efecto biológico o farmacológico sobre los factores humorales o celulares que actúan en la respuesta inmunológica. Desde tiempos antiguos se han utilizados productos naturales capaces de modificar la respuesta inmunológica. La modulación del SI a través de su estimulación o supresión puede contribuir al mantenimiento de un buen estado de salud (Tan y Vanitha, 2004; Chin y col. 2006). Numerosas moléculas estimulantes del sistema inmunológico han sido aisladas de plantas y de hongos superiores, y con ello han abierto las puertas para el desarrollo de fármacos novedosos. Algunos de los ensayos utilizados más frecuentemente para detectar la actividad inmunomoduladora de extractos son: Evaluación de fagocitosis, ensayo proliferación linfocítica, ensayos para determinar la producción de diferentes citocinas, etc. (Sánchez y col., 2002).

2.6 *Urtica dioica* L.

La planta herbácea *Urtica dioica* L. (Urticaceae), es de importancia económica debido a sus potenciales medicinales, nutritivos y textiles. Es de distribución amplia, principalmente en América, Europa y Asia (Kavalali, 2003; Rafajlovska y col., 2013). En México, es conocida como Ortiga, Chichicastle, Mala mujer, etc., se localiza en los estados de Hidalgo, Jalisco, Morelos, Puebla, Oaxaca (Espinosa y Sarukhán, 1997; Villaseñor y col., 1998;).

2.6.1 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

Urtica dioica L. es una hierba anual o perenne que alcanza hasta un metro de altura. Debido a su rizoma, vuelve a surgir año tras año, generando un tallo de sección cuadrada y color ligeramente rojizo. Tanto el tallo como las hojas se encuentran cubiertos por tricomas urticantes. Las hojas son redondas o alargadas con el borde aserrado. Las flores son verdes, pequeñas y agrupadas en espigas que salen de las axilas de las hojas. Los frutos son aquenios, ovoides de color café (Villaseñor y col., 1998; Espinosa y Sarukhán, 1997; Kavalali, 2003).

2.6.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Se ha descrito una gama amplia de metabolitos de la raíz y de las estructuras aéreas de *Urtica dioica* (UD), incluyendo flavonoides y fenilpropanoides.

En los pelos urticantes se ha reportado la presencia de ácido fórmico, acetilcolina, serotonina e histamina.

En las flores y hojas de UD se han identificado algunos flavonoides glucósidos como: rutina, isoquercetina, quercetina, kampferol. Farag y col., (2013) identificaron 43 compuestos del aceite esencial de las estructuras aéreas de UD, entre ellos: hexanal, nonanal, linalool, octanol, carvona, carvacrol, fitol, etc. Se ha determinado la presencia de clorofilas, ácidos grasos, ácido caféico, los ácidos; acético, butírico, cítrico, fórmico, fumárico, ascórbico y proteínas, aceites esenciales, taninos, mucílagos (Konrad y col., 2000; Güil y col., 2003), vitaminas A, B₁, B₂, C, ácido fólico, ácido pantoténico, además

de minerales; hierro, azufre, magnesio, manganeso, cobre, zinc, cobalto, sales potásicas y cálcicas, nitratos (ESCOP Monographs, 2003; Rafajlovska y col., 2013).

En la raíz de UD se han encontrado ácido oleanólico, 3- β -sitosterina, escopoletina, neolivil y glucósidos (Schilcher y Effenberger, 1986; ESCOP Monographs, 2003). Peumans y col., (1984) aislaron una lectina: *Urtica dioica* aglutinina (UDA), además de compuestos activos, tal como: fitosteroles, triterpenos, lignanos, cumarinas, ceramidas, ácidos grasos que fueron aislados de la fracción lipofílica de la raíz de UD, estos hallazgos se consideran muy importantes farmacológicamente.

2.6.3 USOS Y PROPIEDADES MEDICINALES

De *Urtica dioica* L. se utiliza la planta completa, las hojas, los frutos o la raíz. Tiene propiedades nutritivas, medicinales y textiles. Tradicionalmente se emplea para tratar: afecciones genitourinarias (cistitis, uretritis, urolitiasis, nefritis), adenoma benigno de próstata, gota, hipertensión arterial, edemas, afecciones de la piel (acné, quemaduras, úlceras cutáneas, alopecia), diabetes, anemia (por déficit vitamínico o mineral), sangrados internos, afecciones del tracto gastrointestinal (diarrea, disentería e hiperacidez gástrica), alergias, dolores músculo-esqueléticos, osteoartritis (Hirano y col., 1994; Gülcin y col., 2004).

2.6.4 PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y FARMACOLÓGICAS

Se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo*, pre-clínicos y clínicos de *Urtica dioica* L. Moderresi-Chahardehi y col. (2012) reportan actividad antimicrobiana de nueve

extractos crudos de sus estructuras aéreas pero no actividad antifúngica. El extracto acuoso de las estructuras aéreas de la planta tiene actividad antioxidante, antiulcerosa y analgésica (Gülcin y col., 2004). Las partes subterráneas (raíz y rizomas) han sido objeto de investigación en el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata. Se reporta que el extracto de la raíz de UD tiene efecto antiproliferativo sobre cáncer de próstata (Konrad y col., 2000).

2.6.5 ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA *IN VITRO*

En 1997, Basaran y colaboradores reportaron la actividad inmunomoduladora de *Urtica dioica* L. sobre la quimiotaxis y la integridad metabólica de neutrófilos. En el 2003, Akbay y Basarán aislaron algunos compuestos del extracto metanólico de las partes aéreas de *Urtica dioica* L., estudiaron la actividad inmunomoduladora de éstos *in vitro* y establecieron que dichos compuestos tienen efecto quimiotáctico significativo, lo que sugiere que posiblemente podrían ser útiles para el tratamiento de pacientes que sufren de deficiencia de la función de neutrófilos. En el 2011, Tapia y col., reportaron la actividad hematopoyética de *Urtica dioica* L. sobre células de bazo de ratón.

III. JUSTIFICACIÓN

La desnutrición es un problema de Salud Pública en países subdesarrollados, es una preocupación prioritaria para los servicios de salud dada su repercusión en las cifras de mortalidad infantil y de eventuales secuelas en edades posteriores. Por lo que ha sido

y sigue siendo de gran importancia conocer los efectos producidos por esta condición. Diversos estudios muestran que los niños desnutridos presentan alteraciones en el sistema inmunológico lo que les provoca alta susceptibilidad a infecciones. Hoy en día, los compuestos con actividad farmacológica sobre el sistema inmunológico son de gran interés por su potencial terapéutico en el tratamiento de diferentes patologías. Las plantas y sus metabolitos pueden ser una fuente importante de compuestos inmunomoduladores. En este caso, *Urtica dioica* L., es un excelente candidato, ya que es de amplio uso medicinal, se comercializa como suplemento alimenticio en Estados Unidos, Europa y Asia. Además, esta planta es rica en compuestos y minerales con actividades biológicas diversas, por ello es necesario estudiar su efecto inmunomodulador en la desnutrición. El presente trabajo se considera importante evaluar el efecto inmunomodulador de la planta *Urtica dioica* L. sobre la proporción de linfocitos T y B, producción de citocinas, además de verificar si las células de ratas desnutridas son capaces de incrementar su capacidad proliferativa.

IV. HIPÓTESIS

La desnutrición grave en ratas lactantes afecta la respuesta inmunológica. Por lo tanto, la administración del extracto de *Urtica dioica* L. a ratas con desnutrición grave durante la lactancia, deberá restablecer los elementos de la respuesta inmunológica que se encuentren deteriorados en ellas.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad inmunomoduladora de *Urtica dioica* L. en células de timo, bazo y sangre de ratas desnutridas.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Desarrollar una curva dosis respuesta de *Urtica dioica* L. para determinar su efecto sobre la proliferación de linfocitos T de bazo de ratas desnutridas.
2. Determinar el contenido de polifenoles totales en la dosis de trabajo de *Urtica dioica* L.
3. Determinar el efecto de *Urtica dioica* L. sobre la proporción de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y T CD8+ en sangre y timo de ratas desnutridas.
4. Evaluar la proporción de leucocitos en sangre periférica de ratas desnutridas tratadas con *Urtica dioica* L.
5. Determinar la concentración de células nucleadas totales en médula ósea de ratas desnutridas tratadas con *Urtica dioica* L.
6. Evaluar la capacidad de proliferación de linfocitos T de bazo de ratas desnutridas tratadas con *Urtica dioica* L.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Animales de experimentación

Se emplearon crías de ratas Wistar de 1 día de edad y ratas Wistar nodrizas del Bioterio UAM-Iztapalapa, en condiciones controladas, con agua y alimento ad libitum. Los animales fueron cuidados y tratados de acuerdo con los estatutos del CICUAL (Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio), de la norma oficial mexicana para la producción y mantenimiento de animales de laboratorio (NOM-062-200-1999).

Material vegetal

- ***Urtica urens***. Decocción.
- **Stinging Nettle Leaf Extract** ©2013 Enzymatic Therapy, LLC Green Bay, WI 54311 USA. (Suplemento alimenticio de *Urtica dioica* L.). Su presentación es en cápsulas con polvo del extracto de hojas de *Urtica dioica* L.

6.2 REACTIVOS

Xilazina (Procin, México; CAS 23076-35-9), Cloruro de sodio (NaCl; Meyer, México; CAS 7647-14-5), Solución amortiguadora de fosfatos (PBS-DULBECO; Microlab, Mexico; MDL MFCD00131855), anticuerpos monoclonales: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45 (Biolegend, San Diego, CA, USA), Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo

Corp., Japan). Azul tripan; CAS 72-57-1, Concanavalina A (ConA); CAS 11028-71-0), Albumina bovina sérica (BSA; Cohn Fraction V, p.H. 7.0; CAS 9048-46-8, Paraformaldehído (PFA); CAS 30525-89-4 fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA).

6.3 MÉTODO

Colecta. La planta se colectó en Amecameca y municipios aledaños así como también en Toluca; sin embargo, no se encontró *Urtica dioica* L., las especies que se colectaron fueron *Urtica urens*, *Urtica dioica* variedad *angustifolia* Webb y *Urtica mexicana*. Además, se compraron diferentes ortigas en el Mercado Sonora de la Ciudad de México identificadas como *Urtica urens*. La identificación y autenticación taxonómica se realizó en el Herbario Metropolitano 'Ramón Riba' de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

U. urens es una planta que comparte el nombre común de Ortiga con *U. dioica* L., su morfología es semejante y tienen propiedades etnomedicinales similares, como plantas silvestres tienden a crecer en los mismos lugares, por lo que en ocasiones se les comercializa indistintamente. Sin embargo, *U. dioica* L. ha sido más estudiada científicamente (Ozkarsli y col., 2008; Marrassini y col., 2010). Con base a esta información, se decidió comparar el efecto de la decocción *Urtica urens* con el efecto del extracto de *Urtica dioica* L. (adquirida como suplemento alimenticio en Estados Unidos) sobre la capacidad de proliferación de células de bazo de ratas con desnutrición grave.

Preparación de la decocción. La planta se dejó secar a temperatura ambiente protegida del sol y del polvo, se utilizaron las hojas, se pulverizaron en un molino manual y se pesaron 270 g del material pulverizado, se agregó agua destilada en una relación 1:12 y se calentó a ebullición durante 15 minutos. Posteriormente, la mezcla obtenida se filtró con gasa y papel Whatman No. 42, se eliminó el agua hasta sequedad total por evaporación por baño María. Con el material sólido se prepararon soluciones de 0.2g/mL, 0.3 g/mL y 0.4 g/mL, para ser administradas a las ratas desnutridas, el resto se guardó en congelación.

Inducción de desnutrición por competencia de alimento. Se indujo desnutrición por competencia de alimento durante el periodo de lactancia, que comprende los primeros 21 días de vida. Se emplearon crías de ratas Wistar y ratas Wistar nodrizas, estas últimas son alimentadas con alimento balanceado para roedores (PMI 5008). Los lotes se formaron con crías de un día de edad. Las camadas de las ratas bien nutridas (C-BN) (Grupo control) fueron formadas con 7 crías por nodriza, y las camadas de ratas desnutridas (C-DN) con 16 crías por nodriza.

Se registró el peso de las ratas cada tercer día hasta el día 21 (periodo de lactancia) para identificar el grado de desnutrición en las ratas al destete, de acuerdo a:

- Primer grado o leve: son las que presentan un déficit de peso mayor al 10% y menor al 25%.
- Segundo grado o moderada: son las que presentan un déficit de peso mayor al 25% y menor del 40%.
- Tercer grado o grave: son las que presentan un déficit de peso del 40% o mayor.

Para este estudio se seleccionaron las ratas que presentaron desnutrición de tercer grado, es decir, que tuvieran déficit de peso igual o mayor al 40 %.

6.4 Estudio comparativo del efecto de la decocción de *Urtica urens* y el extracto de *Urtica dioica* L. sobre la capacidad de proliferación de células de bazo de ratas con desnutrición grave durante la lactancia

Se utilizaron ocho ratas desnutridas (DN) distribuidas aleatoriamente en tres grupos:

- 1) Tres ratas tratadas con la decocción de *Urtica urens* (DNUu).
- 2) Tres ratas tratadas con la solución del extracto de *Urtica dioica* L. (DNUd).
- 3) Dos ratas desnutridas sin tratamiento (DN)

Se incluyeron dos ratas bien nutridas sin tratamiento (BN).

Ambas plantas se probaron a la concentración de 0.2, 0.3 y 0.4 g/mL y se administraron vía intragástrica los días 14, 16, 18 y 20 del experimento. Los grupos BN y DN recibieron Solución Salina Fisiológica bajo el mismo esquema de inoculación. Al día 21, todas las ratas fueron anestesiadas con Xilazina (Procin, México) y sacrificadas por punción cardiaca. Se realizaron cultivos de células de bazo de estas ratas para determinar su capacidad de proliferación en presencia y ausencia de Concanavalina A (ConA). Además, se determinó el número de células nucleadas totales de médula ósea.

Este estudio comparativo entre el extracto acuoso de *Urtica urens* y el extracto de *Urtica dioica* L. permitió determinar la capacidad de ambas plantas para estimular la proliferación de linfocitos del bazo de rata *in vitro*. La actividad más alta y constante se

obtuvo con el extracto de *UD* a la concentración de 0.2 g/mL, por esta razón, el trabajo se continuó únicamente con *Urtica dioica* L.

6.5 Evaluación del efecto de *Urtica dioica* L. (0.2 g/mL) sobre la modulación de los elementos de la respuesta inmunológica en ratas con desnutrición grave

Bajo el mismo esquema de inducción de desnutrición grave (apartado 6.4), se administró *UD* a la concentración de 0.2 g/mL los días 14, 16, 18 y 20 del experimento. Al día 21, se extrajo la sangre (por punción cardíaca, con jeringas heparinizadas), el timo, el bazo y la médula ósea del canal medular del fémur derecho. Además, se registró el peso del bazo y del timo.

Distribución de los grupos:

- Bien nutridas
- Desnutridas tratadas con Solución Salina Fisiológica (SSF)
- Desnutridas tratadas con 0.2 g/mL del extracto de *Urtica dioica* L.

a) Determinación de subpoblaciones de timocitos

Se extrajo el timo, se obtuvieron las células homogeneizando dicho órgano y filtrándose a través de una malla de plástico, y las células se suspendieron en solución salina de fosfato libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (PBS, pH 7,0). La viabilidad celular se determinó con 0,2% de azul tripán y se ajustó a 1×10^7 células/mL, que se colocaron en tubos de 5 ml (Falcon®). Las células se tiñeron con 2 μ L de anticuerpos monoclonales, anti-CD4 y

anti-CD8 conjugados a fluorocromos de APC y PE, durante 30 minutos. Después, se añadieron 2 mL de PBS albúmina al 0,5% y se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm. Posteriormente, se añadieron 500 μ L de solución fijadora (paraformaldehído al 1%). Se analizaron diez mil células en un citómetro de flujo usando el programa CELLQuest®. Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas para el marcador correspondiente. En cada muestra se identificaron la subpoblaciones de células CD4+ CD8+, CD4-CD8- , CD4+CD8- y CD8+CD4- .

b) Determinación de subpoblaciones de leucocitos en sangre

Se colocaron 100 μ L de sangre de rata de cada grupo de estudio en tubos Falcon®, y se usaron 2 μ L de los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados a diferentes fluorocromos: Para la identificación de leucocitos se utilizó anti-CD45 PerCP, para linfocitos T y B, anti-CD3 FITC y anti-CD45RA FITC, respectivamente; para la identificación de los linfocitos T4 y T8, se utilizaron los anti-CD4 APC y el anti-CD8 PE, respectivamente. Después de 30 minutos, se añadieron 2 mL de solución de lisis (FACS Lysing Solution, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, cada muestra se centrifugó durante 5 minutos a 500 g a temperatura ambiente, se separó el sobrenadante, y el botón celular se lavó con PBS-albúmina al 0,5%. Posteriormente, se añadieron 500 μ L de la solución fijadora de paraformaldehído al 1%. Las células se suspendieron antes de la determinación. Al menos 10.000 células fueron analizadas por citometría de flujo. El análisis se realizó con CELLQuest®. Los resultados se

analizaron en gráficas de puntos y se expresaron como el porcentaje de células positivas para cada marcador.

Citometría de flujo. La determinación de subpoblaciones de timocitos y la determinación de subpoblaciones de leucocitos en sangre se realizó con un citómetro de flujo FACSCalibur [(Becton Dickinson, Immunocytometry System (BDIS), CA, EE.UU.)] con un láser de argón (488 nm).

c) Determinaciones hemáticas

La concentración total de leucocitos (Leu), eritrocitos (Eri), parámetros eritroides, recuento de plaquetas y la relación linfocitos / neutrófilos se determinaron usando un analizador automático KX-21N (Sysmex, Japón).

d) Determinación de cuenta total de células nucleadas de médula ósea

Se diseccionó el fémur derecho de cada rata, se eliminó el músculo y se inyectó 1 mL de solución salina fisiológica a través del canal femoral. Las células se recogieron en un tubo de plástico y se homogeneizaron mediante pipeteo. La suspensión celular se diluyó 1:40 con la solución de Turk, y se contaron las células nucleadas totales en una cámara de Neubauer con un microscopio óptico.

e) Determinación de la capacidad de proliferación de células de bazo

En condiciones estériles, se aisló el bazo de las ratas, se disgregó mecánicamente sobre una malla de plástico de 30 μm y se lavó con solución salina. Se añadió la suspensión celular con un 95% de viabilidad ajustada a la concentración de 2×10^6 células/mL. Se evaluó el número de células nucleadas totales y viabilidad celular con

solución de Turk y azul tripan, respectivamente, en una cámara de Neubauer. Se preparó el cultivo en placa de 96 pozos con alícuotas de 200 μL en presencia de 10 mg/mL de Concanavalina A [ConA] (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) durante 68 horas a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% de humedad. Como grupo control se cultivaron las células únicamente con medio RPMI-1640 sin mitógeno. El cultivo se realizó por triplicado con y sin ConA. Posteriormente, se adicionaron a cada pozo 10 μL del compuesto CCK-8 (Cell Counting Kit-8; Dojindo Corp., Japan). La placa se incubó 4 horas a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% y 90% de humedad. Se leyó la absorbancia a 450 nm con el lector de placas de ELISA (BioTek).

6.6 Cuantificación de polifenoles totales en las cápsulas de *Urtica dioica* L.

Análisis de fenoles totales. La concentración de fenoles totales en extractos fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Preparación de la curva de calibración. Se utilizó una solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL) de la cual se tomaron volúmenes de 0 μL a 100 μL en intervalos de 20 μL y se completó el volumen de cada uno a 500 μL con agua destilada.

Determinación de fenoles en una muestra. Se pesaron 5 mg de extracto y se disolvieron en 1 mL de agua destilada. Se diluyó 1:10 en agua destilada y de ésta solución se tomaron 40 μL para después completar a 500 μL con agua destilada.

Procedimiento. A cada uno de los estándares y muestras previamente preparados se le adicionaron 250 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N y se sonicó por 5 minutos.

Posteriormente se adicionaron 1.250 mL de Na_2CO_3 al 20% y se dejó reposar por dos horas. La absorbancia fue medida a 760 nm. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto (mg GA/g extracto).

6.7 Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico NCSS 2010 (Versión: 07.1.20). Los valores se expresan como la media \pm error estándar ($M \pm SE$). Para la comparación entre los promedios de los grupos tratados versus los grupos de control, empleamos el análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía) con la prueba de Tukey y la prueba de Duncan como necesarios para establecer la significación estadística, utilizando un 95% como índice de confiabilidad con una $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

De la decocción de las hojas de *Urtica urens* se obtuvieron 57.10 g que equivalen a 21.15 por ciento de recuperación.

El contenido de polifenoles totales en las cápsulas de *U. dioica* L. fue de 2.43% GAE/g del material seco de acuerdo al análisis fitoquímico de *UD* L. determinado a partir de la curva estándar ($y = 0.0674X + 0.0082$; $R^2 = 0.9975$) con ácido gálico (Otlés y Yelcin, 2012).

7.1 Comparación del efecto de la decocción de *U. urens* y el extracto de *U. dioica* L. sobre la proliferación de células de bazo y el número de células nucleadas totales de médula ósea de ratas desnutridas.

En el cultivo de células de bazo de ratas desnutridas tratadas con *U. dioica* L. hubo mayor tasa de proliferación que en el de ratas desnutridas tratadas con la decocción *U. urens*. La dosis efectiva de *U. dioica* L. fue de 0.2 g/mL, con la cual se continuó el estudio (Figura 2).

Como se puede observar en la Figura 3, las ratas tratadas con *U. dioica* L. presentaron una concentración de 7.55×10^6 células/mL prácticamente lo doble de las ratas tratadas con *U. urens* (3.53×10^6 células/mL) y ligeramente mayor a la concentración de las ratas DN testigo (6.74×10^6 células/mL). Sin embargo, con el tratamiento con la planta no se alcanzan los valores del grupo BN (1.18×10^7 células/mL).

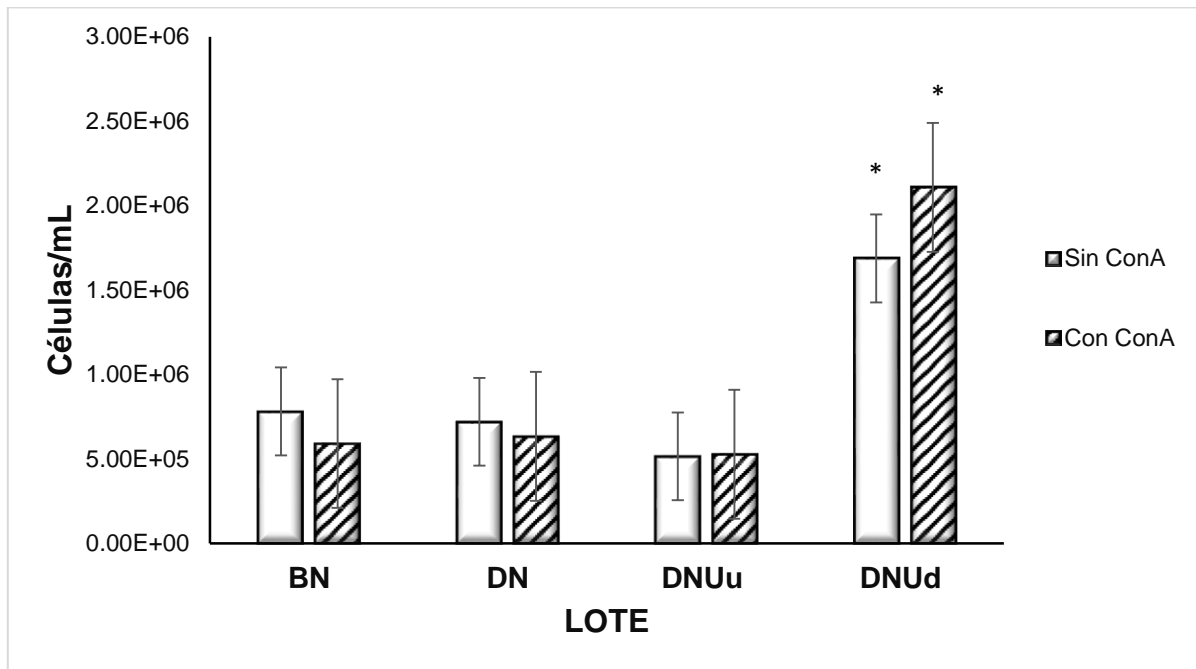


Figura 2. Proliferación de células de bazo de ratas desnutridas con y sin Concanavalina A. BN. Ratas bien nutridas, DN. Ratas desnutridas, DNUu. Ratas desnutridas tratadas con la decocción de *Urtica urens* 0.2 g/mL, DNUd. Ratas desnutridas tratadas con las cápsulas de *Urtica dioica* L. 0.2 g/mL (DN+UD 0.2 g/mL) n=8

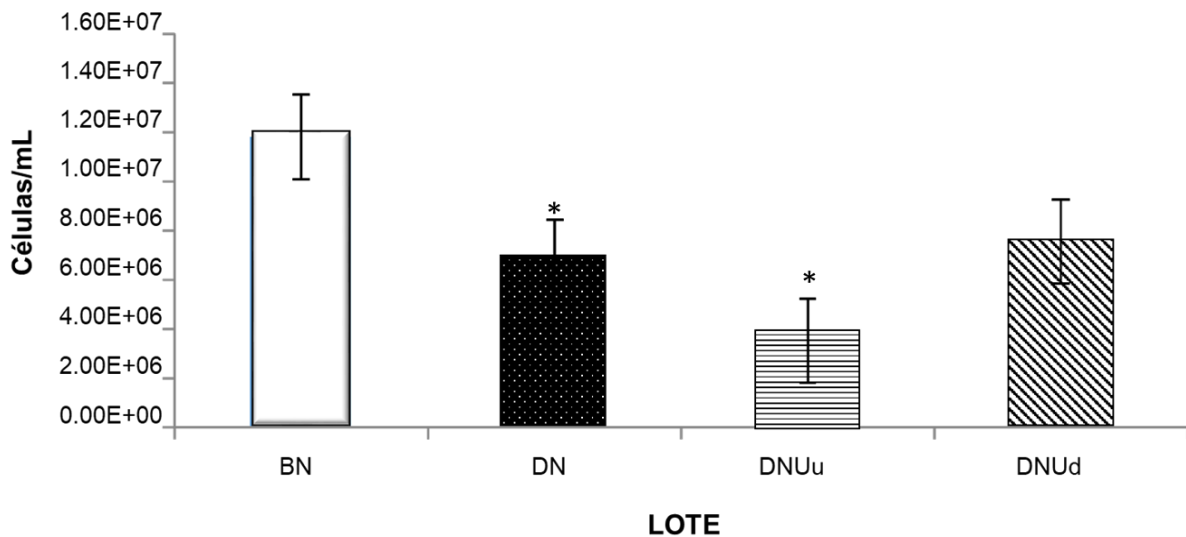


Figura 3. Células nucleadas totales de médula ósea de ratas desnutridas tratadas con *U. urens* y *U. dioica* L., n=8

Con base a estos resultados se decidió continuar el trabajo con *UD*.

7.2 Efecto de UD sobre la modulación de los elementos de la respuesta inmunológica en ratas con desnutrición grave

a) Peso corporal de ratas bien nutridas, desnutridas sin tratamiento y desnutridas tratadas con *U. dioica* L.

A través de este modelo de desnutrición, sólo entre el 30 y el 40% de las ratas por camada llegan a alcanzar el tercer grado de desnutrición. En la Tabla 1 se muestran los datos acumulados.

El peso corporal promedio de las ratas recién nacidas (antes del tratamiento) fue de 7.6 ± 1.0 g. En el día 20, el peso corporal promedio del grupo BN fue de 43.4 ± 5.0 g frente a 26.1 ± 4.1 g en el grupo DN y de 26.0 ± 4.5 g en el grupo DNUd. Las ratas DN tenían un peso 40% más bajo que las ratas BN, lo que muestra que los grupos DN y DNUd alcanzaron el tercer grado de desnutrición. A pesar del tratamiento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos de las ratas DN y las ratas DNUd (Cuadro 1).

Cuadro 1: Peso corporal en ratas bien nutridas, en ratas desnutridas sin tratamiento y tratadas con *U. dioica* L.

LOTE	DÍA								
	1	4	7	9	12	14	16	18	20
BN	7.6±0.1	11.0±0.4	14.8±0.5	20.1±0.5	24.8±0.5	29.6±0.5	33.8±0.5	38.1±0.6	43.4±0.6
DN	7.6±0.1	9.2±0.1	11.5±0.1	14.8±0.1	16.9±0.2*	20.3±0.2*	22.1±0.2*	24.2±0.3*	26.1±0.3*
DNUd	7.6±0.1	9.2±0.1	11.5±0.1	14.8±0.1	16.9±0.2*	19.6±0.4*	21.8±0.4*	23.9±0.6*	26.0±0.7*

BN. Ratas bien nutridas (n = 68), DN. Ratas desnutridas (n = 161) y DNUd (n=37). Ratas desnutridas tratadas con *U. dioica* L. Los datos se expresan como la media ± error estándar. * p <0.05, diferencias significativas con respecto al grupo BN.

b) Peso del timo y el bazo

El peso promedio del timo en las ratas BN fue de 0.145 ± 0.017 g, mientras que el peso promedio en las ratas DN fue de 0.050 ± 0.007 g, y el peso promedio en las ratas DNUd fue de 0.069 ± 0.008 g, lo que indica que no hubo diferencias significativas entre los grupos desnutridos. Sin embargo, el grupo BN tuvo un valor significativamente más alto que los grupos desnutridos.

Los pesos medios del bazo para los grupos BN, DN y DNUd fueron 0.227 ± 0.017 g, 0.067 ± 0.007 g y 0.090 ± 0.010 g, respectivamente. El peso del bazo del grupo DN fue 70% menor que el peso del bazo de las ratas BN, y el peso medio del bazo de las ratas DNUd fue 60%, lo que indica que el peso del bazo de este grupo ganó 10% (Figura 4).

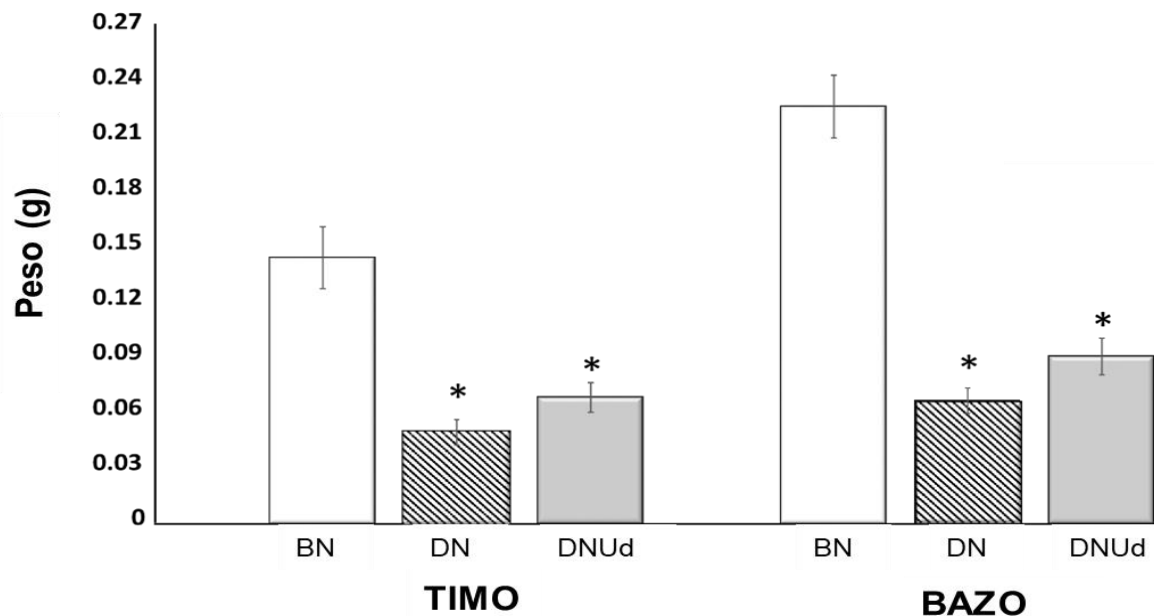


Figura 4. Peso del timo y el bazo de ratas desnutridas. BN. Ratas bien nutridas (n = 10), DN. Ratas desnutridas (n = 11) y DN Ud. Ratas desnutridas tratadas con *U. dioica* L. (n = 15). Los datos se expresan como la media \pm error estándar. * p < 0.05, diferencias significativas con respecto al grupo BN.

c) Subpoblaciones de timocitos

Las ratas del grupo DN tuvieron $12.8 \pm 1.6\%$ de timocitos CD4-CD8-, que corresponden a 3.0 y 1.8 veces más proporción que los valores del grupo BN y DN Ud, respectivamente. Por el contrario, este mismo grupo presentó menor proporción de timocitos CD4+CD8+ ($65.1 \pm 2.7\%$), lo que significa que tuvo aproximadamente 14% menos número de éstas células que el grupo BN ($75.3 \pm 1.2\%$) y 7% menos celularidad que el grupo DN Ud ($69.8 \pm 2.2\%$). El grupo DN Ud no presentó diferencias significativas con respecto al grupo BN, en la proporción de linfocitos T CD4-CD8- y linfocitos T

CD4+CD8+ (Figura 5). No se observaron diferencias significativas en la proporción de linfocitos T CD4+ entre los grupos desnutridos con el bien nutrido. Sin embargo, podemos observar que el grupo DN presento 48% más células CD8+ que el grupo BN y el grupo DNUd 26% más células CD8+ que el grupo BN.

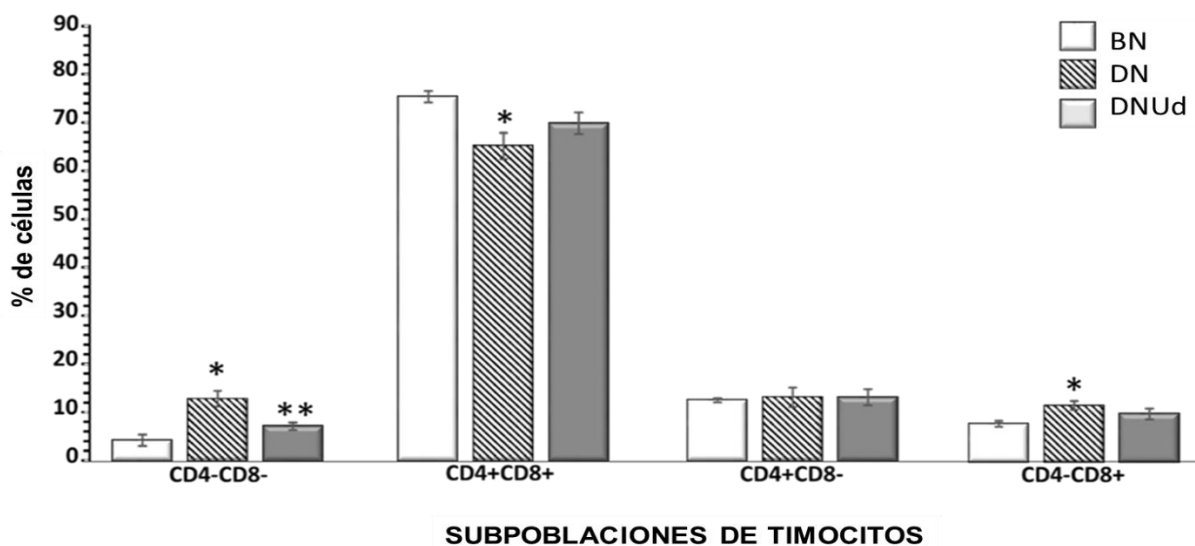


Figura 5. Porcentaje promedio de subpoblaciones de timocitos de ratas desnutridas tratadas con *U. dioica* L. BN. Ratas bien nutridas (n = 5), DN. Ratas desnutridas (n = 5) y DNUd. Ratas desnutridas tratadas con *U. dioica* L. (n = 5). Los datos se expresan como la media \pm error estándar. * p < 0.05. Diferencias significativas con respecto al grupo BN. **Diferencias significativas con respecto al grupo DN.

d) Distribución de leucocitos en sangre

El grupo DN presentó 18% menos linfocitos T CD4+, 30% menos linfocitos T CD8+, 68% menos monocitos que el grupo BN, 32% menos linfocitos T totales, solo en los linfocitos B no hubo diferencias estadísticamente significativas. El grupo DNUd tuvo aproximadamente la misma cantidad de linfocitos T CD4+ ($11.2 \pm 0.5\%$), de linfocitos T CD8+ (38.8 ± 3.7), de linfocitos B totales, que el grupo BN. Solo la proporción de

monocitos de las ratas tratadas con la planta fue 11% mayor que la del grupo BN. Entonces, la proporción de leucocitos en las ratas DNUd fue similar a la de las ratas BN, a excepción de las células T, que fueron 25% menos que en este grupo. Hubo una diferencia significativa entre los grupos BN y DN; por lo tanto, la desnutrición disminuye la proporción de leucocitos. Aunque el grupo DNUd mostró una mayor proporción de células CD4+, linfocitos T CD8+, monocitos y células B que el grupo DN, solo los recuentos de CD4 + y monocitos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 6).

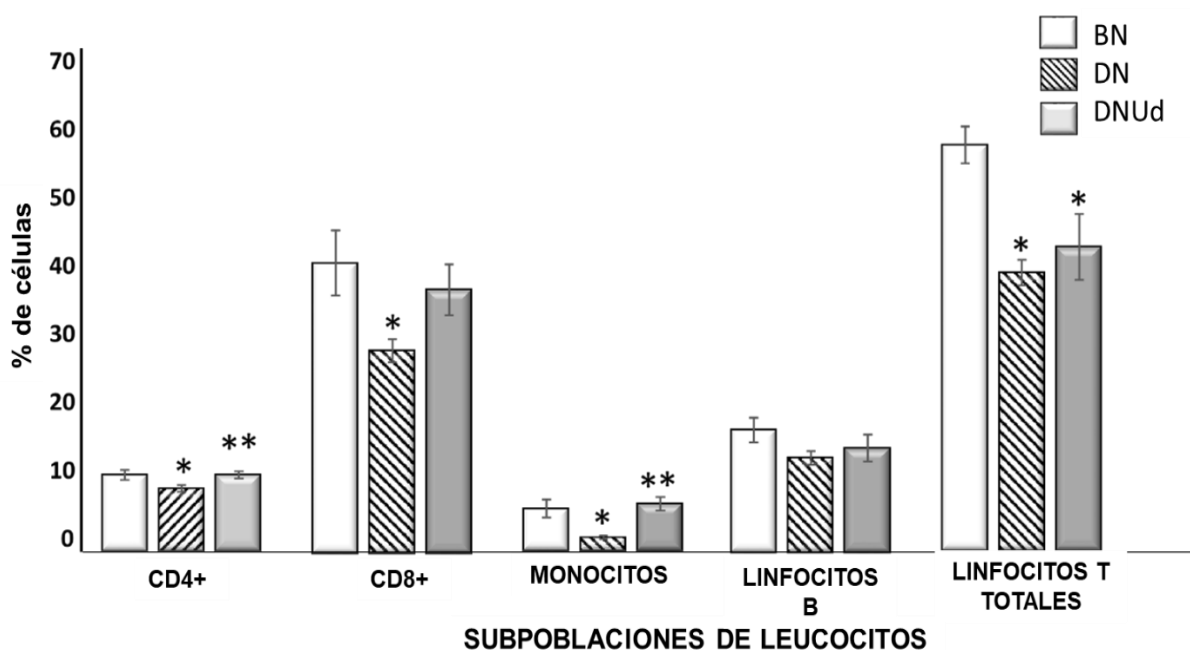


Figura 6. Porcentaje de glóbulos blancos circulantes en ratas tratadas con *U. dioica* L. BN. Ratas bien alimentadas (n = 5), DN. Ratas desnutridas (n = 10) y DNUd. Ratas desnutridas tratadas con *U. dioica* L. (n = 10). Los datos se expresan como la media \pm error estándar. * p < 0.05, diferencias significativas con respecto al grupo BN. ** p < 0.05, diferencias significativas con respecto al grupo DN.

e) Hemocitometría

La concentración de glóbulos blancos en el grupo DN disminuyó 29% y 25% en comparación con la concentración de los grupos BN y DNUd, respectivamente. Los valores del volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC), del grupo DNUd tendieron a ser más altos que los valores del grupo BN. Esto fue significativo solo para los valores de HCM y CMHC que fueron 12% y 9% más altos que en el grupo BN ($p \leq 0.5$) (cuadro 2).

Cuadro 2: Hemocitometría de ratas desnutridas tratadas con *U. dioica* L.

GRUPO	LEU	ERI	Hb	HCT	VCM	HCM	CMHC	PLT
(n)	X 10 ³ /μL	X 10 ⁶ /μL	g/dL	%	fL	pg	g/dL	X 10 ³ /μL
BN								
(10)	4.2±0.6	5.3±0.2	9.3±0.4	31.3±1.6	57.5±1.6	17.0±0.4	29.7±0.7	408.8±72.3
DN								
(9)	3.0± 0.2 *	4.1±0.4 *	8.4±0.6	27.0±2.0	58.7±2.0	19.0±0.7	31.3±0.4	341.0±46.9
DNUd								
(11)	4.0±0.4	4.7±0.3	9.3±0.6	29.3±1.7	61.9±0.9	20.2±0.6 *	32.6±0.7 *	290.4±55.1

Leucocitos (LEU); Eritrocitos (ERI); Hemoglobina (Hb); Hematocrito (HCT); Volumen celular promedio (VCM); Hemoglobina celular media (HCM); Concentración media de hemoglobina celular (CMHC); Plaquetas (PLT). BN. Ratas bien alimentadas (n = 10), DN. Ratas desnutridas (n = 9) y DNUd. Ratas desnutridas tratadas con *U. dioica* L. (n = 11) Los datos se expresan como la media ± error estándar. * p < 0.05, diferencias significativas con respecto al grupo BN.

La relación de linfocitos-neutrófilos en los grupos DN y DN Ud mostró una reducción de aproximadamente 13% de linfocitos con respecto a la del grupo BN, significativo solo para el grupo DN. Los neutrófilos aumentaron en un 50% en los grupos DN y DN Ud en comparación con el grupo BN (Figura 7).

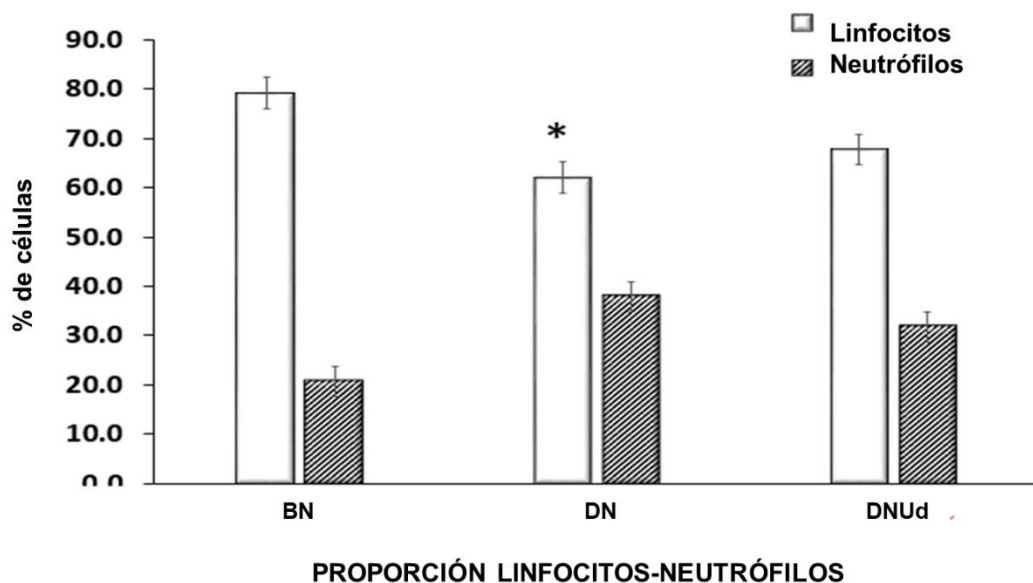


Figura 7. Proporción de linfocitos/neutrófilos de ratas desnutridas. BN. Ratas bien nutridas (n = 10), DN. Ratas desnutridas (n = 9) y DN Ud. Ratas desnutridas tratadas con *U. dioica* L. (n = 11). Los datos se expresan como la media \pm error estándar. $p < 0.5$. * Diferencias significativas con respecto al grupo BN.

f) Células nucleadas de médula ósea

Los grupos DN y DN Ud presentaron 25% y 47% menos células nucleadas en médula ósea, respecto al grupo BN. Figura 8.

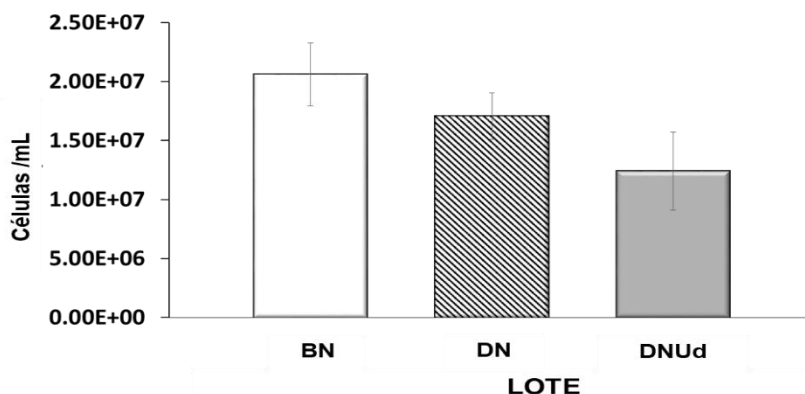


Figura 8. Células nucleadas totales de médula ósea de ratas desnutridas. BN. Ratas bien nutridas (n = 10), DN. Ratas desnutridas (n = 10) y DN Ud. Ratas desnutridas tratadas con *U. dioica* L. (n = 10). Los datos se expresan como la media ± error estándar. $p < 0.5$. * Diferencias significativas con respecto al grupo BN.

g) Capacidad de proliferación de células de bazo

El cultivo del grupo BN expuesto a ConA tuvo 18.1% más concentración celular que el cultivo sin ConA. La concentración celular del grupo DN en presencia de ConA fue 9.2% mayor que el cultivo sin ConA. El cultivo del grupo DN Ud con ConA mostró un aumento del 41.1% en comparación con el mismo grupo sin ConA (Figura 9).

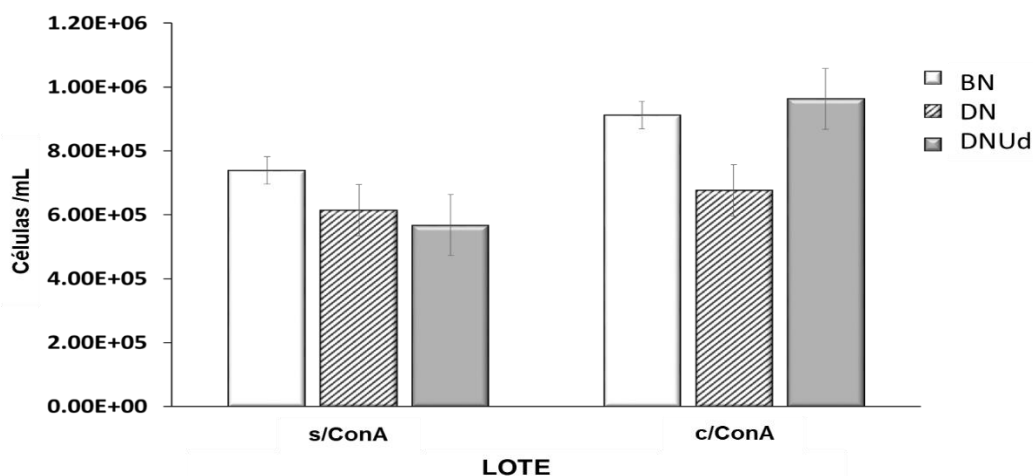


Figura 9. Proliferación de células del bazo de ratas desnutridas. Los cultivos se realizaron en ausencia (s/ConA) y presencia de Concanavalina A (c/ConA). BN. Ratas bien alimentadas (n = 15), DN. Ratas desnutridas (n = 8) y DN Ud. Ratas desnutridas tratadas con *U. dioica* L. (n = 10). Los datos se expresan como la media ± error estándar. * $p < 0.05$, diferencias significativas con respecto al grupo BN.

VIII. DISCUSIÓN

Este estudio se inició con la colecta de la planta y el establecimiento de la dosis de trabajo, para esto se buscó *U. dioica* L. en campo, recolectándose plantas con morfología similar que resultaron ser *U. chamaedryoides* y *U. dioica* var. *angustifolia*, las cuales han mostrado capacidad para restaurar la hematopoyesis en ratones gestantes lo que podría impedir el desarrollo de malformaciones en fetos (Velasco y col., 2013; Herrera y col., 2015). En otras colectas se identificaron especímenes de *U. urens*. Entonces, se realizó un análisis comparativo entre la decocción de *U. urens* y el extracto *U. dioica* L. para evaluar la capacidad de ambos para estimular la proliferación de linfocitos de bazo de rata *in vitro*. La actividad más alta y constante se obtuvo con el extracto de *UD*. Por esta razón, después de establecer una curva dosis-respuesta, el presente trabajo se realizó con el extracto de *U. dioica* L.

La concentración de compuestos fenólicos del extracto de hoja de *U. dioica* L. fue de 2,43% GAE/ g del material seco; estos resultados son bajos en comparación con lo reportado por Hudec y col., 2007, quienes determinaron mediante el método Folin-Ciocalteu para raíz, tallo y hojas 7.82, 9.91 y 7.62 mg de GAE / g del material seco, respectivamente; por Pinelli y col., 2008, quienes reportan sobre el análisis fenólico de *UD* cultivada y silvestre, 28.6% y 24.4% para el tallo, 71.5% y 76.5% para hojas, respectivamente. Otles y Yalcin (2012) reportan concentraciones más altas de dichos compuestos y su actividad antioxidante; concluyendo que estos compuestos activos tienen efectos positivos que pueden contribuir a un buen estado de la salud, con

aplicaciones en cardiopatías coronarias, hipertensión arterial, diabetes, cáncer, enfermedades inflamatorias, virales y parasitarias, trastornos psicóticos, etc.

Peso corporal de ratas desnutridas tratadas con *Urtica dioica* L.

El comportamiento del peso corporal de ratas Wistar sometidas a un esquema de desnutrición por competencia de alimento durante la lactancia es bien conocido (Ortiz y col., 1999). Nuestros resultados confirman que se logró inducir desnutrición grave en las ratas de los grupos DN y DNUd, ya que presentaron déficit de peso del 40% desde el día 18 de la lactancia, además de otros signos, como pelo escaso, huesos frágiles y actividad motora pobre similar a los observados en niños desnutridos como lo reportan Ortiz y col., 2000.

La pérdida de peso y las alteraciones en el crecimiento son las principales manifestaciones del estado nutricional. Con base al peso esperado del niño (de acuerdo a su edad o estatura) se realiza el cálculo que determina el grado de desnutrición. Según la OMS, "la desnutrición provoca adelgazamiento morboso y/o un edema nutricional y retraso del crecimiento" (Ravasco y col., 2010).

Los efectos de la dieta deficiente en proteínas son en general los siguientes:

1. Pérdida de peso y emaciación progresiva. Al faltar calorías, el organismo literalmente se consume utilizando sus propios tejidos como fuente de energía y de materia vital. La emaciación es inevitable porque no hay materia estructural (principalmente proteínas) para reemplazar el desgaste natural de los tejidos.

2. Retraso o estancamiento permanente en el crecimiento; la infancia es precisamente la etapa del crecimiento que necesita mayor aporte de materia estructural.
3. Debilidad muscular marcada que afecta toda actividad.
4. Disminución en la cifra total de proteínas en el plasma sanguíneo con especial reducción de la cantidad de albúmina. Esta manifestación, al igual que el retraso en el desarrollo, se observa solamente en los casos graves o crónicos.

En el presente estudio, al día 21 de la desnutrición, observamos que el peso de las ratas del grupo DN Ud no es estadísticamente diferente al grupo DN, es decir, no ganan peso al administrar la planta. Esto puede deberse al bajo número de dosis administradas. Podría ser que al modificar el esquema de administración del extracto a un número mayor de administraciones después de los 21 días de la lactancia, se logre ver algún incremento en el peso corporal, lo que queda por determinar en trabajos posteriores, como lo reportan Feliu y Slobodianik (2002), quienes observaron la recuperación de peso corporal en ratas con desnutrición a causa de una dieta libre de proteína con pérdidas de aproximadamente 15, 20 y 25% del peso al destete, y posterior administración de dieta al 20% de proteína (caseína) durante 9 días.

Peso de timo y bazo de ratas desnutridas tratadas con *Urtica dioica* L.

Al final del estudio, los grupos DN y DN Ud presentaron menor peso del timo y bazo que el grupo BN; obteniéndose los valores más bajos en el grupo DN, en forma similar a lo reportado por de la Rosa (2002), al determinar que dichos valores están influidos por la celularidad de tales órganos.

En la literatura, se reporta que el tamaño del timo se ve más afectado, debido a la alta tasa de velocidad fisiológica de recambio celular, sobre todo en casos de desnutrición e infección. Estudios post-mortem en niños desnutridos así como los realizados en modelos experimentales en animales en crecimiento, presentaron atrofia de los tejidos linfoides, siendo el timo el más afectado (Menéndez y col., 1987; Chevallier y col., 1994; Prentice, 1999; Varg y col., 2011).

A su vez, el grupo DNUd ganó peso en dichos órganos. Podemos inferir que la planta está estimulando la proliferación celular, poblando a los órganos aunque no lo suficiente como para alcanzar los valores del grupo BN. Esta ganancia de peso puede estar vinculada con la presencia en el extracto de la planta de proteínas, vitaminas, flavonoides, carotenos, otros macro y microelementos y ácidos grasos; se ha demostrado que los flavonoides y ácidos grasos promueven la proliferación celular, y a dichos compuestos, se les atribuyen propiedades curativas en cáncer, diabetes, hiperplasia prostática, alergias, purificación de la sangre, anemia, etc. Además, se reporta que por su alto valor nutritivo, las hojas de ortiga son incluidas en la dieta humana, como un tónico para fortalecer el cuerpo, en la preparación de sopas y varios platos y como una fuente natural de saborizante de alimentos. Como alimento de ganado y aves de corral, las hojas de ortiga son importantes para aumentar y mejorar el peso corporal y la calidad de la carne (Rafajlovska y col., 2013).

Subpoblaciones de timocitos de ratas desnutridas tratadas con *Urtica dioica* L.

Los linfocitos T proceden de células madre hematopoyéticas que tienen su origen en la médula ósea. Estos precursores migran desde la médula ósea y colonizan el timo. Una

vez allí, estas células, denominadas timocitos, experimentan un proceso de maduración en varias etapas que pueden ser identificadas según la expresión de marcadores de membrana. Este proceso implica la expresión secuencial de diversas proteínas y reordenamiento de genes del receptor de células T (TCR). Se ha establecido que la mayoría de los timocitos inmaduros no expresan el complejo TCR ni las moléculas accesorias CD4 o CD8. Estas células se denominan timocitos doble negativos (CD4-CD8-) y representan casi el 5% de los timocitos totales. La maduración progresa con la adquisición de marcadores CD4 y CD8 que generan células doble-positivas (CD4+CD8+), que comprenden casi el 80% de la población de timocitos, de ellas, alrededor del 4% se seleccionan continuamente para generar células maduras CD4+ o CD8+. En nuestros resultados, observamos que a causa de la deficiencia nutricional del grupo DN, esta proporción se altera, de tal manera que este grupo presentó 12.8% de células dobles negativas y 65.1% de células dobles positivas; la cuenta de células CD4+ no se modificó debido a la desnutrición pero sí aumento CD8+. Estos resultados, en parte concuerdan con lo reportado por Ortiz y col., 2008, ya que ellos reportaron aproximadamente tres veces más porcentaje de células dobles negativas en ratas desnutridas; sin embargo a diferencia de sus resultados nosotros si observamos disminución de células dobles positivas y aumento en simples positivas CD8, respecto al grupo BN. Estos datos sugieren un impedimento para la maduración temprana de los timocitos, tal vez debido a la falta de expresión de marcadores de membrana o bien a defectos en el reordenamiento génico de la cadena β del TCR y esto se correlaciona con incremento de apoptosis.

Por el contrario, el grupo DN Ud presento solo 1.8 veces más células dobles negativas y 7.8 veces menos células dobles positivas que el grupo BN. A su vez, el grupo DN Ud presentó la mitad de células dobles negativas y 0.7 veces más células dobles positivas que el grupo DN. Respecto a las células CD4+ simples y células CD8+ simples no se observaron diferencias significativas en comparación con los grupos BN y DN. De cierta manera, la planta está actuando sobre la maduración de los timocitos. Harput y col., 2005, habían observado que las especies de *Urtica* se han usado ampliamente para el tratamiento del cáncer en los sistemas de la medicina tradicional turca y de otras regiones. Por este motivo, investigaron la actividad citotóxica del extracto acuoso de *U. dioica* sobre las líneas celulares tumorales KB (human epidermoid carcinoma), B16 (mouse melanoma), HeLa (human epithelial carcinoma) and HLA (human hepatoma), utilizando el ensayo MTT sin demostrar citotoxicidad. Por tanto, proponen que es la actividad inmunomoduladora de la planta la responsable de la actividad. Para ello, realizaron cultivos de esplenocitos con diferentes concentraciones del extracto de *U. dioica*, observando que el extracto acuoso de la planta (400µg/mL) estimuló la proliferación de linfocitos moderadamente, sin usar ningún tipo de mitógeno. Para identificar la especificidad de esta estimulación, después de 42 horas de incubación con muestras de prueba, trataron a los esplenocitos con anticuerpos específicos para análisis de citometría de flujo y determinaron que con el extracto, la proporción de linfocitos T se incrementó en comparación con el grupo control. Durante la activación de los linfocitos T, también observaron incremento en la proporción de células T CD4 + y células T CD8 +. Esto es, la planta estimula linfocitos T esplénicos y tímicos.

Leucocitos en sangre de ratas desnutridas tratadas con *Urtica dioica* L.

La desnutrición provocó leucopenia, disminución en la proporción de linfocitos T CD4+ y CD8+, respecto al grupo BN, lo que concuerda con lo reportado por Cortés, 2009. En el grupo DNUd, hubo restablecimiento del número y tipo de células hematopoyéticas, lo que sugiere que el extracto promueve la diferenciación celular y la maduración hasta alcanzar los niveles casi normales. Los resultados muestran que el tratamiento con *U. dioica* L. aumentó significativamente el porcentaje de células CD4+, monocitos y linfocitos T totales en sangre. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Le y col., 1992, quienes reportan que la aglutinina *U. dioica* (UDA) estimula la proliferación de linfocitos T, aunque lo hace de forma retardada respecto a ConA. La UDA se comporta como un superantígeno que activa los segmentos V β del receptor de linfocitos T (TCR) uniéndose a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y II (Rovira y col., 1999). Sin embargo, la aglutinina antes mencionada ha sido aislada del rizoma de la planta y el presente estudio se llevó a cabo con un extracto crudo de la hoja, lo que sugiere que la aglutinina podría estar presente en la hoja o bien que se trata de otro mecanismo de estimulación para la proliferación de células T (Ganeshpurkar y col., 2017).

Citometría hemática de ratas desnutridas tratadas con *Urtica dioica* L.

La citometría hemática realizada al grupo DN confirmó que esta patología provoca leucopenia y anemia respecto al grupo BN. Según Menéndez y col., 1987, las secuelas de la desnutrición en ratas y sus crías, sobre cambios fisiológicos (peso corporal, peso de timo y bazo, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen celular

medio, hemoglobina celular media, concentración media de hemoglobina celular, recuento de glóbulos blancos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos polimorfonucleares, basófilos) durante el embarazo y la lactancia y su capacidad de recuperación de la desnutrición temprana, son las siguientes: 1) disminución altamente significativa en el peso corporal y el peso de los órganos; 2) alteración importante en sus parámetros hemáticos de madres y crías (lo que puede ser un determinante del retraso del crecimiento en las crías) y 3) los parámetros hematológicos de las crías desnutridas se modificaron en relación con los controles durante todo el estudio (15, 30 y 90 días).

Sin embargo, en el grupo DNUd se logra observar incremento en la concentración de leucocitos, eritrocitos, hemoglobina celular media (HCM) y concentración media de hemoglobina celular (CMHC) respecto a los grupos DN y BN. El incremento de leucocitos, puede atribuirse al efecto del extracto de la planta debido a que desde la primera administración de *U. dioica* L. hasta el sacrificio de los animales, transcurrieron siete días, período que coincide con el término de cinco a siete días promedio para la producción de éstas células sanguíneas, desde la célula madre hematopoyética totipotencial hasta las células sanguíneas circulantes. Es decir, el tratamiento con el extracto de la planta en el grupo DNUd promovió la recuperación de la hematopoyesis (Greer y col., 2009). Meral y Kanter (2003), reportan los efectos de *Nigella sativa* L. (NS) y *Urtica dioica* L. (UD) en el estado mineral seleccionado y valores hematológicos en ratas tratadas con CCl₄. Ellos determinaron que el tratamiento con CCl₄ durante 45 días aumenta significativamente los niveles de K y Ca del suero y disminuye los niveles

de eritrocitos, leucocitos, hematócrito y hemoglobina sin cambiar los niveles séricos de Na y Cl. Los tratamientos con NS o UD (solos o combinados) durante 45 días, disminuyeron los niveles séricos elevados de K y Ca y también aumentaron los niveles reducidos de éstos parámetros sanguíneos.

Células nucleadas totales de médula ósea de ratas desnutridas tratadas con *Urtica dioica* L.

El número de células nucleadas totales de la médula ósea fueron más bajas en el grupo DNUd que en el grupo DN, probablemente porque la planta al promover la liberación rápida de células de la médula ósea a la sangre se va agotando, de tal manera que los resultados reflejan hipoplasia medular.

En la medicina tradicional mexicana, *U. dioica* L. se emplea para tratar la anemia debido a su alto contenido de hierro, que puede contribuir al aumento de los eritrocitos y específicamente a la concentración media de hemoglobina corpuscular, como lo reportaron previamente Herrera y col., 2015, al trabajar con la decocción de *U. dioica* L. var. *angustifolia*, la cual mostró la capacidad de evitar malformaciones en fetos de ratones anémicos, esto es, favoreció la hematopoyesis en los fetos.

Efecto de *Urtica dioica* L. sobre la capacidad de proliferación de células de bazo de ratas desnutridas

Nuestros resultados confirman que la desnutrición grave disminuye la capacidad de proliferación de células de bazo como lo reporta Ibrahim y col., 2017. En el grupo DN se observó que tanto en presencia y ausencia de ConA no hubo aumento de la

proliferación celular, respecto al grupo BN. Es decir, los esplenocitos de estas ratas no tuvieron capacidad para responder al mitógeno. Sin embargo, los esplenocitos de las ratas tratadas con la planta en presencia de la ConA, proliferar más que los de los grupos BN y DN. Podría considerarse que hay un efecto sinérgico entre la planta y la ConA sobre la proliferación del grupo DNUd que no se observa en los grupos DN y BN. Se sabe que *U. dioica* L. es una fuente de energía, proteínas, fibra y una gama de compuestos bioactivos que tienen beneficios para la salud (Adhikari y col., 2015). En Nepal, *U. dioica* L. es un alimento básico y un alimento complementario, que a menudo es el principal cultivo comercial de las comunidades locales, lo que contribuye a la seguridad alimentaria en esa región. En el caso de México, a pesar de que es un país en desarrollo rico en flora y fauna, la DCP tiene una alta incidencia en áreas suburbanas y rurales (Monárrez y col., 2000). Los efectos de *U. dioica* L. en ratas con inmunodeficiencia debido a desnutrición severa observadas en este trabajo pudieran atribuirse a que la planta actúa como un nutriente que podría actuar como fitomedicamento (nutracéutico).

Los resultados reportados en este trabajo muestran el papel hematopoyético e inmunoestimulante del extracto acuoso obtenido de la hoja de *U. dioica* L., en contraste, en la literatura las propiedades inmunoestimulantes han sido atribuidas a la raíz. Por lo tanto, este trabajo muestra que el uso de la hoja de la planta puede ser una alternativa terapéutica como inmunoestimulante y punto de partida para continuar los estudios al respecto.

No obstante que se sabe que *U. dioica* L. estimula la proliferación de linfocitos T en individuos sanos, nuestros resultados refuerzan este conocimiento, pero en una condición patológica como es la desnutrición.

IX. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

El extracto acuoso de las hojas de *U. dioica* L. estimula la respuesta inmunológica porque:

- Promueve la diferenciación de los linfocitos T hacia las células CD4+ y CD8+.
- Contrarresta la anemia y leucopenia asociadas con desnutrición severa.

Por sus propiedades, la hoja de la planta podría usarse como suplemento nutricional o nutracéutico incluso en aquellas poblaciones sin recursos suficientes, ya que su dieta carece de los nutrientes proporcionados por *U. dioica* L.

X. PERSPECTIVAS

Complementar la determinación de la actividad inmunoestimulante de *U. dioica* L. en ratas con desnutrición de tercer grado sobre:

1. La capacidad de activación de linfocitos T de bazo.
2. La producción de citocinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-10 e IFN- γ) en linfocitos de bazo.
3. La concentración IL-2, IL-4, IL-6 e IFN- γ en plasma.

4. La capacidad de activación de linfocitos B de bazo.
5. La proporción de macrófagos y su capacidad de fagocitosis.
6. La proporción y actividad de polimorfonucleares.
7. Se sugieren la modificación del esquema de administración de la planta aplicando mayor número de dosis y tiempos más prolongados de observación.

En cuanto al extracto de *U. dioica* L., sería interesante utilizarlo como referencia en el estudio comparativo del efecto inmunoestimulador de especies del género *Urtica* endémicas de México.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A, Lichtman A. *Inmunología Celular y Molecular*. 6a Ed. Elsevier España, Madrid, **2008**. pp. 3-47
- Abe I, Shirato K, Hashizume Y, Mitsuhashi R, Kobayashi A, Shiono C, Sato S, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Folate-deficiency induced cell-specific changes in the distribution of lymphocytes and granulocytes in rats. *Environ Health Prev Med*. **2013**; 18:78–84. <https://doi.org/10.1007/s12199-012-0286-6>
- Abe M, Akbar F, Matsuura B, Horiike N, Onji M. Defective antigenpresenting capacity of murine dendritic cells during starvation. *Nutrition*. **2003**; 19:265–269. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00854-7](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00854-7).
- Adhikari BM, Bajracharya A, and Shrestha AK. Comparison of nutritional properties of Stinging nettle (*Urtica dioica*) flour with wheat and barley flours. *Food Sci Nutr*. **2015**; 4:119-24.
- Akbay P, Basaran AA, Undeger U, and Basaran N. *In vitro* immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. *Phytother Res*. **2003**; 17: 34-37
- Akgül G, Yılmaz N, Celep A, Celep F, and Çakılcıoğlu U. Ethnobotanical purposes of plants sold by herbalists and folk bazaars in the center of Cappadocia (Nevşehir, Turkey). *Indian J Tradit Knowle*. **2016**; 15(1): 103-108.
- Anstead GM, Chandrasekar B, Zhang Q, Melby PC. Multinutrient undernutrition dysregulates the resident macrophage proinflammatory cytokine network,

- nuclear factor-kappaB activation, and nitric oxide production. *J Leukoc Biol.* **2003**; 74:982–991. <https://doi.org/10.1189/jlb.0203064>.
- Araújo TN, L. V. C. d. Queiroz, K. D. Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay." *Mut Res.* **2010**; 331: 65-77.
- Badr G, Sayed D, Alhazza IM, Elsayh KI, Ahmed EA, Alwasel SH. T lymphocytes from malnourished infants are short-lived and dysfunctional cells. *Immunobiology.* **2011**; 216:309–315. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.07.007>
- Bafna AR, and Mishra SH. Immunomodulatory activity of methanol extract of roots of *Cissampelos pareira* Linn. *Ars Pharm.* **2005**; 46: 25362.
- Barone KS, O'Brien PC, Stevenson JR. Characterization and mechanisms of thymic atrophy in protein-malnourished mice: role of corticosterone. *Cell Immunol.* 1993; 148:226–233. <https://doi.org/10.1006/cimm.1993.1105>.
- Basaran AA, Ceritoglu I, Undeger U, and Basaran N. Immunododulatory activities of some Turkish medicinal plants. *Phytother Res.* **1997**; 11: 609-611.
- Billadeau DD, Nolz JC, Gomez TS. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol.* **2007**; 7:131-143.
- Birke L. "Who—or What—are the Rats (and Mice) in the Laboratory." *Society & Animals.* **2003**; 11(3): 207-224.
- Black R, Victora C, Walker S, Bhutta Z, Christian P, De Onis M, Majid E, Grantham M, Joanne K, Martorell R, and Uauy R. Maternal and child undernutrition and

overweight in low-income and middle-income countries. *The Lancet*. **2013**; 382:427-451.

Bonham M, O'Connor JM, Hannigan BM, Strain JJ. The immune system as a physiological indicator of marginal copper status?. *Br J Nutr*. **2002**, 87:393–403

Borchers AT, Hackman RM, Keen CL, Stern JS & Gershwin ME. Complementary medicine: A review of immunomodulatory effects of Chinese herbal medicines. *Am J of Clin Nut*. **1997**; 66: 1303-1312.

Bourke C, Berkley J, and Prendergast, A. Immune dysfunction as a cause and consequence of malnutrition. *Trends Immunol*. **2016**; S1471-4906(16)30006-0

Bowman TA, Goonewardene IM, Pasatiempo AM, Ross AC, Taylor CE. Vitamin A deficiency decreases natural killer cell activity and interferon production in rats. *J Nutr*. **1990**; 120:1264–1273.

Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*. 2013; 39(5): 806–818. doi: [10.1016/j.immuni.2013.10.010]

Cahalan MD y Chandy KG. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr Opin Biotechnol*. **1997**; 8:749-56.

Cantrell DA. Regulation and function of serine kinase networks in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. **2003**; 15:294-8

Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr*. **2002**; 56 Suppl 3, S73-6.

- Chevallier P, Sevilla R, Zaller L, Sejas E, Belmonte G, Parent G. Study of thymus and thymocytes in bolivian preschool children during recovery from severe protein energy malnutrition. *J Nutr Immunol* **1994**; 3(1):27-30.
- Chin Y, Balunas M, Chai H, and Kinghorn A. Drug discovery from natural sources. *AAPS J.* **2006**; (2):239-53.
- Chun TY, Carman JA, Hayes CE. Retinoid repletion of vitamin A-deficient mice restores IgG responses. *J Nutr.* **1992**; 122:1062–1069.
- Cortés BE. Evaluación de la activación de linfocitos de ratas desnutridas durante la lactancia. **2009**. Tesis de pregrado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- Cortés BE, Ceballos OI, González MH, Ortiz MR. Moderate and severe malnutrition alters proliferation of spleen cells in rats. *Cell Prolif.* **2013**; 46:164–171
- Cuervo ES, Losada-Barragan M, Umana-Perez A, Porrozzi R, Saboia VL, Miranda LH, Morgado FN, Menezes RC, Sanchez G, Cuervo P. T-cell populations and cytokine expression are impaired in thymus and spleen of protein malnourished BALB/c mice infected with *Leishmania infantum*. *PLoS One.* **2014**; 9:e114584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114584>.
- Cunha MC, Lima FDS, Vinolo MA, Hastreiter A, Curi R, Borelli P, Fock RA. Protein malnutrition induces bone marrow mesenchymal stem cells commitment to adipogenic differentiation leading to hematopoietic failure. *PLoS One.* **2013**; 8:e58872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058872>

- Cunningham RS, McNeeley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* **2005**; 115(6):1119-28; quiz 1129.
- da Silva SV, Salama C, Renovato-Martins M, Helal-Neto E, Citelli M, Savino W, Barja-Fidalgo C. Increased leptin response and inhibition of apoptosis in thymocytes of young rats offspring from protein deprived dams during lactation. *PLoS One.* **2013**; 8:e64220. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064220>.
- Dawson CE, Blapg W. Further studies on effect of human saliva on *Vibrio cholera in vitro*. *J. Dent. Res.* **1950**; 29: 240.
- de Azevedo Paiva A, Rondo PH, Rehder Vaz-de-Lima L, de Freitas Oliveira C, Ueda M, Goncalves-Carvalho C, Reinaldo LG. The impact of vitamin A supplementation on the immune system of vitamin A-deficient children. *Int J Vitam Nutr Res.* **2010**; 80:188–196. <https://doi.org/10.1024/0300-831/a000017>.
- de la Rosa G. Análisis del número de células y peso de diferentes órganos de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. **2002**. Tesis de pregrado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- de Melo JF, da Costa TB, da Costa Lima TD, Chaves ME, Vayssade M, Nagel MD, de Castro CM. Long-term effects of a neonatal low protein diet in rats on the number of macrophages in culture and the expression/production of fusion proteins. *Eur J Nutr.* **2013**; 52:1475–1482. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0453-y>

- De Onis, M. Measuring nutritional status in relation to mortality. Bull World Health Organ. **2000**; 78:1271-4.
- Degirmenci NS, Akal ZU, and Alpsoy L. "Cytotoxic and apoptotic effects of caffeic acid and caffeoyl malic acid on brain glioblastoma (U87-MG)." Bull. Pharm. Res. **2016**; 6.1: 7-13.
- ESCOP Monographs. The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. Ed. Thieme. Stuttgart. **2003**; 2^a ed. 521-527.
- Espinosa FJ, and Sarukhán J. Manual de malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. **1997**.
- Farag MA, Weigend M, Luebert F, Brokamp G, Wessjohann LA. Phytochemical, phylogenetic, and anti-inflammatory evaluation of 43 *Urtica* accessions (stinging nettle) based on UPLC–Q-TOF-MS metabolomic profiles. Phytochem. **2013**; 96:170–183
- Feliu MS y Slobodianik NH. Efectos de la desnutrición proteica y de su recuperación nutricional en el timo de rata. Revista chilena de nutrición. **2002**, 29(2), 125-135. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182002000200007>
- Gámez PL, Girón TJ y Briones EC. La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo intermedio. Rev Fac Med UNAM, **2003**. 46:32-36
- Ganeshpurkar A and Saluja AK. The Pharmacological Potential of Rutin. Saudi Pharm J. **2017**; 25(2):149-164.

- García J, De la Rosa L, Herrera B, González A, López J, González G, and Álvarez E. Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México. *Tecnociencia Chihuahua*. **2011**; 5(2): 67-75.
- Golden NMH. The Development of Concepts of Malnutrition, *T J Nutr*. **2002**; 132(7): 2117S–2122S, <https://doi.org/10.1093/jn/132.7.2117S>
- Gómez F, Aguilar R, Muñoz J. La desnutrición infantil en México. *BolMed*. **1947**.
- Gómez, F. Desnutrición. *Bol Med Hosp Infant Mex*. **1946**; 3:543-551
- González MH, Rodriguez L, Nájera O, Cruz D, Miliar A, Dominguez A, Sanchez F, Graniel J, Gonzalez-Torres MC. Expression of cytokine mRNA in lymphocytes of malnourished children. *J Clin Immunol*. **2008**; 28:593–599. <https://doi.org/10.1007/s10875-008-9204-5>.
- González TC, Gonzalez-Martinez H, Miliar A, Najera O, Graniel J, Firo V, Alvarez C, Bonilla E, Rodriguez L. Effect of malnutrition on the expression of cytokines involved in Th1 cell differentiation. *Nutrients*. **2013**; 5:579–593. <https://doi.org/10.3390/nu5020579>.
- Green F, Heyworth B. Immunoglobulin-containing cells in jejunal mucosa of children with protein-energy malnutrition and gastroenteritis. *Arch Dis Child*. **1980**; 55:380 –383. <https://doi.org/10.1136/adc.55.5.380>.

- Greer JP, Foerrster J, Rodgers G, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, and Means RT. Jr. Wintrobe's Clinical Hematology, 12th edition. Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore, MD. **2009**.
- Güil GJL, Reboloso FM, and Isasa ME. Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). J. Food Comp Anal. **2003**; 16 (2):111-119
- Gülcin I, Lifrevioglu OI, Oktay M, Buyukokuroglu ME.. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). J. Ethnopharmacol. **2004**; 90: 205-215.
- Harput US, Saracoglu I, and Ogihara Y. Stimulation of lymphocyte proliferation and inhibition of nitric oxide production by aqueous *Urtica dioica* extract. Phytother Res. **2005**; 19(4):346-8.
- Heath ML, Sidbury R. Cutaneous manifestations of nutritional deficiency. Curr Opin Pediatr. **2006**; 18:417–422. <https://doi.org/10.1097/01.mop.0000236392.87203.cc>
- Hernández HE, Correa MS, Herrera MJ. Nutrición y Salud. México, D. F.: Manual Moderno. **1998**.
- Herrera SS, Flores SJ, Rodríguez CL, Aguilar C, and Velasco LR. Administración de *Urtica dioica* var. *angustifolia* Wedd como preventivo de malformaciones en fetos de ratones anémicas preñadas. Avances de las Mujeres en las Ciencias las Humanidades y todas las Disciplinas. Libro Científico Vol. II de Ciencias Biológicas y de la Salud y Ciencias Sociales y Humanidades. México. **2015**.

- Hirano T, Homma M, Oka K. Effects of stinging nettle root and their steroidal components the Na, K, ATPase of the benign prostatic hyperplasia, *Planta Medica*. **1994**; 60, 30–33.
- Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei MA, Ritter MA, Lechler RI, Bloom SR. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J Clin Invest*. **1999**; 104:1051–1059. <https://doi.org/10.1172/JCI6762>.
- Hudec J, Burdová M, Kobida L, Komorall L, Macho V, Kogan G, Turianica I, Kochanová R, Ložek O, Habán M, Chlebo P. Antioxidant Capacity Changes and Phenolic Profile of Echinacea purpurea, Nettle (*Urtica dioica* L.), and Dandelion (*Taraxacum officinale*) after Application of Polyamine and Phenolic Biosynthesis Regulators. *J. Agric. Food Chem*. **2007**, 55 (14):5689–5696
- Hughes SM, Amadi B, Mwiya M, Nkamba H, Tomkins A, Goldblatt D. Dendritic cell anergy results from endotoxemia in severe malnutrition. *J Immunol*. **2009**; 183:2818 –2826. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803518>.
- Ibrahim MK, Barnes JL, Anstead GM, Jimenez F, Travi BL, Peniche AG, Osorio EY, Ahuja SS, Melby PC. The malnutrition-related increase in early visceralization of *Leishmania donovani* is associated with a reduced number of lymph node phagocytes and altered conduit system flow. *PLoS Negl Trop Dis*. **2013**; 7:e2329. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002329>

Ibrahim MK, Zambruni M, Melby CL, Melby PC. Impact of childhood malnutrition on host defense and infection. *Clin Microbiol Rev.* **2017**; 30(4):919-71. doi: 10.1128/CMR.00119-16» <https://doi.org/10.1128/CMR.00119-16>

Jacobs SR, Herman CE, Maciver NJ, Wofford JA, Wieman HL, Hammen JJ, Rathmell JC. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J Immunol.* **2008**; 180:4476 – 4486. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4476>.

Jahoor F, Badaloo A, Reid M, Forrester T. Protein metabolism in severe childhood malnutrition. *Ann Trop Paediatr.* **2008**; 28:87–101. <https://doi.org/10.1179/146532808X302107>.

Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, Itano A, Pape KA. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol.* **2001**; 19:23-45

Jiménez C, Leets I, Puche R, Anzola E, Montilla R, Parra C, Aguilera A, Garcia-Casal MN. A single dose of vitamin A improves haemoglobin concentration, retinol status and phagocytic function of neutrophils in preschool children. *Br J Nutr.* **2010**; 103:798–802. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992765>.

- Jose DG, Shelton M, Tauro GP, Belbin R, Hosking CS. Deficiency of immunological and phagocytic function in aboriginal children with protein-calorie malnutrition. *Med J Aust.* **1975**; 2:699–705.
- Kanan SO, Swar MO. Prevalence and outcome of severe malnutrition in children less than five-year-old in Omdurman Paediatric Hospital, Sudan. *Sudan J Paediatr.* **2016**;16(1):23-30.
- Kasai A, Gama P, Alvares EP. Protein restriction inhibits gastric cell proliferation during rat postnatal growth in parallel to ghrelin changes. *Nutrition.* **2012**; 28:707–712. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.10.003>
- Kavalali GM. An introduction to *Urtica* (botanical aspects). In: Kavalali (Ed.). *Urtica. Therapeutic and nutritional aspects of Stinging Nettle. Medicinal and aromatic plants—Industrial Profiles.* Taylor and Francis Co. London. **2003**; 1-11.
- Karim MY, Fadi G. A Brief Journey through the Immune System. *CJASN.* **2015**, 10 (7) 1274-1281; DOI: 10.2215/CJN.10031014
- Keusch GT. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J Nutr.* **2003**; 133:336S-40S.
- Kim YI, Hayek M, Mason JB, Meydani SN. Severe folate deficiency impairs natural killer cell-mediated cytotoxicity in rats. *J Nutr.* **2002**; 132:1361–1367.
- Konrad L, Muller HH, Lenz C, Laubinger H, Aumuller G, Chius JJ. Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a stinging nettle root (*Urtica dioica*) extract. *Planta Med.* **2000**; 66. 44-47

- Kouam CE, Delisle H, Ebbing HJ, et al. Perspectives for integration into the local health system of community-based management of acute malnutrition in children under 5 years: A qualitative study in Bangladesh. *Nutr J.* **2014**; 13:1-15. [[http:// dx.doi.org/10.1186/1475-2891-13-22](http://dx.doi.org/10.1186/1475-2891-13-22)]
- LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* **2008**; 112(5):1570-1580.
- Le Moal MA, Colle JH, Galelli A, Truffa-Bachi P. Mouse T-lymphocyte activation by _ agglutinin. II.--Original pattern of cell activation and cytokine production induced by UDA. *Res Immunol.* **1992**; 143(7):701-9.
- Leite SN, Jordao AA, Jr, Andrade TA, Masson DDS, Frade MA. Experimental models of malnutrition and its effect on skin trophism. *An Bras Dermatol.* **2011**; 86:681–688. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000400009>.
- Lykke M, Hother AL, Hansen CF, Friis H, Molgaard C, Michaelsen KF, Briend A, Larsen T, Sangild PT, Thyman T. Malnutrition induces gut atrophy and increases hepatic fat infiltration: studies in a pig model of childhood malnutrition. *Am J Transl Res.* **2013**; 5:543–554
- Lyra JS, Madi K, Maeda CT, Savino W. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. *J Pathol.* **1993**; 171:231–236. <https://doi.org/10.1002/path.1711710312>.

- Mamta S, Preeti k. *Urtica dioica* (Stinging nettle): A review of its chemical, pharmacological, toxicological and ethnomedical properties. *Int J Pharm.* **2014**, (4): 270-277.
- Márquez GH, García SM, Caltenco SM, GarcíaVE, Márquez FH, Villa RR. Clasificación y evaluación de la desnutrición en el paciente pediátrico. *El Residente.* **2012**; 7(2):59-69.
- Mechanick JI. Practical aspects of nutritional support for woundhealing patients. *Am J Surg.* **2004**; 188:52–56. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(03\)00291-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(03)00291-5).
- Mehta NM, Corkins MR, Lyman B, et al. Defining pediatric malnutrition: a paradigm shift towards etiology-related definitions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* **2013**; 37:460-481.
- Menendez PA, Fernandez S, Diaz F, Marin B. Malnutrition in rats during pregnancy and lactation period: a study on body, spleen and thymus weights and hematologic parameters in dams and their offspring. *Rev. Esp. Fisiol.* **1987**; 43, 287–296.
- Meral I, Kanter M. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on Selected Mineral Status and Hematological Values in CCl₄-Treated Rats. *Cell Proliferation.* **2003**; 46, 164–171.
- Modarresi ChA, Ibrahim D, Fariza SS, Mousavi L. Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. *Rev Biol Trop.* **2012**; 60(4):1567-76.

Monárrez J and Martínez H. "Prevalence of malnutrition in Tarahumara children under 5 years of age in the municipality of Guachochi, Chihuahua". *Salud Pública Mex.* **2008**; 42, 2000. 8-16.

Mondal D, Minak J, Alam M, Liu Y, Dai J, Korpe P, Liu L, Haque R, Petri WA, Jr. Contribution of enteric infection, altered intestinal barrier function, and maternal malnutrition to infant malnutrition in Bangladesh. *Clin Infect Dis.* **2012**; 54:185–192. <https://doi.org/10.1093/cid/cir807>.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, **1986**. 136:2348-57.

Mosmann TR, Kobie JJ, Lee FE, Quataert SA. T helper cytokine patterns: defined subsets, random expression, and external modulation. *Immunol Res*, **2009**.

Mosmann, TR. Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets. *Immunol Res*, **1991**; 10:183-8.

Mükemre M, Behçet L and Çakılcıoğlu U. Survey of wild food plants for human consumption in villages of Çatak (Van-Turkey). *Indian J Tradit Knowle.* **2016**, 15 (2): 181-191.

Müller O y Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *Can Med Assoc J.* **2005**, 173(3): 279-286.

Murphy K. *Janeways's Immunobiology*. 2012th ed. Garland Science, Taylor & Francis Group. **2012**.

- Nahata A, Dixit VK. Ameliorative effects of Stinging Nettle (*Urtica dioica*) on testosterone induced prostatic hyperplasia in rats. *Andrologia*. **2011**; 44 Suppl 1: 396-409
- Najera O, Gonzalez C, Cortes E, Toledo G, Ortiz R. Effector T lymphocytes in well-nourished and malnourished infected children. *Clin Exp Immunol*. **2007**; 148:501–506. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03369.x>.
- Najera O, Gonzalez C, Toledo G, López L, Ortiz R. Flow cytometry study of lymphocyte subsets in malnourished and well-nourished children with bacterial infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. **2004** 11:577–580.
- Nájera O, González M, Betancourt, y cols. "La desnutrición en México: revisión de los programas gubernamentales y los estudios diagnósticos de alcance nacional." *Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx*. **2001**; 58: 120-133.
- Nassar MF, El-Batrawy SR, Nagy NM. CD95 expression in white blood cells of malnourished infants during hospitalization and catch-up growth. *East Mediterr Health J*. **2009**; 15:574–583
- Nayak KC, Sethi AS, Aggarwal TD, Chadda VS, Kumar KK. Bactericidal power of neutrophils in protein calorie malnutrition. *Indian J Pediatr*. **1989**; 56:371–377. <https://doi.org/10.1007/BF02722303>.
- Neyestani TR, Woodward B. Blood concentrations of Th2-type immunoglobulins are selectively increased in weanling mice subjected to acute malnutrition. *Exp Biol Med (Maywood)*. **2005**; 230:128–134.

- Niiya T, Akbar SM, Yoshida O, Miyake T, Matsuura B, Murakami H, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Impaired dendritic cell function resulting from chronic undernutrition disrupts the antigen-specific immune response in mice. *J Nutr.* **2007**; 137:671–675
- Nodera M, Yanagisawa H, Wada O. Increased apoptosis in a variety of tissues of zinc-deficient rats. *Life Sci.* **2001**; 69:1639–1649. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01252-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01252-8).
- OMS. "Use and interpretation of anthropometric indicators". **1986**.
- OMS. Estadísticas sanitarias Mundiales. **2011**.
http://www.who.int/whosis/whostat/ES_WHS2011_Full.pdf
- Orozco RC. Desarrollo de respuesta: como activación, reconocimiento, diferenciación y especialización junto al proceso de memoria de los linfocitos T. MEDICINA/BACTERIOLOGIA at Universidad Cooperativa de Colombia/Universidad de Santander.
<https://es.slideshare.net/ciroenriqueorozcorosado/linfocitos-t-por-ciro-enrique-orozco-rosado-md-y-bact>
- Ortiz R, Cortés E, Pérez, y cols. "Desnutrición experimental por competencia de alimento durante la lactancia y su efecto sobre la fórmula leucocitaria en sangre periférica." *Animal Experim*, **1999**; 33-39

- Ortiz R, Cortés E, Pérez L, González C, and Betancourt M. Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation. *Med Sci Res.* **1996**; 24:843–6.
- Ortiz R, Cortes L, Cortes E, Medina H. Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocyte subpopulations of rats. *Clin Exp Immunol.* **2008**; 155:96 –106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03796.x>.
- Ortiz R, Cortés L, Gómez J, González C, and Cortés E. Análisis con citometría de flujo de los diferentes tipos de timocitos en ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ. Biodiversidad.* **2000**; 1(2): 77-84.
- Ortiz R, Rodriguez L. Effects of malnutrition on immunologic function. *Curr. Res. in Immunol.* **2008**; 2:(1-25).
- Otles S, Yalcin B. Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. *ScientificWorldJournal.* **2012**; 2012:564367.
- Palacio A, Lopez M, Perez BF, Monkeberg F, Schlesinger L. Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. *J Clin Endocrinol Metab.* **2002**; 87:3040-6.
- Palomo GI, Ferreira VA, Sepúlveda CC, Roseblatt S, Vergara CU. *Fundamentos de Inmunología básica y clínica.* Ed. Universidad de Talca Chile. **2009**.
- Panyi G, Varga Z, Gaspar R. Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol Lett.* **2004**; 92:55-66.

- Parslow G, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. Inmunología básica y clínica. El Manual Moderno. México. **2002**; 918 pp.
- Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* **2014**; 14:141–153.
<https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Peumans WJ, de Ley M, Broekaert. An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. *FEBS.* **1984**; 177:99103.
- Pinelli P, Ieri F, Vignolini P, Bacci L, Baronti S, Romani A. Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. *J Agric Food Chem.* **2008**; 56(19):9127-32. doi: 10.1021/jf801552d.
- Polat R, Çakılcıoğlu U, Ulasan MS and Paksoy MY. Survey of wild food plants for human consumption in Elazığ (Turkey). *Indian J Tradit Knowle.* **2015**. 1(1): 69-75.
- Prentice AM. The thymus: a barometer of malnutrition. – *Br. J. Nutr.* **1999**; 81, 345–347
- Rafajlovska V, Kavrakovski Z, Simonovska J, and Srbinoska M. Determination of protein and mineral contents in Stinging Nettle. *QOL.* **2013**; 4(1-2):26-30
- Ravasco P, Anderson H, Mardones F. Métodos de valoración del estado nutricional. *Nutr. Hosp.* 2010, 25(Suppl 3): 57-66.

- Reddy V, Raghuramulu N, Bhaskaram C. Secretory IgA in protein-calorie malnutrition. *Arch Dis Child.* **1976**; 51:871–874. <https://doi.org/10.1136/adc.51.11.871>.
- Redmond HP, Leon P, Lieberman MD, Hofmann K, Shou J, Reynolds JV, Goldfine J, Johnston RB, Jr, Daly JM. Impaired macrophage function in severe protein-energy malnutrition. *Arch Surg.* **1991**; 126:192–196. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1991.01410260080011>.
- Reid M, Badaloo A, Forrester T, Morlese JF, Heird WC, Jahoor F. The acute-phase protein response to infection in edematous and nonedematous protein-energy malnutrition. *Am J Clin Nutr.* **2002**; 76:1409–1415.
- Reiner SL. Development in motion: helper T cells at work. *Cell.* **2007**; 129:33-6.
- Ritz BW, Aktan I, Nogusa S, Gardner EM. Energy restriction impairs natural killer cell function and increases the severity of influenza infection in young adult male C57BL/6 mice. *J Nutr.* **2001**; 38:2269–2275. <https://doi.org/10.3945/jn.108.093633>.
- Rodak, B. *Hematología: Fundamentos y Aplicaciones Clínicas*. 2da ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. **2005**. Pp. 54-154
- Rodríguez L, Cervantes E, Ortiz R. Malnutrition and gastrointestinal and respiratory infections in children: A public health problem. *Int J Environ Res Public Health.* **2011**; 8:1174–1205.

- Rodríguez L. Evaluación por citometría de flujo de la producción de citocinas en linfocitos de niños desnutridos. Investigación en ciencias biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México. **2005**; 110
- Roitt I, Immunología. Fundamentos. 11a. Ed. Editorial Médica Panamericana, **2008**.
Acceso on line: <http://books.google.com.ar/>
- Rovira P, Buckle M, Abastado JP, Peumans WJ, Truffa-Bachi P. Major histocompatibility class I molecules present *Urtica dioica* agglutinin, a superantigen of vegetal origin, to T lymphocytes. Eur J Immunol. **1999**; 29(5):1571-80.
- Rytter M, Kolte L, Briend A, Friis H, and, Christensen V. The immune system in children with malnutrition--a systematic review. PLoS One. **2014**; 25; 9(8).
- Sakakibara Y, Sato S, Kawashima Y, Someya Y, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Different recovery responses from dietary zinc-deficiency in the distribution of rat granulocytes. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). **2011**; 57:197–201.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.57.197>.
- Salimonu LS, Ojo-Amaize E, Johnson AO, Laditan AA, Akinwolere OA, Wigzell H. Depressed natural killer cell activity in children with protein-calorie malnutrition. II. Correction of the impaired activity after nutritional recovery. Cell Immunol. **1983**; 82:210 –215. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(83\)90154-5](https://doi.org/10.1016/0008-8749(83)90154-5).

Salimonu LS, Ojo-Amaize E, Williams AI, Johnson AO, Cooke AR, Adekunle FA, Alm GV, Wigzell H. Depressed natural killer cell activity in children with protein-calorie malnutrition. *Clin Immunol Immunopathol.* **1982**; 24:1–7. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(82\)90082-4](https://doi.org/10.1016/0090-1229(82)90082-4).

Sánchez C, Gupta M, Santana A. Actividad inmunomoduladora de las plantas (I). *Revista de Fitoterapia.* **2002**; 2(2):151:163.

Saucillo DC, Gerriets VA, Sheng J, Rathmell JC, Maciver NJ. Leptin metabolically licenses T cells for activation to link nutrition and immunity. *J Immunol.* **2014**; 192:136 –144. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301158>.

Sauerwein R, Mulder J, Mulder L, Lowe B, Peshu N, Demacker P, et. al. Inflammatory mediators in children with protein-energy malnutrition. *Am J Clin Nutr.* **1997**; 65:1534-39.

Savino W, Dardenne M, Velloso LA, Dayse Silva-Barbosa S. The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Br J Nutr.* **2007**; 98(Suppl1):S11–S16. <https://doi.org/10.1017/S0007114507832880>.

Savino W. The thymus gland is a target in malnutrition. *Eur J Clin Nutr.* **2002**; 56 Suppl 3, S46-9.

Schaible U, and Kaufmann S. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med.* **2007**; 4(5): e115.

- Schilcher H, Effenberger S. Scopoletin und β -Sitosterol-zweigeignete Le it substanzen für *Urticae radix*. Dtsch. Apoth. Zeit. **1986**; 126:79-81.
- Shamah LT, Rivera JA, Villalpando S, Cuevas N, Garcia GA. Estudio de magnitud de la desnutrición infantil, determinantes y efectos de los programas de desarrollo social 2007-2012. **2012**
- Shimosato T, Tomida K, Otani H. Effect of *Lactobacillus pentosus* ONRIC b0240 on intestinal IgA production in mice fed differing levels of protein. J Agric Food Chem. **2011**; 59:2646–2651. <https://doi.org/10.1021/jf104240d>.
- Someya Y, Tanihata J, Sato S, Kawano F, Shirato K, Sugiyama M, Kawashima Y, Nomura S, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Zinc-deficiency induced changes in the distribution of rat white blood cells. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). **2009**; 55:162–169. <https://doi.org/10.3177/jnsv.55.162>
- Tan B, and Vanitha J. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional chinese medicinal herbs: A Review. Current Med Chem. **2004**; 11: 1423-30.
- Tapia AR, Ramírez CA, González GA, Contreras A, and Velasco LR. Hematopoietic activity of *Urtica dioica in vitro*. Memories of the 54 Annual meeting of the Western Pharmacology Society. Mexico City. **2011**; 162.
- Taylor AK, Cao W, Vora KP, De La Cruz J, Shieh WJ, Zaki SR, Katz JM, Sambhara S, Gangappa S. Protein energy malnutrition decreases immunity and increases susceptibility to influenza infection in mice. J Infect Dis. **2013**; 207:501–510. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis527>

Twining SS, Schulte DP, Wilson PM, Fish BL, Moulder JE. Vitamin A deficiency alters rat neutrophil function. *J Nutr.* **1997**; 27:558–565.)

UNICEF (México) Informe Anual 2016. Estado mundial de la infancia 2016: una oportunidad para cada niño. **2016**

UNICEF. La desnutrición infantil. Causas, consecuencias y estrategias para su prevención y tratamiento. Wendy Wisbaum. España, UNICEF; **2011**.

UNICEF/WHO/World Bank. Levels and trends in child malnutrition: UNICEF–WHO–The World Bank joint child malnutrition estimates. United Nations Children’s Fund, World Health Organization and World Bank. **2012**

Varg I, Nescakova E, Toth F, Uhrinova A, Adamkov M. Nutrition and immune system: the size of the thymus as an indicator of the newborn's nutrition status. *Anthropol Anz.* **2011**; 68(3):265-74.

Vásquez GE, Stein K, Méndez EC, Pérez BE, Romero VE, Ibarra GI, García IT. Efecto de la recuperación nutricia sobre la concentración de Interleucina-2 en niños con desnutrición grave. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* **2008**; 144.

Vega FL. “Hitos conceptuales en la historia de la desnutrición proteicoenergética”, en *Salud Pública de México*, **1999**, vol. 41.

Velasco LR, Fregoso PM, Flores SJL, Carrillo SJ, Herrera SSB, Vega AE, Barrera EE. Ability of *Urtica chamaedrydes* pursh to restore hematopoiesis in anemic pregnant mice. *J Intercult Ethnopharmacol.* **2013**; 2(1): 37-42.

- Villaseñor RJ, and Espinosa G. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. **1998**.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008, 9:503–510.
- Walson JL, Berkley JA. The impact of malnutrition on childhood infections. *Current Opinion in Infectious Diseases.* **2018**; 31(3):231-236.
doi:10.1097/QCO.0000000000000448.
- Waterlow JC. Protein-energy malnutrition: the nature and extent of the problem. *Clin Nutr.* **1997** Mar; 16 Suppl 1:3-9.
- Waterlow JC. Malnutrición proteico energética. Organización Panamericana de la Salud, Capítulo I. **1996**
- Winslow MM, Neilson JR, Crabtree GR. Calcium signalling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* **2003**; 15:299-307.
- Zdrojewicz Z, Pachura E, Pachura P. The Thymus: A Forgotten, But Very Important Organ. *Adv Clin Exp Med.* **2016**; 25(2):369-75. doi: 10.17219/acem/58802.

ARTÍCULO PUBLICADO



ORIGINAL RESEARCH

Open Access

Effects of extract of *Urtica dioica* L. (stinging nettle) on the immune response of rats with severe malnutrition

Sara Beatriz Herrera^{1,2}, Leonor Rodríguez², María del Carmen García³, José Luis Flores², Rodolfo Velasco²

¹Posgrado en Biología Experimental, Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, Mexico

²Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, Mexico

³Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

ABSTRACT

Background: Severe malnutrition is the main cause of immunodeficiency in children under 5 years in areas of economic depression in developing countries, and it is associated with generalized atrophy of lymphoid tissues. *Urtica dioica* L. is a medicinal herb with multiple pharmacological functions; it acts as modulator of the immune response, stimulating the proliferation of T lymphocytes *in vitro*.

Objective: To determine the ability of *U. dioica* L. to modulate the immune response of malnourished rats in the first 21 days of life.

Methods: Third-degree malnutrition during lactation was induced by food competition, and treatment with *U. dioica* L. was tested. Day-old Wistar rats were randomly assigned to three groups: (a) the well-nourished group, (b) the untreated malnourished group, and (c) the malnourished group treated with 0.2 g/ml *U. dioica* L. on days 14, 16, 18, and 20. On day 21, animals were euthanized, and the thymus, spleen, bone marrow, and blood were obtained. Lymphocyte subpopulations were determined in the thymus and leukocyte subpopulations in blood. The total number of nucleated bone marrow cells was determined, and the proliferative capability of spleen lymphocytes from malnourished rats treated with *U. dioica* L. was compared to that of other groups.

Results: *Urtica dioica* L. decreased CD4⁻ CD8⁻ lymphocytes and increased CD4⁺ CD8⁺ lymphocytes in the thymus, while in the blood, it increased CD4⁺ cells, monocytes, and total T lymphocytes. The proliferation of spleen cells was stimulated in the malnourished rats, and a decrease in total nucleated bone marrow cells was observed. An increase in the red blood cell count, hemoglobin, and white blood cell count was observed in malnourished rats treated with *Urtica dioica* L. ($p \leq 0.05$).

Conclusion: *Urtica dioica* L. had immunomodulatory effects since it promoted the differentiation of CD4⁻ CD8⁻ T lymphocytes toward CD4⁺ CD8⁺ T lymphocytes and counteracted anemia and leucopenia associated with severe malnutrition.

ARTICLE HISTORY

Received May 08, 2018

Accepted September 19, 2018

Published October 11, 2018

KEYWORDS

Severe malnutrition; immunodeficiency; immunomodulatory activity; T lymphocytes; *Urtica dioica* L.

Introduction

Malnutrition is a public health problem that mainly affects developing countries as a consequence of poor economic and social conditions. Malnutrition results from an imbalance between food intake and nutritional requirements [1–3]. Severe malnutrition or protein energy malnutrition (PEM) is an extreme condition and is the

main cause of immunodeficiency in children under 5 years [4]. In neonates and preschool children, PEM has been shown to impair the immune response and is associated with generalized atrophy of lymphoid tissues [5,6], causing a chain of immunological alterations characterized by leucopenia, a decrease in the ratio of T CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes and an increase in T

Contact Sara Beatriz Herrera-Solís ✉ sarahs@xanum.uam.mx 📧 Laboratorio de Hematología Experimental, Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud-Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, Mexico.

© 2018 The Authors. This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes in circulating blood [7], anemia, and thrombocytopenia.

Different substances, such as flavonoids, polysaccharides, lactones, and glycosides, are present in several plants and can affect humoral or cellular factors of the immune response [8,9]. Plants such as *Panax ginseng*, *Tinospora cordifolia*, and *Asparagus racemosus* have been shown to stimulate the immune system [10] and, therefore, have opened doors for the development of new plant-based immunostimulatory drugs. Stinging nettle, *Urtica dioica* L., has been proposed to have such immunostimulatory effects.

Urtica dioica L. (Urticaceae) is an herbaceous plant of economic importance due to its medicinal, food, nutritional complement, and textile properties. This plant is widely distributed in America, Europe, and Asia [11,12]. *Urtica* grows in central and Southwestern Mexico, where it is known by many common names, including “Ortiga,” “Chichicastle,” and “Mala mujer” [13,14]. It is an annual or perennial plant that reaches up to 1 m in height and presents stinging trichomes on the stem and leaves.

Urtica dioica L. has been recommended as an adjuvant treatment for rheumatic conditions, a nutritional tonic, and anti-anemic treatment, and has been suggested for the treatment of headache, eczema, skin care, edema, lower urinary tract infections, and allergies [15–17]. *Urtica dioica* L. has multiple pharmacological functions, including anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, antiplatelet, antihyperglycemic, antihyperlipidemic, antiviral, anticancer, and antiandrogenic activities, among others [18].

In vitro studies have shown that the plant possesses β -sitosterol and scopoletin, molecules that could be of clinical use in the management of benign prostatic hyperplasia because both inhibit 5 α -reductase, which is associated with this condition [19]. As mentioned previously, another important activity of *U. dioica* L. is its role as a modulator of the immune response because it has been reported that *U. dioica* L. increases chemotaxis and the metabolic integrity of neutrophils from healthy humans *in vitro* [20]. Quercetin and two glycosidic flavonoids from a methanolic extract of the aerial parts of this plant stimulated chemotaxis of neutrophils [21]. In addition, *U. dioica* L. has been shown to stimulate the proliferation of mouse spleen T lymphocytes *in vitro* and result in a moderate increase in CD4⁺ T lymphocytes [22]. An aqueous decoction of the aerial structures of the plant stimulated the proliferation of mouse spleen lymphocytes *in vitro*, thereby confirming that the plant extract

can stimulate proliferation of cells of the immune system [23].

Urtica dioica L. has a wide range of compounds, including glycopyranosides, glycoproteins, proteins, flavonol glycosides, carotenoids, and biologically active compounds, such as caffeic acid, quinic acid, essential oils, formic and acetic acid, histamine, tannins, mucilage, and vitamins (A, B1, B2, C, K1, folic acid, and pantothenic acid), which can contribute to improved health in childhood malnutrition [24,25].

Considering that severe malnutrition causes immunodeficiency in children under 5 years of age, mainly in developing countries such as Mexico, which is rich in plants for medicinal use, among them *U. dioica* L.; the present study aimed to determine the effects of *U. dioica* L. on the proportion of T and B lymphocytes and the proliferative capacity of thymus, spleen, bone marrow, and blood cells using an experimental model of rats with third-degree malnutrition.

Materials and Methods

Chemicals and reagent tests

The following chemical and reagent tests were obtained: xylazine [Procin, México; Chemical Abstracts Service (CAS) 23076-35-9]; sodium chloride (NaCl; Meyer, México; CAS 7647-14-5); phosphate-buffered saline (PBS-DULBECCO; Microlab, Mexico; Mecanismo de Desarrollo Limpio MFCD00131855); monoclonal antibodies: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, and anti-CD45 (Biolegend, San Diego, CA); fluorochromes [fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin chlorophyll protein (PerCP) or allophycocyanin (APC)] (BD Biosciences, San Jose, CA); Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Corp., Japan); trypan blue (CAS 72-57-1); Concanavalin A (ConA; CAS 11028-71-0); bovine serum albumin (Cohn Fraction V, pH 7.0; CAS 9048-46-8); and paraformaldehyde (CAS 30525-89-4, Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO).

Stinging nettle (*U. dioica* L.) leaf extract (Enzymatic Therapy, LLC, part of Nature’s Way Brands) was obtained. Stinging nettle (600 mg, serving size 2 capsules) was standardized to contain 1% silicic acid. This product contains natural ingredients. Entreprise de Taille Intermédiaire is a The Food and Drug Administration-registered drug establishment.

Determination of the total polyphenol content of the extract of *U. dioica* L.

The total concentration of phenols was determined by spectrophotometry using Folin–Ciocalteu reagent as the oxidant agent [26].

Calibration curve

A standard solution of gallic acid (0.1 mg/ml) was used, from which volumes were taken from 0 to 100 μ l in 20 μ l intervals, and the volume of each solution was diluted up to 500 μ l with distilled water. Determination of phenols in the powder of a capsule of *U. dioica* L. was performed. First, 5 mg of extract was dissolved in 1 ml of distilled water and diluted 1:10 with distilled water, and 40 μ l of this solution was taken and then diluted to 500 μ l with distilled water. Finally, to each of the standards and previously prepared plant sample, 250 μ l of Folin-Ciocalteu 1 N reagent was added and agitated in a vortex for 5 minutes. Subsequently, 1,250 μ l of 20% Na_2CO_3 was added and allowed to stand for 2 hours. The absorbance was measured at 760 nm. The results are expressed as a percentage of gallic acid equivalent per milligram dry matter (% GAE/mg dry matter).

Experimental animals

Wistar rats were obtained from the animal facilities of the "División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I)" in Mexico City, Mexico. The animals were kept under controlled temperature (22°C–25°C) and 45% relative humidity with a 12–12 hour light–dark period (light 07:00–19:00 hour) with free access to food (Purina Mills International 5001, Richmond, VA) and water. Experiments were performed according to the guidelines of the UAM-I and the Official Mexican Guidelines (NOM-062-ZOO-1999). Nursing mother rats of approximately 350 g at 4 months of age were used.

Induction of malnutrition and treatment *U. dioica* L.

Malnutrition during lactation was induced by food competition [27]. Rats (1 day of birth) from different litters were randomly assigned to one of two groups: (1) the well-nourished group (WN), eight pups with a nursing mother (control group), and (2) the malnourished group (MN), 16 pups with a nursing mother.

The pups were weighed every 2 or 3 days to estimate the body weight of each litter from the first day until weaning (day 21) to determine the degree of malnutrition compared to age-matched controls (WN). On day 14, rats with a weight deficit greater than 40% (rats with third degree or severe malnutrition) were used. Then, the MN group was distributed into two subgroups: (a) MN rats that received saline physiological solution and (b) MN rats

treated with 0.2 g/ml *U. dioica* L. (MNUd), which was intragastrically administered through a cannula on days 14, 16, 18, and 20. On day 21, rats were anesthetized with xylazine, and blood was obtained by cardiac puncture with a heparinized syringe. Thymus, spleen and bone marrow were obtained. The weight (in grams) of the thymus and spleen of each rat was recorded and compared with the WN group. For the comparison, one-way analysis of variance (one-way ANOVA) was employed with the Tukey test as necessary to establish the statistical significance, for which 95% was taken as an index of reliability with a $p < 0.05$.

Determination of lymphocyte subpopulations in thymus

The thymus was extracted, cells were obtained by homogenizing the organ and filtering through 85- μ m mesh, and the disrupted cells were suspended in Ca^{++} and Mg^{++} -free phosphate saline (PBS, pH 7.0). Cell viability was determined with 0.2% trypan blue and adjusted to 1×10^7 cells/ml, which were placed in 5 ml tubes (Falcon®). Cells were stained with 2 μ l of monoclonal antibodies, anti-CD4 and anti-CD8 conjugated to APC and PE fluorochromes, for 30 minutes. Then, 2 ml of 0.5% PBS-albumin was added and centrifuged for 5 minutes at 1,500 rpm. Subsequently, 500 μ l of fixative solution (1% paraformaldehyde) was added. Ten thousand cells were analyzed on a flow cytometer using the CELLQuest® program. The results are expressed as the percentage of positive cells for the corresponding marker. In each sample, CD4⁺ CD8⁺ (double positive, for both fluorescence markers), CD4⁻ CD8⁻ (double negative, for both fluorescence markers), CD4⁺ CD8⁻ (single positive, only for CD4 fluorescence), and CD8⁺ CD4⁻ (single positive, only for CD8 fluorescence) cells were identified.

Determination of leukocyte subpopulations in blood

A total of 100 μ l of blood from each rat was loaded into 5 ml tubes (Falcon®), and 2 μ l of the following monoclonal antibodies conjugated to different fluorochromes were used: (1) CD3⁺ FITC, CD8⁻ PE, and CD4⁺ APC for CD4 T lymphocytes, (2) CD3⁺ FITC, CD8⁺ PE, and CD4⁻ APC for CD8 T lymphocytes, (3) CD3⁻ FITC, CD8⁻ PE, and CD4⁺ APC for monocytes, (4) CD45-RA FITC and CD45⁺ PerCP for B lymphocytes, and (5) CD3⁺ FITC and CD45⁺ PerCP for total T lymphocytes. After 30 minutes, 2 ml of lysis solution (FACS Lysing Solution, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose,

CA) was added and incubated for 10 minutes at room temperature. Subsequently, each sample was centrifuged for 5 minutes at 500 g at room temperature, the supernatant was removed, and the cell button was washed with 0.5% PBS-albumin. Then, 500 μ l of the paraformaldehyde fixative solution (1% in PBS) was added, and the cells were suspended prior to determination. At least 10,000 cells were analyzed by flow cytometry. The analysis was performed with CELLQuest[®]. The results were analyzed in dot graphs and are expressed as the percentage of positive cells for each marker. For each sample, four cell types were identified: CD4⁺ CD8⁻ cells (single positive, only for CD4 fluorescence), CD8⁺ CD4⁻ cells (single positive, only for CD8 fluorescence), monocytes, B lymphocytes and T lymphocytes. Granulocytes were not determined.

Flow cytometry

Determination of lymphocyte subpopulations in the thymus and determination of leukocyte subpopulations in blood was performed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Immunocytometry System (BDIS), CA) with an argon laser (488 nm).

Automated blood cell analysis

The total concentration of white blood cells (WBCs), red blood cells (RBCs), erythroid parameters, platelet count, and the lymphocyte/neutrophil relationship were determined using a KX-21N automatic analyzer (Sysmex, Japan).

Total count of nucleated bone marrow cells

The right femur of each rat was dissected, their muscles were removed and 1 ml of physiological saline was injected through the femoral canal. The cells were collected in a plastic tube and homogenized by pipetting. The cell suspension was diluted 1:20 with Turk's solution, and total nucleated cells were counted in a Neubauer chamber under a light microscope.

Determination of proliferation of spleen lymphocytes from malnourished rats treated with *U. dioica* L.

Under sterile conditions, the spleen of rats was isolated, dispersed mechanically on a metal 30 μ m mesh, and washed with saline solutions. The cell suspension with 95% viability was added (trypan blue 0.2%) and adjusted to 2×10^6 /ml in 96-well plates

containing 100 μ l aliquots in the presence of 10 mg/ml ConA and incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ and humidity of 90% for 68 hours. As a control group, cells were cultured with RPMI-1640 medium without ConA. Each culture was performed in triplicate five times. Subsequently, 10 μ l of CCK-8 (CCK-8, Dojindo Corp., Japan) was added to each well, and the plate was incubated for 4 hours at 37°C in a 5% CO₂ and 90% humidity atmosphere. The absorbance at 450 nm was read with an enzyme-linked immuno sorbent assay plate reader (BioTek, USA).

Statistical analysis

The statistical program NCSS 2010 (Version: 07.1.20) was used. Values are expressed as the mean \pm standard error (M \pm SE). For the comparison between the means of the treated groups *versus* the control groups, we employed one-way ANOVA with Tukey's test and the Duncan test as necessary to establish statistical significance, using 95% as an index of reliability with a $p < 0.05$.

Results

Preliminary determination of total polyphenols in the extract of *U. dioica* L.

The concentration was calculated from a standard curve ($y = 0.0674X + 0.0082$; $R^2 = 0.9975$) made with gallic acid. The content of total polyphenols in *U. dioica* L. capsules was 2.43% GAE/mg dry matter.

Body weight of well-nourished and experimentally malnourished rats left untreated and treated with *U. dioica* L. during the lactation period

Through the model of malnutrition, only 30%–40% of rats per litter reached the third degree of malnutrition; the cumulative data are shown in Table 1.

The average body weight of newborn rats (before the treatment) was 7.6 ± 0.1 g. At day 20, the average body weight of the WN group was 43.4 ± 0.6 g *versus* 26.1 ± 0.3 g in the MN group and 26.0 ± 0.7 g in the MNUd group. MN rats had a weight ten times lower than the WN rats, indicating that the MN and MNUd groups were still malnourished. In addition, no statistically significant difference was observed between the weights of the MNUd rats and the untreated MN rats (Table 1).

Weights of the thymus and spleen

The average weight of the thymus in the WN rats was 0.145 ± 0.017 g, whereas the average weight

Urtica dioica L. on immunity of malnourished rats

Table 1. Body weight observed during lactation in well-nourished rats and malnourished rats.

Group	Day								
	1	4	7	9	12	14	16	18	20
WN	7.6 ± 0.1	11.0 ± 0.4	14.8 ± 0.5	20.1 ± 0.5	24.8 ± 0.5	29.6 ± 0.5	33.8 ± 0.5	38.1 ± 0.6	43.4 ± 0.6
MN	7.6 ± 0.1	9.2 ± 0.1	11.5 ± 0.1	14.8 ± 0.1	16.9 ± 0.2*	20.3 ± 0.2*	22.1 ± 0.2*	24.2 ± 0.3*	26.1 ± 0.3*
MNUd	7.6 ± 0.1	9.2 ± 0.1	11.5 ± 0.1	14.8 ± 0.1	16.9 ± 0.2*	19.6 ± 0.4*	21.8 ± 0.4*	23.9 ± 0.6*	26.0 ± 0.7*

WN = well-nourished rats ($n = 68$), MN = malnourished rats ($n = 161$), and MNUd ($n = 37$) = Malnourished rats treated with *Urtica dioica* L. Data are expressed as the mean ± SE. * $p < 0.05$, significant differences with respect to the WN group.

in the MN rats was 0.050 ± 0.007 g, and the average weight in the MNUd rats was 0.069 ± 0.008 g, indicating that no significant difference was observed among the malnourished groups. However, the WN group had a significantly higher value than the malnourished groups. In addition, no significant difference was observed in the total body weights of both malnourished groups.

The mean spleen weights for the WN, MN, and MNUd groups were 0.227 ± 0.017 g, 0.067 ± 0.007 g, and 0.090 ± 0.010 g, respectively. The spleen weight of the MN group was 70% less than the spleen weight of the WN rats, and the mean spleen weight of the MNUd rats was 60%, indicating that the spleen weight of this group gained 10% (Fig. 1).

Thymocyte subpopulations

Rats from the MN group had a higher average percentage of CD4⁺ CD8⁻ thymocytes than rats from the other groups (3.04 and 1.8 times higher than the

WN and MNUd group values, respectively), and the differences were statistically significant at $p < 0.05$. In contrast, the MN group presented a lower average percentage of CD4⁺ CD8⁺ than the other groups. No significant differences were observed between the WN and MNUd groups (Fig. 2).

Distribution of circulating white blood cells

The mean percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and monocytes were lower in the MN group than in the WN group, except for B lymphocytes. The proportion of leukocytes in MNUd rats was similar to that in WN rats, except for T cells, which were decreased. There was a significant difference between the WN and MN groups; thus, malnutrition decreases the proportion of leukocytes. Although the MNUd group showed a higher proportion of CD4⁺ cells, CD8⁺ T lymphocytes, monocytes, and B cells than the MN group, only the CD4⁺ and monocyte counts showed statistically significant differences between the groups (Fig. 3).

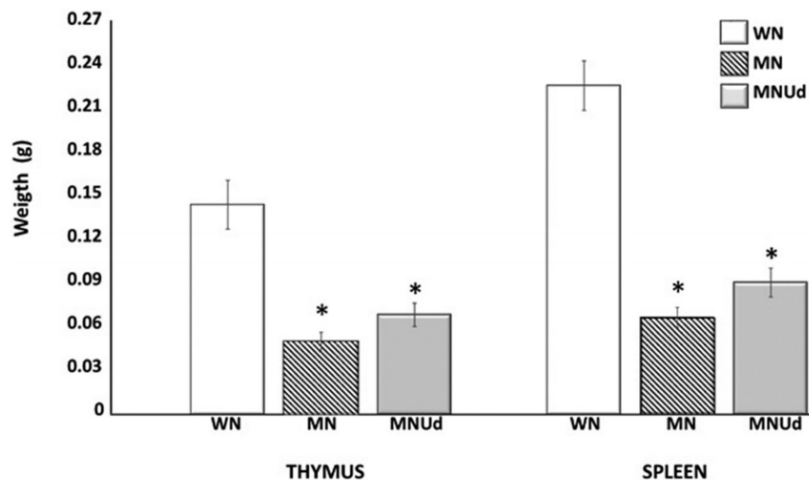


Figure 1. Weight of the thymus and spleen of malnourished rats. WN—Well-nourished rats ($n = 10$); MN—Malnourished rats ($n = 11$); and MNUd—Malnourished rats treated with *Urtica dioica* L. ($n = 15$). Data are expressed as the mean ± SE. * $p < 0.05$, significant differences with respect to the WN group.

Sara Beatriz Herrera, Leonor Rodríguez, María del Carmen García, José Luis Flores, Rodolfo Velasco

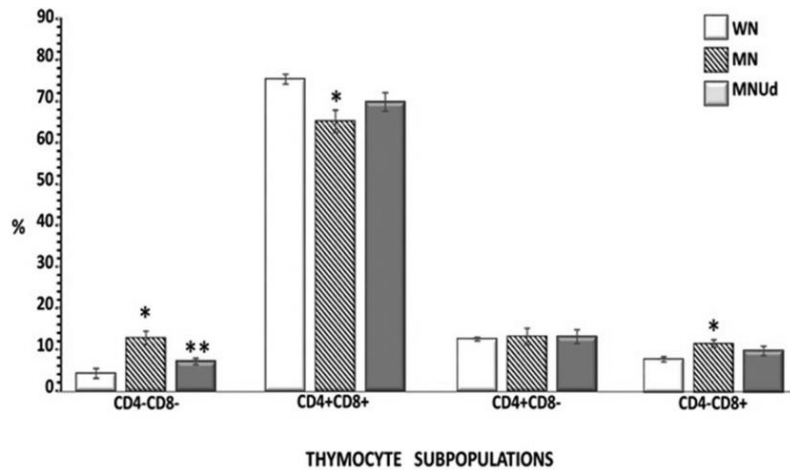


Figure 2. Average percentage of thymocyte subpopulations of malnourished rats treated with *Urtica dioica* L. WN—Well-nourished rats ($n = 5$); MN—Malnourished rats ($n = 5$); and MNUd—Malnourished rats treated with *Urtica dioica* L. ($n = 5$). Data are expressed as the mean \pm SE. * $p < 0.05$, significant differences with respect to the WN group. ** $p < 0.05$, significant differences with respect to the MN group.

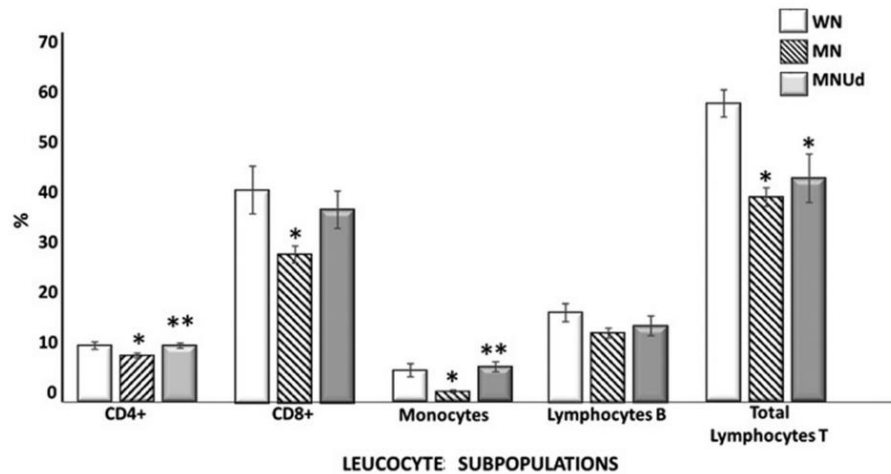


Figure 3. Average percentage of circulating WBCs in rats treated with *Urtica dioica* L. WN—Well-nourished rats ($n = 5$); MN—Malnourished rats ($n = 10$); and MNUd—Malnourished rats treated with *Urtica dioica* L. ($n = 10$). Data are expressed as the mean \pm SE. * $p < 0.05$, significant differences with respect to the WN group. ** $p < 0.05$, significant differences with respect to the MN group.

Hemocytometry

The concentration of WBCs in the MN group decreased by 29% and 25% compared to that of the WN and MNUd groups, respectively. RBC concentrations and erythroid parameters, including

hemoglobin, hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), of the MNUd group tended to be higher than those of the MN group. However, no

Urtica dioica L. on immunity of malnourished rats**Table 2.** Hemocytometry of malnourished rats treated with *Urtica dioica* L.

Group (n)	WBC × 10 ³ /μl	RBC × 10 ⁶ /μl	Hb (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	PLT × 10 ³ /μL
WN (10)	4.2 ± 0.6	5.3 ± 0.2	9.3 ± 0.4	31.3 ± 1.6	57.5 ± 1.6	17.0 ± 0.4	29.7 ± 0.7	408.8 ± 72.3
MN (9)	3.0 ± 0.2*	4.1 ± 0.4*	8.4 ± 0.6	27.0 ± 2.0	58.7 ± 2.0	19.0 ± 0.7	31.3 ± 0.4	341.0 ± 46.9
MNUd (11)	4.0 ± 0.4	4.7 ± 0.3	9.3 ± 0.6	29.3 ± 1.7	61.9 ± 0.9	20.2 ± 0.6*	32.6 ± 0.7*	290.4 ± 55.1

Hb = hemoglobin; PLT = platelet.

WN = well-nourished rats (n = 10), MN = malnourished rats (n = 9), and MNUd = malnourished rats treated with *Urtica dioica* L. (n = 11). Data are expressed as the mean ± SE.

*p < 0.05, significant differences with respect to the WN group.

statistically significant differences between the WN and MNUd groups were observed, except for MCH and MCHC, which were higher in the MNUd group ($p \leq 0.5$) (Table 2).

The ratio of lymphocytes/neutrophils in the MN and MNUd groups showed a reduction of lymphocytes with respect to that of the WN group. However, this reduction was not statistically significant. Neutrophils increased in the MN and MNUd groups compared with the WN group (Fig. 4).

Nucleated bone marrow cells

No statistically significant differences were observed among the WN, MN, and MNUd groups (Fig. 5).

Spleen cell cultures

In the WN group exposed to ConA, there was a 19.1% increase in the absorbance, indicating increased cell proliferation with respect to the same culture without ConA. For the MN group, in

the presence of ConA, the increase in absorbance was 9.2%. The MNUd group plus ConA showed an increase of 41.1% compared with the same group without ConA (Fig. 6).

Discussion

In previous studies, researchers looking for *U. dioica* L. in the field collected plants with similar morphology that turned out to be *U. chamaedryoides* and *U. dioica* var. *Angustifolia*, which showed an ability to restore hematopoiesis in pregnant mice, preventing the development of malformations in fetuses [28,29]. In later collections, the specimens were identified as *U. urens*. In addition, aqueous extract of the leaf of *U. dioica* L. (capsules) commercialized as a nutritional supplement was purchased, and a comparative study was conducted between an aqueous extract of *U. urens* and the capsules of *U. dioica* L. to assess the ability of both to stimulate the

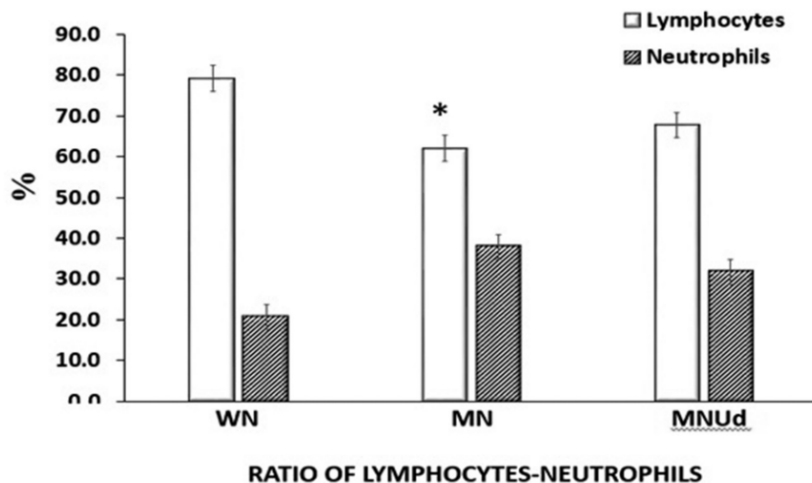


Figure 4. Lymphocyte-neutrophil count ratio of malnourished rats. WN—Well-nourished rats (n = 10); MN—Malnourished rats (n = 9); and MNUd—Malnourished rats treated with *Urtica dioica* L. (n = 11). Data are expressed as the mean ± SE. *p < 0.5, significant differences with respect to the WN group.

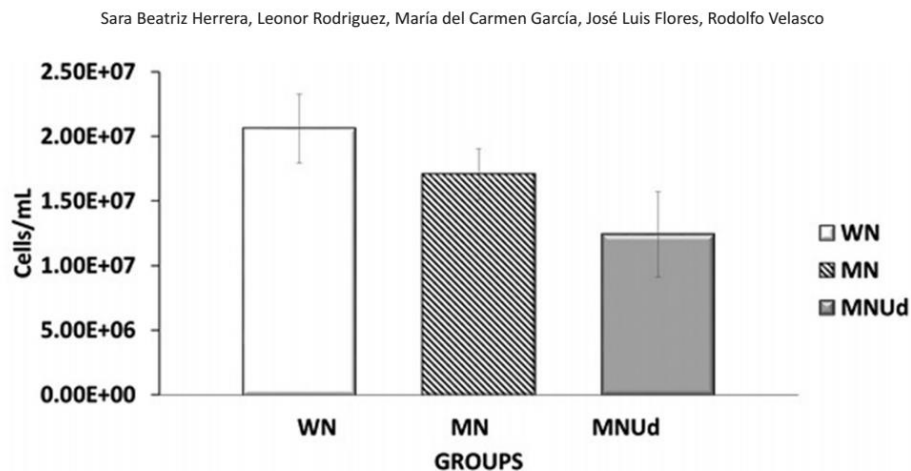


Figure 5. Total nucleated cells of bone marrow from malnourished rats. WN—Well-nourished rats ($n = 10$); MN—Malnourished rats ($n = 10$); and MNUd—Malnourished rats treated with *Urtica dioica* L. ($n = 10$). Data are expressed as the mean \pm SE. * $p < 0.5$, significant differences with respect to the WN group.

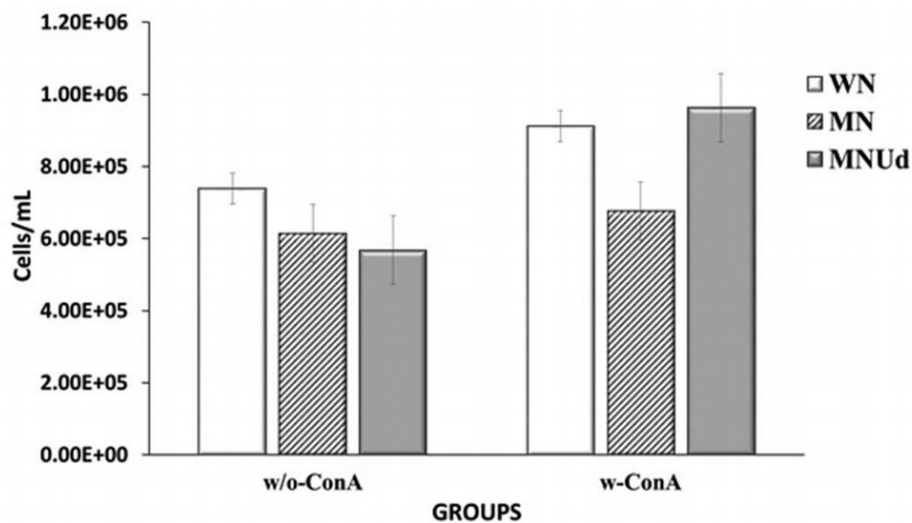


Figure 6. Proliferation of spleen cells from malnourished rats. The cultures were made in the absence (w/o-ConA) and presence of Concanavalin A (w-ConA). WN—Well-nourished rats ($n = 15$); MN—Malnourished rats ($n = 8$); and MNUd—Malnourished rats treated with *Urtica dioica* L. ($n = 10$). Data are expressed as the mean \pm SE. * $p < 0.05$, significant differences with respect to the WN group.

proliferation of rat spleen lymphocytes *in vitro*. The highest and constant activity was obtained with the *U. dioica* L. capsules, and for this reason, after establishing a dose response curve (results not included), the present work was performed with *U. dioica* L. capsules.

The concentration of phenolic compounds in capsules of stinging nettle (*U. dioica* L.) leaf extract was 2.43% of dry matter by weight; this is an important finding with respect to the different biological properties of these metabolites and their possible application in various areas, such as food/feed,

cosmetics, phytomedicine, and textiles. However, it is important to note that phenolic compounds were determined only as reference due to their normal presence in the plant.

Our results showed that severe malnutrition was induced in Wistar rats by food competition, and the MN and MNUd groups presented a 40% body weight deficit, in addition to other signs, such as poor hair, brittle bones, and poor motor activity similar to those observed in malnourished children [30]. At the end of the experiment, the MN and MNUd groups presented reduced thymus and spleen weights and severe atrophy of the thymus [31], indicating that the *U. dioica* L. promoted cell proliferation, although it was not sufficient to increase the levels to the WN group levels.

Severe protein malnutrition causes leucopenia, a decrease in the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, and an increase in the number of CD4⁻CD8⁻ cells, plus immature T cells in the circulation [32,33], as we observed in the MN group. In the MNUd group, there was a restoration of hematopoietic cell levels, indicating that our extract may promote cell differentiation and maturation to almost normal levels. The data showed that treatment with *U. dioica* L. significantly increased the percentage of CD4⁺ cells, monocytes, and T lymphocytes, resulting in cell counts in the MNUd group that did not significantly differ from those of the WN group. These results are in agreement with those reported by other authors regarding the capacity of *U. dioica* agglutinin (UDA) to stimulate the proliferation of T lymphocytes, although it does so in a delayed manner with respect to ConA [34]. The UDA behaves like a superantigen that activates the V β segments of the T lymphocyte receptor (TCR) by binding to molecules of the major histocompatibility complex type I and II [35]. Notably, the aforementioned agglutinin has been isolated from the rhizome of the plant.

Our study was carried out with a crude extract of the leaf that does not allow us to assume that this is the same mechanism of stimulation as that for the proliferation of T cells [36].

In blood cytometry analyses, the concentration of WBCs in the MN group was lower by 29% and 25% compared with that of the WN and MNUd groups, respectively. However, there were no significant differences between the WN and MNUd groups. Differences in circulating blood parameters between the MN and MNUd groups can be attributed to the plant extract because there were 7 days from the first administration of *U. dioica* L. to the sacrifice of

the animals, a period that matches the term of 5–7 days average for the production of blood cells. That is, treatment with the plant extract in the MNUd group promoted the recovery of hematopoiesis, while in the untreated MN group, this recovery was not observed even with adequate time [37]. The total nucleated bone marrow cells were lower in the MNUd group than in the MN group, probably because the plant promotes the rapid release of cells from the bone marrow to the blood.

In Mexican traditional medicine, *U. dioica* L. is used to treat anemia due to its high iron content, which may contribute to the increase in erythrocytes and specifically to the mean corpuscular hemoglobin concentration. A comparable finding was observed when a decoction of *U. dioica* L. var. *angustifolia* prevented malformations in the fetuses of anemic mice, although the mother remained anemic [29]. Nettle plants are known to be very good sources of energy, proteins, fiber, and a range of bioactive compounds that have health benefits [38]. In Nepal, *U. dioica* L. is both a staple food and supplementary food, which is often the top cash crop of local communities, contributing to food security in the Nepal region. In the case of Mexico, although it is a developing country rich in flora and fauna, severe PEM has a high incidence in suburban and rural areas [39]. The effects of *U. dioica* L. on rats with immunodeficiency due to severe malnutrition observed in this work can be attributed to the plant acting as a phytomedicine reinforced by its role as a nutraceutical.

The immunostimulatory role of *U. dioica* L. has been previously reported and identified as a property of the root. In our work, the activity was detected in the leaf. Notably, although it is already known that *U. dioica* L. stimulates the proliferation of T lymphocytes in healthy individuals, our results reinforce this knowledge but in a pathological condition, malnutrition, which is frequent in developing countries, where malnutrition is observed in a high percentage of the child population.

Conclusions

The aqueous extract of the leaves of *U. dioica* L. stimulates the immune response because it promotes the differentiation of T lymphocytes toward CD4⁺ and CD8⁺ cells, in addition to countering anemia and leucopenia associated with severe malnutrition. The effect of the nettle plant extract on lymphocyte activation and its production of cytokines is still being investigated.

Sara Beatriz Herrera, Leonor Rodríguez, María del Carmen García, José Luis Flores, Rodolfo Velasco

Considering the pharmacological functions of *Urtica dioica* L. and its role as an anti-inflammatory, analgesic, antiandrogenic, antihyperglycemic, anti-hyperlipidemic, antiviral, anticancer, and antianemic plant and that the treatment of diseases with patented medicines is becoming increasingly expensive, we note that it is important to highlight the action of *U. dioica* L. to counteract severe malnutrition, especially when a high percentage of the world's population lives in poverty and extreme poverty.

This plant could be used as a nutritional supplement or a nutraceutical even in those populations without sufficient resources, as their diet lacks the nutrients provided by *U. dioica* L.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors wish to thank Rafaela Tapia for her technical assistance in the handling of animals and cell cultures.

References

- [1] UNICEF. La desnutrición infantil. Causas, consecuencias y estrategias para su prevención y tratamiento. Wendy Wisbaum. UNICEF, España, 2011.
- [2] Black R, Victora C, Walker S, Bhutta Z, Christian P, De Onis M, et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet* 2013; 382:427–51.
- [3] Bourke C, Berkley J, Prendergast A. Immune dysfunction as a cause and consequence of malnutrition. *Trends Immunol* 2016; 37(6):386–98.
- [4] Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56 Suppl 3:S73–6.
- [5] Borchers AT, Hackman RM, Keen CL, Stern JS, Gershwin ME. Complementary medicine: a review of immunomodulatory effects of Chinese herbal medicines. *Am J Clin Nutr* 1997; 66:1303–12.
- [6] Savino W. The thymus gland is a target in malnutrition. *Eur J Clin Nutr* 200; 56 Suppl 3:S46–9.
- [7] Schaible U, Kaufmann S. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med* 2007; 4(5):e115.
- [8] Tan B, Vanitha J. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional chinese medicinal herbs: a review. *Current Med Chem* 2004; 11:1423–30.
- [9] Chin Y, Balunas M, Chai H, Kinghorn A. Drug discovery from natural sources. *AAPS J* 20068; (2):239–53.
- [10] Bafna AR, Mishra SH. Immunomodulatory activity of methanol extract of roots of *Cissampelos pareira* Linn. *Ars Pharm* 2005; 46:25362.
- [11] Kavalali GM. An introduction to *Urtica* (botanical aspects). In: Kavalali (ed.). *Urtica*. Therapeutic and nutritional aspects of Stinging Nettle. Medicinal and aromatic plants—Industrial Profiles. Taylor and Francis Co., London, UK, pp 1–11, 2003.
- [12] Rafajlovska V, Kavrakovski Z, Simonovska J, Srbinska M. Determination of protein and mineral contents in Stinging Nettle. *QOL* 2013; 4(1–2):26–30.
- [13] Espinosa FJ, Sarukhán J. Manual de malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica, México, 1997.
- [14] Villaseñor RJ, Espinosa G. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario, Fondo de Cultura Económica, México, 1998.
- [15] Akgül G, Yılmaz N, Celep A, Celep F, Çakılcıoğlu U. Ethnobotanical purposes of plants sold by herbalists and folk bazaars in the center of Cappadocia (Nevşehir, Turkey). *Indian J Tradit Knowle* 2016; 15(1):103–8.
- [16] Polat R, Çakılcıoğlu U, Ulsan MS, Paksoy MY. Survey of wild food plants for human consumption in Elazığ (Turkey). *Indian J Tradit Knowle* 2015; 1(1):69–75.
- [17] Mükemre M, Behçet L, Çakılcıoğlu U. Survey of wild food plants for human consumption in villages of Çatak (Van-Turkey). *Indian J Tradit Knowle* 2016; 15(2):181–91.
- [18] Mamta S, Preeti k. *Urtica dioica* (Stinging nettle): a review of its chemical, pharmacological, toxicological and ethnomedical properties. *Int J Pharm* 2014; (4):270–7.
- [19] Nahata A, Dixit VK. Ameliorative effects of Stinging Nettle (*Urtica dioica*) on testosterone induced prostatic hyperplasia in rats. *Andrologia* 2011; 44 Suppl 1:396–409.
- [20] Basaran AA, Ceritoglu I, Undeger U, Basaran N. Immunododulatory activities of some Turkish medicinal plants. *Phytother Res* 1997; 11:609–11.
- [21] Akbay P, Basaran AA, Undeger U, Basaran N. *In vitro* immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. *Phytother Res* 2003; 17:34–7.
- [22] Harput US, Saracoglu I, Ogihara Y. Stimulation of lymphocyte proliferation and inhibition of nitric oxide production by aqueous *Urtica dioica* extract. *Phytother Res* 2005; 19(4):346–8.
- [23] Tapia AR, Ramírez CA, González GA, Contreras A, Velasco LR. Hematopoyetic activity of *Urtica dioica in vitro*. Memories of the 54 Annual meeting of the Western Pharmacology Society, Mexico City, Mexico, p 162, 2011.

Urtica dioica L. on immunity of malnourished rats

- [24] Güil GJL, Reboloso FM, Isasa ME. Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *J Food Comp Anal* 2003; 16(2):111–9.
- [25] Degirmenci NS, Akal ZU, Alpsoy L. Cytotoxic and apoptotic effects of caffeic acid and caffeoyl malic acid on brain glioblastoma (U87-MG). *Bull Pharm Res* 2016; 6(1):7–13.
- [26] García J, De la Rosa L, Herrera B, González A, López J, González G, et al. Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en ciudad Juárez, México. *Tecnociencia Chihuahua* 2011; 5(2):67–75.
- [27] Ortiz R, Cortés E, Pérez L, González C, Betancourt M. Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation. *Med Sci Res* 1996; 24:843–6.
- [28] Velasco LR, Fregoso PM, Flores SJL, Carrillo SJ, Herrera SSB, Vega AE, et al. Ability of *Urtica chamaedrydes* pursh to restore hematopoiesis in anemic pregnant mice. *J Intercult Ethnopharmacol* 2013; 2(1):37–42.
- [29] Herrera SS, Flores SJ, Rodríguez CL, Aguilar C, Velasco LR. Administración de *Urtica dioica* var. *Angustifolia* Wedd como preventivo de malformaciones en fetos de ratones anémicas preñadas. *Avances de las Mujeres en las Ciencias las Humanidades y todas las Disciplinas. Libro Científico Vol. II de Ciencias Biológicas y de la Salud y Ciencias Sociales y Humanidades*, Mexico City, Mexico, 2015.
- [30] Ortiz R, Cortés L, Gómez J, González C, Cortés E. Análisis con citometría de flujo de los diferentes tipos de timocitos en ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ. Biodiversidad* 2000; 1(2):77–84.
- [31] de la Rosa G. Análisis del número de células y peso de diferentes órganos de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. Tesis de pregrado, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, 2002.
- [32] Schaible U, Kaufmann S. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med* 2007; 4(5):e115.
- [33] Rytter M, Kolte L, Briend A, Friis H, Christensen V. The immune system in children with malnutrition—a systematic review. *PLoS One* 2014; 9(8). e105017; doi:10.1371/journal.pone.0105017
- [34] Le Moal MA, Colle JH, Galelli A, Truffa-Bachi P. Mouse T-lymphocyte activation by *Urtica dioica* agglutinin. II.—Original pattern of cell activation and cytokine production induced by UDA. *Res Immunol* 1992; 143(7):701–9.
- [35] Rovira P, Buckle M, Abastado JP, Peumans WJ, Truffa-Bachi P. Major histocompatibility class I molecules present *Urtica dioica* agglutinin, a superantigen of vegetal origin, to T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1999; 29(5):1571–80.
- [36] Ganeshpurkar A, Saluja AK. The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharm J* 2017; 25(2):149–64.
- [37] Greer JP, Foerster J, Rodgers G, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, et al. *Wintrobe's clinical hematology*. 12th edition, Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 2009.
- [38] Adhikari BM, Bajracharya A, Shrestha AK. Comparison of nutritional properties of Stinging nettle (*Urtica dioica*) flour with wheat and barley flours. *Food Sci Nutr* 2015; 4:119–24.[39]. Monárrez J, Martínez H. Prevalence of malnutrition in Tarahumara children under 5 years of age in the municipality of Guachochi, Chihuahua. *Salud Pública Mex* 2000; 42:8–16.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00107
Matrícula: 2143500277

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
INMUNOMODULADORA DE *Urtica*
dioica L. EN RATAS
DESNUTRIDAS.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 19 del mes de diciembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ
DR. JOSE LUIS EDUARDO FLORES SAENZ
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DRA. MARIA DEL CARMEN GARCIA RODRIGUEZ



SARA BEATRIZ HERRERA SOLIS
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: SARA BEATRIZ HERRERA SOLIS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES HEREDIA
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ

VOCAL

DR. JOSE LUIS EDUARDO FLORES SAENZ

VOCAL

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

VOCAL

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

SECRETARIA

DRA. MARIA DEL CARMEN GARCIA
RODRIGUEZ