

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Casa abierta al tiempo

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS DE
RATAS DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A
EDITH CORTÉS BARBERENA

Codirectores
Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz
Dr. José Luis Gómez Olivares

Asesor
Dr. Mario Altamirano Lozano

México, D.F. Diciembre de 2009

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyt y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las
Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

EDITH CORTÉS BARBERENA

El día 14 de diciembre del año 2009

Sinodales

Co-Directora: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz _____

Co-Director: Dr. José Luis Gómez Olivares _____

Asesor: Dr. Mario Altamirano Lozano _____

Sinodal: Dra. Patricia Pérez Vera _____

Sinodal: Dr. Humberto González Márquez _____

COMITÉ TUTORIAL

CODIRECTORES DE TESIS

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Profesor Titular C

Depto. de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

Dr. José Luis Gómez Olivares

Profesor Titular C

Depto. de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

ASESOR

Dr. Mario Altamirano Lozano

Profesor de Carrera, Titular C

Jefe de la Unidad de Investigación y Toxicología Ambiental
FES-Zaragoza, UNAM

SINODALES

Dr. Humberto González Márquez

Profesor Titular C

Depto. de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

Dra. Patricia Pérez Vera

Investigador en Ciencias Médicas D
Depto. de Investigación en Genética Humana
Instituto Nacional de Pediatría

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

El presente trabajo recibió el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, Investigación Científica Básica, con clave **50804** y del Apoyo Complementario a Investigadores en Proceso de Consolidación con número de convenio **118848**.

DEDICATORIAS

A mi madre, Doña Catita, por enseñarme que además del amor a la familia, es también importante soñar para alcanzar nuestras metas y que siempre es posible aprender.

A mi padre, Domingo, por enseñarme que la responsabilidad en el trabajo es fundamental para la formación de un ser humano.

A Dany, por ser el hermano con una fortaleza ejemplar, demostrando que no importa la condición física, se puede ser optimista.

A Sofí, Susí y Alma, por ser las hermanas en quienes he podido apoyarme y compartir alegrías y tristezas.

A mi sobrino Esaú, un niño inteligente y alegre con la vida por delante.

A todos mis amigos, que son el complemento de mi familia.

Al Profe José Luis, quien me ayudó a encontrar mi vocación, aunque ya no esté.

A los alumnos que han hecho alguna parada por el laboratorio y por los que aún están.

A todos los alumnos con los que he aprendido junto con ellos en el salón.

A Hilda, su familia, amigos, compañeros y maestros, porque enfrentaron la adversidad de la enfermedad con valor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rocío Ortiz por la dirección de esta tesis y apoyarme en mi desarrollo profesional y debo decir, también el personal.

Al Dr. José Luis Gómez por aceptar la co-dirección de esta tesis y por su valioso apoyo.

Al Dr. Mario Altamirano por su valiosa asesoría en la realización de este trabajo.

Al Dr. Humberto González y la Dra. Patricia Pérez Vera por la revisión de la tesis y por sus valiosos comentarios en la tesis.

A la Dra. Reyna Fierro por su apoyo como Coordinadora del Doctorado en Ciencias Biológicas.

A Leonor Rodríguez, Elsa Cervantes, Rosa Neri, Ivonne Ceballos y Guadalupe Sandoval por su valioso apoyo técnico.

A los compañeros del laboratorio que de un modo u otro me han apoyado: Leo, Oralia, Irma, Yvonne, Lety, Cristina, Zayil, Mundo, Eduardo y Dr. Betancourt.

A los alumnos que han pasado parte sus vidas en el laboratorio: Donají, Elvira, Jaqueline y Alberto.

A mi familia que me ha apoyado incondicionalmente en todo momento, este logro también es de ustedes.

A mis amigos de siempre, quienes han compartido mis alegrías y penas, como parte de mi familia.

EN MEMORIA

Doña Catita, mi madre.

José Luis Sánchez Acenjo

Hilda Medina Ruiz

ÍNDICE

Índice.....	1
Índice de figuras.....	6
Índice de cuadros y gráficas.....	7
Resumen.....	9
Abstract.....	12
I. Antecedentes.....	15
I.1. La alimentación: un Derecho Humano.....	15
I.2. La Desnutrición: la pobreza en la abundancia.....	16
I.3. Estructura y Propiedades del Sistema inmunológico.....	23
I.3.1 Activación de los linfocitos.....	25
I.3.2 Receptor de Interleucina 2 (IL-2R).....	29
I.3.3 Receptor de Transferrina (CD71).....	32
I.3.4 Tejidos Hematopoyéticos.....	34
I.3.5 Bazo.....	36

I.4.	Ciclo Celular.....	38
I.5.	El Ciclo Celular y el Sistema Inmunológico.....	44
I.6.	Relación de la Desnutrición con el Sistema Inmunológico.....	45
I.7.	Leptina, relación con el sistema inmunológico.....	50
I.8.	Modelos Experimentales en la Investigación de la Desnutrición.....	52
I.9.	Citometría de Flujo.....	54
I.9.1	Bases de la Citometría de Flujo.....	55
I.9.2	Inmunofenotipo y Activación de Linfocitos.....	58
I.9.3	Proliferación Celular	59
II.	Justificación.....	61
III.	Objetivo General.....	62
IV.	Objetivos Particulares.....	62
V.	Hipótesis	63
VI.	Material y Métodos	64
VI.1.	Desnutrición por competencia de alimento	64

VI.2.	Subpoblaciones de linfocitos.....	67
VI.2.1	Extracción de sangre	67
VI.2.2	Identificación de subpoblaciones de linfocitos en sangre.....	67
VI.2.3	Extracción de bazo	71
VI.2.4	Identificación de linfocitos en bazo	71
VI.3.	Activación de los linfocitos de bazo in vitro	72
VI.3.1	Cultivos de linfocitos de bazo.....	72
VI.3.2	Marcaje de células en cultivo por anticuerpos monoclonales	72
VI.4.	Detección de Proliferación in vivo	74
VI.5.	Análisis de datos.....	74
VII.	Resultados.....	77
VII.1.	Evaluación de la desnutrición experimental durante la lactancia.....	77
VII.2.	Biometría de leucocitos en sangre periférica.....	81
VII.3.	Biometría de las Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica.....	83
VII.4.	Subpoblaciones de linfocitos en bazo	88

VII.5.	Activación de linfocitos de bazo en cultivo	92
VII.5.1	Análisis de la proporción de célula que expresan de CD71+.....	92
VII.5.2	Expresión de CD25+.....	94
VII.6.	Proliferación de células de bazo in vivo.....	97
VIII.	Discusión.....	103
VIII.1.	Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica.....	105
VIII.2.	Subpoblaciones de linfocitos en bazo	107
VIII.3.	Activación de linfocitos de bazo en cultivo	108
VIII.4.	Proliferación in vivo de linfocitos de bazo.....	111
VIII.5.	Visión general de los resultados.....	113
IX.	Conclusiones.....	115
X.	Perspectivas.....	116
XI.	Bibliografía.....	117
	Abreviaturas	145
	Anexo 1	147

Anexo 2 152

Artículo publicado..... 153

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Causas directas e indirectas de la desnutrición	18
Figura 2 Distribución de muertes infantiles alrededor del mundo	21
Figura 3 Esquema de la cascada de señales en la activación de linfocitos	27
Figura 4 Representación esquemática del receptor de IL-2	29
Figura 5 Inducción de la expresión de la subunidad α del receptor de IL-2	31
Figura 6 Esquema de cortes del bazo	37
Figura 7 Ciclo celular y participación de complejos de ciclinas/CDKs	43
Figura 8 Tamaño relativo y complejidad de la célula por citometría de flujo	56
Figura 9 Detección de marcadores de superficie celular por citometría de flujo	57
Figura 10 Diseño Experimental	66
Figura 11 Análisis de las subpoblaciones de linfocitos	70
Figura 12 Gráficas de punto utilizadas para identificar linfocitos activados	73
Figura 13 Gráficas para el análisis del contenido de ADN e incorporación de BrdU	76
Figura 14 Visión general de los resultados	114

Figura 15 Los fluorocromos más comunes en citometría de flujo.....	152
--	-----

ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICAS

Cuadro 1 Parámetros generales determinados en ratas.....	82
Cuadro 2 Número de leucocitos, linfocitos, monocitos y granulocitos.....	83
Cuadro 3 Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica	84
Cuadro 4 Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos T.....	86
Cuadro 5 Número de linfocitos en sangre periférica	87
Cuadro 6 Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos obtenidos de bazo.....	89
Cuadro 7 Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos T (CD3+) en bazo	90
Cuadro 8 Número de las subpoblaciones de linfocitos de bazo	91
Gráfica 1 Curva de crecimiento de ratas bien nutridas y desnutridas	79
Gráfica 2 Distribución del porcentaje de ratas por grado de desnutrición	80
Gráfica 3 Porcentaje de linfocitos T de bazo en cultivo.....	93
Gráfica 4 Activación in vitro de linfocitos CD3+CD71+	95

Gráfica 5 Porcentajes de linfocitos activados CD3+CD25+.....	96
Gráfica 6 Distribución de células de bazo en las fases del ciclo celular.....	99
Gráfica 7 Índice de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) <u>in vivo</u>	100
Gráfica 8 Distribución en cada fase del ciclo de las células que incorporaron BrdU	101
Gráfica 9 Valores de TS y Tpot	102

RESUMEN

La desnutrición está ampliamente distribuida en el mundo y es un problema en países en desarrollo. Los estragos en los niños pueden ser devastadores. En la actualidad se reconoce que aproximadamente 10 millones de niños menores de 5 años mueren cada año en países en desarrollo, de las cuales más del 50% se puede atribuir a enfermedades prevenibles: la desnutrición contribuye a estas muertes. El objetivo general de este estudio fue evaluar la activación in vitro de linfocitos de bazo y la proliferación in vivo de células de bazo de ratas con desnutrición de segundo y tercer grado inducida experimentalmente por competencia de alimento durante la lactancia a los 21 días de edad y compararlo con ratas bien nutridas. Para esto se cuantificaron, por medio de citometría de flujo, el porcentaje de los linfocitos T, B, NK y, dentro de los T, los T4 y T8 en ratas desnutridas de segundo y tercer grado y testigos bien nutridos, obtenidos a partir de sangre periférica y los extraídos del bazo. Se determinó, por citometría de flujo, el efecto de ambos grados de desnutrición sobre la activación de linfocitos de bazo de ratas desnutridas de segundo y tercer grado y testigos sanos en cultivos primarios in vitro. Se determinó el efecto de la desnutrición sobre la proliferación in vivo de células de bazo de ratas de 21 días de edad. Se indujo la desnutrición durante la lactancia y al final de esta, se clasificaron en tres grados, según el déficit de peso: primer grado o leve (déficit mayor al 10% y menor a 25); segundo grado o moderada (déficit de 25% y menor de 40%); tercer grado o grave (déficit de 40% o más). Se estudiaron los grupos de ratas con

desnutrición moderada y grave. Los resultados mostraron que ambos grupos de ratas desnutridas tienen una cantidad menor de leucocitos, monocitos y linfocitos en sangre periférica, en comparación con las ratas testigo. Se observó que de los linfocitos T la subpoblación afectada fue la CD4+ (cooperadores) en sangre y en bazo, lo cual repercutió en la población de linfocitos T. La activación de los linfocitos de bazo en cultivo se evaluó estimulándolos con el mitógeno fitohemaglutinina (PHA). La respuesta se midió determinando el incremento en la expresión de los marcadores CD71 y CD25, que se expresan al estimular a los linfocitos T con la PHA, o con un antígeno. La proporción de linfocitos CD3+CD71+ y de CD3+CD25+ (activados) de ambos grupos de ratas desnutridas fue menor que la de ratas bien nutridas ($p < 0.05$). Además, se observó una correlación positiva entre el peso del bazo y el porcentaje de células que expresaron el receptor CD71 ($R=0.97$). No se observó diferencia significativa entre las ratas desnutridas de segundo y tercer grado. La proliferación de las células de bazo se determinó administrando bromodesoxiuridina (BrdU) y su incorporación se detectó con anticuerpos monoclonales anti-BrdU, conjugados con fluoresceína (FITC), el contenido de ADN total por yoduro de propidio y se evaluaron por citometría de flujo. La proporción de células en fase G₁ fue mayor en las ratas desnutridas que en las bien nutridas, pero no se observó diferencia entre ratas con desnutrición moderada y grave. La proporción de células en la fase S fue mayor en las ratas bien nutridas, que en las desnutridas. La proporción de células en fase la G₂/M fue menor en ambos grupos de ratas desnutridas que la del grupo de las bien nutridas. El índice de incorporación de BrdU (LI) fue menor en las células de bazo de ratas desnutridas, la duración de la

fase S (TS) no mostró diferencia significativa entre los grupos y el tiempo de duplicación de la población celular (T_{pot}) se incrementó en ambos grupos de de ratas desnutridas. Los resultados muestran que la desnutrición moderada tiene efectos tan importantes como la desnutrición grave, que involucraron la proporción de linfocitos en sangre y bazo, la activación de linfocitos y la proliferación celular en bazo. Los resultados son una evidencia por la que, en parte, se puede explicar la susceptibilidad a infecciones asociada a la desnutrición.

ABSTRACT

Malnutrition is distributed widely throughout the World and is a particular problem in developing countries. Actually, recent studies estimate that 10 million of children younger than 5 years of age die in developing countries; more than 50% of deaths in children are attributed to conditions preventable: the malnutrition contributes to these deaths. The objective of the present study was to evaluate the activation of spleen lymphocytes in vitro and proliferation of spleen cells in vivo of rats with moderate and severe malnutrition experimentally induced during lactation period compared with well-nourished rats. The percentage of T, B, NK cells and in T lymphocytes, T4 and T8 were determinate in malnourished rats of moderate and severe level and control rats, obtained of peripheral blood and spleen, assessed by flow cytometry. The effect of both levels of malnutrition on activation of splenic T cells in vitro of malnourished rats of second and third degree, assessed by flow cytometry. It was analyzed the effect of malnutrition on cell proliferation on splenic cells of suckling rats in vivo. The malnutrition was induced during the lactation period until weaning. The degree of malnutrition was established according to the classification used for children: the number was categorized as mild or first degree when the weight deficit reached 10–25%; moderate or second degree (MN2nd) when the weight deficit reached 25–40%; and severe or third degree (MN3rd) when the weight deficit was greater than 40% of that of age-matched control rats (WN). The moderate and severe malnourished rats were studied. The results showed that both malnourished groups of rats have lower

numbers of leukocytes, monocytes and lymphocytes on peripheral blood. The CD4+ lymphocytes subpopulation was affected on blood and spleen. Response to mitogen stimuli of phytohaemagglutinin (PHA) was evaluated in splenic lymphocytes. Expression of cell surface activation markers CD71+ and CD25+ was evaluated, to determinate the response of T cells. Both groups of malnourished rats showed a significant decrease in the percentage of CD3+CD71+ and CD3+CD25+ cells at 24 h post-activation with PHA. There was a positive correlation between spleen weight and the percentages of spleen cells expressing CD71 ($R = 0.97$) receptors. No significant difference was observed between the moderate and severe malnourished rats. Cell proliferation was studied by detection of BrdU incorporation and flow cytometry. The method involves calculation using flow cytometry data of BrdU incorporation (green fluorescence, FITC-labelled anti-BrdU-DNA antibody) and total DNA content (red fluorescence, propidium iodide). After 21 days of age, BrdU at the dose of 1 mg/g body weight was administered by intraperitoneal injection. Flow cytometry was used to detect BrdU labeling in proliferating splenocytes. Distribution of cells in each cycle cells was analyzed. The proportion of cells in G1 phase was higher in malnourished rats than well-nourished rats, but no significant difference was observed between the moderate and severe malnourished rats, but no significant difference was observed in both malnourished groups. No significant difference was observed in proportion of cells in S phase between well-nourished and malnourished rats. Percentage of G2/M was lower in both groups of malnourished rats. The labelling index of BrdU+ (LI), S-phase duration (TS) and potential doubling time (Tpot) were calculated. The LI of cells was lower in both groups of malnourished rats than WN rats. The obtained TS

was not different in both malnourished rats to WN rats. Tpot was significantly higher in both malnourished groups. In conclusion, the results of this study suggest that moderate malnutrition is as bad as severe malnutrition with effects in different parameters of immune system: lymphocytes proportion of blood and spleen, lymphocyte activation and cell proliferation in spleen. The data explain, in part, the increased susceptibility increased associated with malnutrition.

I. ANTECEDENTES

I.1. La alimentación: un Derecho Humano

En el año de 2007, en la ceremonia del Día Mundial de la Alimentación, el director general de la Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) declaró que la alimentación es un derecho fundamental, universal e irrenunciable. Aunque reconoció que para muchos países es un gran desafío aplicar este derecho, además, señaló que en el mundo se produce alimento suficiente para toda la población. Sin embargo, hasta ese momento, se reportaban 854 millones de personas desnutridas en el mundo (FAO, 2007a; b).

A pesar de reconocer a la alimentación como un derecho humano, se ha incrementado el número de personas desnutridas, al pasar de 854 millones a 925 millones en el periodo de 2007 a 2008, debido al alza en los precios de los alimentos, según declaró el Director General de la FAO, al informar sobre los resultados de la cumbre sobre la crisis alimentaria, que tuvo lugar en Roma en el año de 2008 (FAO, 2008a). Para diciembre de 2008, ya se estimaba un incremento a 963 millones de personas con desnutrición (FAO, 2008a).

El aumento en el precio de los alimentos se ha desencadenado principalmente por especulación, a pesar de que se ha informado aumento en la producción de cereales. Este comportamiento es el resultado de un cambio radical en el uso de los

granos básicos para la alimentación de la población, a su empleo en la generación de biocombustibles. (Hernández-Navarro, 2008).

Actualmente, el costo social derivado de la prevalencia de la desnutrición es devastador, por el impacto negativo en la cantidad de vidas humanas perdidas o afectadas, la baja en la productividad, en la salud y en la educación, lo que provoca un menor crecimiento económico. (FAO, 2008a; Van de Poel, y cols., 2008). La desnutrición se convierte así, no solo en consecuencia, sino también en causa de la pobreza.

I.2. La Desnutrición: la pobreza en la abundancia

Una buena nutrición es un factor básico, ya que una alimentación inadecuada puede alterar la salud, el crecimiento y desarrollo óptimo del organismo. Una dieta adecuada en cantidad y calidad es indispensable en todas las etapas del hombre, desde su concepción hasta su muerte (Cravioto y Arrieta, 1985). Cuando las células de un organismo no cuentan con la cantidad y calidad de nutrientes necesarios para desarrollar todas las funciones metabólicas normales, la desnutrición se desarrolla (Ortiz, 1987; Ortiz, y cols., 1996).

En general, se considera que la desnutrición se presenta como consecuencia de una ingestión baja o inapropiada de alimentos principalmente con dietas con bajo contenido proteico. Los efectos de la desnutrición pueden ser particularmente devastadores en los niños, debido a que, en los primeros años de la vida, el

crecimiento corporal es rápido y los requerimientos de nutrimentos son mayores (Cravioto y Arrieta, 1985)

La desnutrición se encuentra ampliamente distribuida por el mundo, sobre todo en los países en donde la distribución de la riqueza no se ha logrado, aunque también se presenta en países de los llamados desarrollados La desnutrición se encuentra invariablemente asociada con la pobreza, pues ésta es el principal factor de riesgo para la salud, debido a la asociación con un acceso difícil a los servicios y a la información (Pena y Bacallao, 2002). En la figura 1 se muestra un esquema en el cual se relacionan las causas directas e indirectas asociadas con la desnutrición (Muller y Krawinkel, 2005).

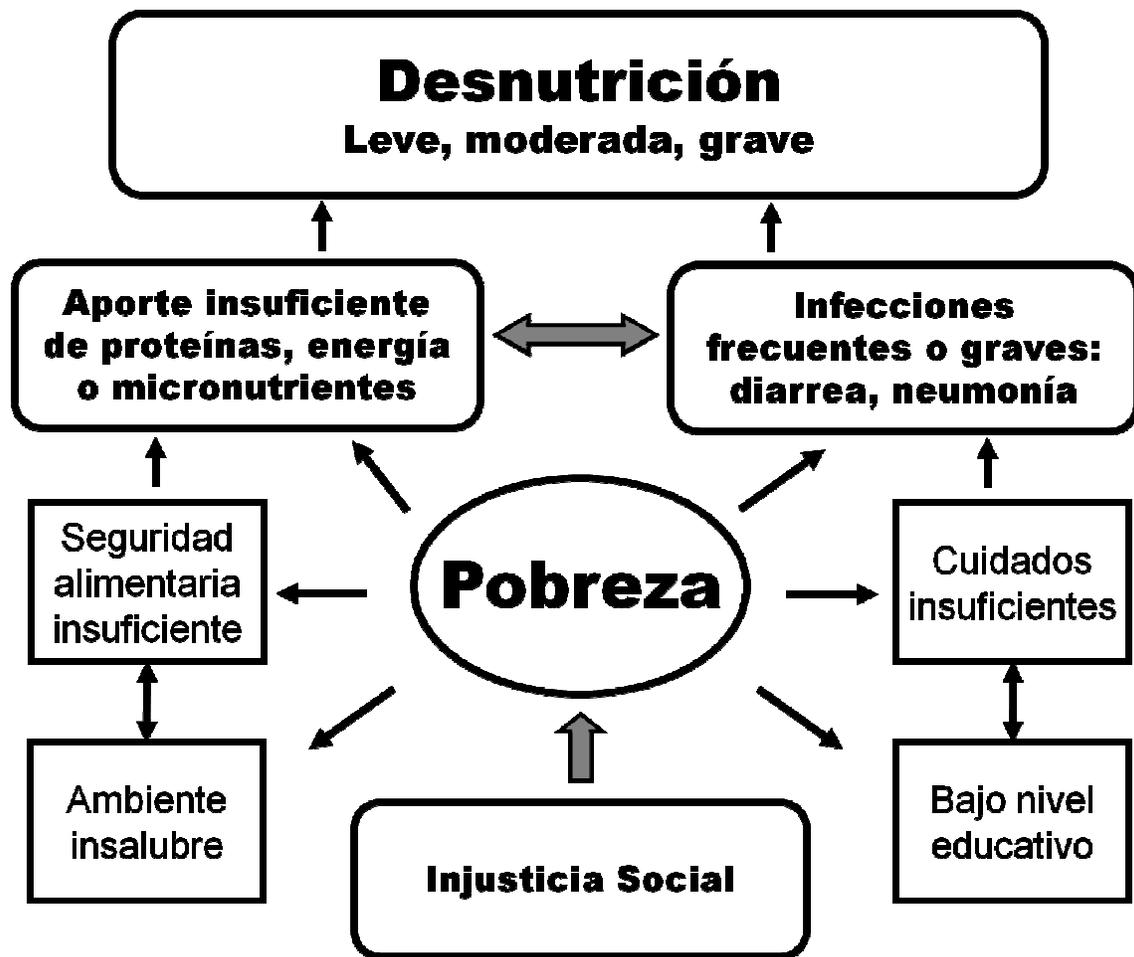


Figura 1. Causas directas e indirectas de la desnutrición (Basado en Müller y Krawinkel, 2005).

Los gobiernos de muchos países, incluyendo el nuestro, y organizaciones internacionales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), desde hace algunos años han reconocido la necesidad de hacer llegar los servicios de salud a la población marginada, aunque hasta la fecha esto ha sido una meta casi imposible de alcanzar pues, a pesar de los esfuerzos, las grandes disparidades aún existen (FAO, 2004).

En la actualidad, aproximadamente 10 millones de niños menores de 5 años mueren cada año en países en desarrollo, de los cuales casi el 50% se puede atribuir a enfermedades prevenibles (Black, y cols., 2003). Las causas que se pueden adjudicar a estas muertes están fuertemente relacionadas con la pobreza y la desigualdad, dado que se puede señalar a la falta de condiciones de higiene, destete temprano, complicaciones entre enfermedades, desnutrición y la falta de acceso a los servicios de salud como causantes de la gran mayoría de estas muertes (Figura 2) (Black, y cols., 2003). Diversos autores han señalado que la desnutrición contribuye más del 50 % de estas muertes, dado que son más susceptibles a enfermedades infecciosas (Muller y Krawinkel, 2005; Pelletier, 1994; Rice, y cols., 2000).

La FAO señaló que se ha producido un retroceso en la lucha contra el hambre, por lo que será imposible alcanzar el objetivo de reducir a la mitad el número de personas desnutridas para el año 2015 (de Onis, y cols., 2004). Las cifras hasta el año 2008, indicaban que había 963 millones de personas desnutridas en el mundo (FAO, 2007b; 2008a). La región que había mostrado progresos en la lucha contra el hambre es la de América Latina y Caribe hasta el periodo 2003 al 2005, pero las últimas estimaciones mundiales podrían reflejar un retroceso en la región (FAO, 2004; 2008b). En México, se ha observado un descenso en la prevalencia de la desnutrición grave, sin embargo, se calcula que casi 3 millones de niños menores de cinco años tienen algún grado de desnutrición. La prevalencia de la desnutrición se encuentra, principalmente, en el sur y sureste de la República Mexicana, en los

estados: Guerrero, Chiapas, Yucatán y Oaxaca, después, en la zona centro y en las costas, mientras que en el norte del país el problema es menor (ESNA, 2003; Rivera-Dommarco, y cols., 2001).

Bajo estas circunstancias, es importante señalar que la desnutrición todavía es un problema de salud pública, puesto que quien la sufre en algún momento de su vida, incrementa su susceptibilidad a enfermedades tratables y a morir a consecuencia de ellas, además vivirá siempre con sus consecuencias (Kaler, 2008). Las infecciones gastrointestinales y respiratorias de origen bacteriano son las enfermedades más comunes en los niños desnutridos, las cuales forman una larga cadena de factores causales, incluyendo pobreza y salud ambiental (Schmidt, y cols., 2009).

Cravioto señaló que la desnutrición es una condición causada por el hombre, al permitir el mantenimiento de un sistema social inadecuado que impide que parte de la sociedad tenga acceso a una alimentación adecuada y a los servicios necesarios para tener una vida digna (Cravioto y Arrieta, 1985).

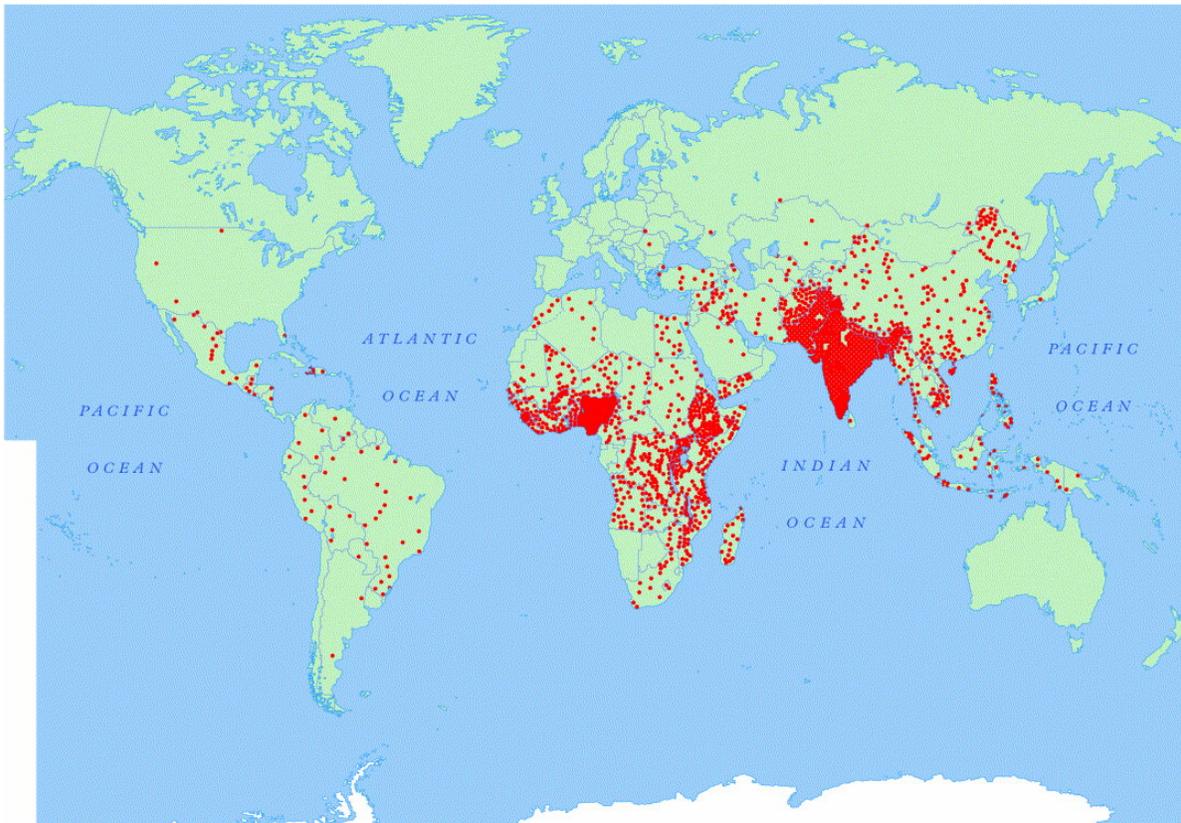


Figura 2. Distribución de muertes infantiles alrededor del mundo. Cada punto rojo representa 5000 muertes..

La desnutrición, con base en los factores que la causan, se clasifica en: primaria o secundaria. La desnutrición primaria se produce cuando el aporte de nutrientes es insuficiente para llenar los requerimientos del individuo, lo que se relaciona con una deficiente ingestión en cantidad, calidad o ambas. La secundaria se presenta cuando la fisiología normal se altera e impide la adecuada absorción de los nutrientes como en: dificultad para la ingestión, absorción inadecuada, utilización inadecuada, excreción exagerada, aumento del catabolismo (Ortiz, 1987).

En 1946, el Doctor Federico Gómez hizo una descripción amplia de la desnutrición, evitando confusiones entre sus diferentes denominaciones. Además, hizo una clasificación de la gravedad basado en un parámetro muy sencillo, el peso corporal para la edad. Actualmente existen otras medidas antropométricas que son útiles para la identificación y la clasificación, sin embargo, el fundamento es el mismo. La clasificación propuesta por Gómez (1946) es la siguiente:

1. Desnutrición de primer grado o leve: Se tiene un déficit de peso corporal del 10% al 24%.
2. Desnutrición de segundo grado o moderada: Se tiene un déficit del 25% al 39%.
3. Desnutrición de tercer grado o grave: se tiene un déficit mayor al 40%.

Esta clasificación ha sido útil para relacionar a la desnutrición como un factor de riesgo de mortalidad, demostrando ser un indicador bastante fiable. El peso como medición antropométrica, así como las derivadas de ésta, tiene la ventaja de ser una medida corporal muy sensible, no invasiva y fácil de realizar (de Onis, 2000). En las clasificaciones posteriores a la de Gómez se han tomado en cuenta el peso para la estatura como un indicador y diversos autores consideran este parámetro como adecuado para detectar a los niños gravemente desnutridos y que están expuestos a un mayor riesgo de mortalidad (de Onis, 2000).

I.3. Estructura y Propiedades del Sistema inmunológico

El sistema inmunológico está formado por células y moléculas altamente especializadas que trabajan en conjunto para la defensa del organismo ante agentes externos que se introducen, tales como microorganismos o moléculas (proteínas y polisacáridos) (Azuma, 2006).

La protección que proporciona el sistema inmunológico se manifiesta de manera específica o no específica, y en cada una está involucrada una amplia gama de mecanismos. La inmunidad inespecífica (natural o nativa) se presenta cuando no se requiere de un reconocimiento previo hacia el antígeno (cuerpo extraño) y constituye la primera línea de defensa del organismo. Está compuesta por barreras físicas y químicas (epitelio y sustancias antimicrobianas), y células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales o NK por Natural Killers) (Abbas, y cols., 1999). Las células que componen este sistema son capaces de censar la presencia de patógenos a través de un grupo de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Un tipo de PRRs, de la familia del receptor parecido a Toll (TLR), puede detectar un amplio grupo de determinantes estructurales que solo se expresan en las bacterias, virus y hongos. Sin embargo, puede reconocer aparentemente componentes liberados por células dañadas o que están muriendo (Marshak-Rothstein y Ohashi, 2007). El otro tipo de inmunidad se denomina específica o adaptativa, y ocurre cuando se realiza un reconocimiento previo del antígeno y se inicia una serie de mecanismos para eliminarlo (Medzhitov y Janeway, 1997). Actualmente se sabe que la inmunidad inespecífica y la específica se interrelacionan

estrechamente para proteger al huésped cuando se presenta un patógeno (Medzhitov y Janeway, 1998).

La inmunidad específica puede involucrar dos tipos de mecanismos de respuesta distintos: inmunidad humoral o mediada por anticuerpos, los cuales están presentes en la sangre y son producto de los linfocitos B; y la inmunidad mediada por células en la que participan los linfocitos T y es apoyada por células accesorias (Abbas, y cols., 1999; Hoebe, y cols., 2004).

La interacción de los receptores de los linfocitos T y B y el antígeno es muy importante para el desarrollo de la inmunidad adaptativa (Szamel y Resch, 1995). Los linfocitos B tienen la capacidad de sintetizar anticuerpos, llamados también inmunoglobulinas, que se fijan específicamente a un ligando (antígeno), que corresponde a uno de muchos determinantes químicos de un gran número de proteínas, carbohidratos, lípidos u otras moléculas (Parslow, y cols., 2002).

Por otro lado, se pueden identificar dos subpoblaciones principales de linfocitos T: los T cooperadores (T CD4+) y los T citotóxicos (T CD8+). Cada una de estas subpoblaciones tiene diferencias importantes en su función. Los 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 cols., 2002). En cambio, los T CD4+ promueven la proliferación, maduración y función inmunitaria de otros tipos celulares, a través de citocinas que tienen propiedades hormonales (Parslow, y cols., 2002) Los T CD4+ se

subdividen a su vez en subclases, que se distinguen con base en su función y las citocinas que producen (Parslow, y cols., 2002; Rodríguez, 2005). Las subclase más conocidas 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 cols., 1986). Durante los últimos años se han añadido a la lista más fenotipos efectores diferenciados estables (Mosmann, y cols., 2009; Reiner, 2007).

I.3.1 Activación de los linfocitos

Un evento importante en la generación de la respuesta inmunológica contra la mayoría de los antígenos es la activación de los linfocitos T vía células procesadoras de antígeno (CPA). Las CPA presentan el antígeno unido al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) al receptor de los linfocitos T (TCR). Esto desencadena una serie de eventos bioquímicos en cascada, que culminan con la activación, crecimiento, proliferación clonal y diferenciación de los linfocitos T; lo que permite a los linfocitos activados eliminar a la molécula extraña que indujo estos procesos (Itano y Jenkins, 2003; Jenkins, y cols., 2001; von Andrian y Sallusto, 2007). Varios de los procesos celulares que se desencadenan, incluyen la adhesión mediada por integrinas, formación de la sinapsis inmunológica, establecimiento de la polaridad celular para la liberación de citocinas o gránulos líticos y señalización, los que requieren modificaciones en citoesqueleto del linfocito (Billadeau, y cols., 2007).

La transducción de señales que regula la proliferación, diferenciación y las funciones efectoras durante la activación de los linfocitos es un proceso complejo. En la Figura

3 se muestra un esquema general de la cascada de señales desencadenadas por la unión del antígeno unido al MHC de la célula presentadora con el TCR del linfocito CD4+. Como consecuencia de esta unión, 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 (IP $_3$), esto inicia dos vías de señalización (Billadeau, y cols., 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 IP $_3$ activa a su receptor en el retículo endoplásmico, que favorece la liberación de Ca $^{2+}$ al citoplasma (Winslow, y cols., 2003). La señal de calcio activa a la calcineurina fosfato dependiente de Ca $^{2+}$ /calmodulina. La calcineurina desfosforila al factor de transcripción NF-AT lo que permite que se acumule en núcleo y se una a elementos promotores del gen de la interleucina 2 (IL-2) (Cahalan y Chandy, 1997; Panyi, y cols., 2004), Esto último incrementa la secreción de esta hormona linfotrófica, la cual está implicada en la generación de fenotipos efectores de las células T estimuladas por el antígeno. Además, la expresión de la subunidad α del receptor de IL-2 (IL-2R) es fundamental dado que es el responsable de que el linfocito T pueda responder a la señal de la IL-2 para proliferar, para protegerse de la apoptosis y para expresar proteínas asociadas con el fenotipo de linfocitos T activados (Ellery y Nicholls, 2002a).

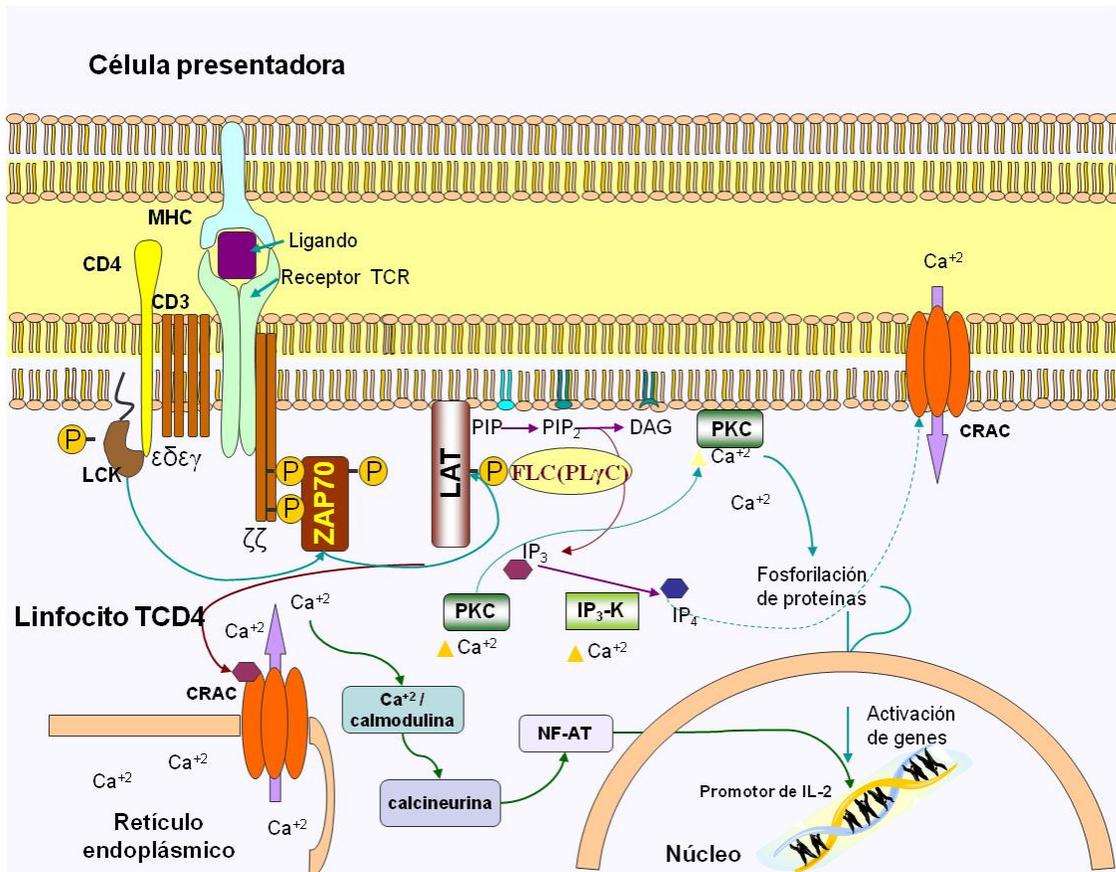


Figura 3. Esquema general de la cascada de señales desencadenadas por la unión del receptor T con el antígeno unido al MHC de la célula presentadora. Figura basada en (Billadeau, y cols., 2007 y Winslow, 2003 #3212). LCK: Proteína de tirosina cinasa específica de linfocitos T; ZAP70: proteína asociada a la cadena ζ de 70kDa (ζ -chain-associated protein of 70 kDa (ZAP70)); LAT: linker o enlace para activación de linfocitos; FLC (PL γ C): Fosfolipasa C; PKC: proteína cinasa C, CRAC: canal de liberación de calcio-activado por calcio; NF-AT: factor nuclear de linfocito T activado; IP3-K: cinasa de trifosfato de inositol.

I.3.1.1 Uso de mitógenos para ensayos de activación de linfocitos in vitro

Los ensayos in vitro de la activación de linfocitos mediada por lectinas vegetales mitogénicas o por antígenos son las herramientas más antiguas y ampliamente aplicadas para estimular linfocitos a dividirse (Ashraf y Khan, 2003; Sharon y Lis, 2004). Desde el siglo 19 se sabía que ciertas proteínas tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos, y que esto está dado por su capacidad de reconocer y unirse a carbohidratos (Sharon y Lis, 2004).

El descubrimiento de que algunas lectinas son mitógenos potentes abrió paso a una amplia gama de estudios. Entre ellos destaca el estudio de anomalías cromosómicas y su relación con enfermedades hereditarias, en donde se activan los linfocitos y se obtienen sus figuras mitóticas lo que permitió encontrar marcadores y ha permitido diagnósticos y pronósticos precisos de enfermedades genéticas que involucran anomalías cromosómicas. Por otro lado, los estudios de la interacción de lectinas y linfocitos ha contribuido a la comprensión de los mecanismos de la activación de los linfocitos y su control (Ashraf y Khan, 2003).

En 1989, Chilson y Kelly Chilson (Chilson y Kelly-Chilson, 1989) estudiaron la especificidad de lectinas mitogénicas y no mitogénicas sobre los receptores de superficie de linfocitos humanos. Sus hallazgos demostraron que las lectinas mitogénicas interactúan con moléculas con puentes disulfuro, incluyendo a los receptores de linfocitos T α/β y γ , lo que induce activación similar a la inducida por el antígeno (Chilson, y cols., 1984; Chilson y Kelly-Chilson, 1989; Kilpatrick, 1999). La

diferencia principal es que los antígenos estimulan pocas clonas de linfocitos, correspondientes al específico de los epítopes en la molécula antigénica, mientras que las lectinas provocan la activación policlonal por la vía de las estructuras comunes de oligosacáridos (Kilpatrick, 1999).

I.3.2 Receptor de Interleucina 2 (IL-2R)

La idea de que la respuesta y memoria inmunológica de los linfocitos depende de hormonas peptídicas fue introducida primero cuando se encontró que el factor de crecimiento de linfocitos T, posteriormente denominado interleucina 2, se une específicamente a sitios expresados en linfocitos activados por lectinas o antígenos (Neckers y Cossman, 1983; Smith, 1989). La IL-2 y su receptor fueron de los primeros elementos que se descubrieron y caracterizaron de la amplia gama de citocinas y receptores existentes (Smith, 2006). Actualmente se realizan gran cantidad de estudios para entender a cabalidad la red de citocinas, receptores y señales que intervienen en el desarrollo, diferenciación y respuesta del sistema inmunológico.

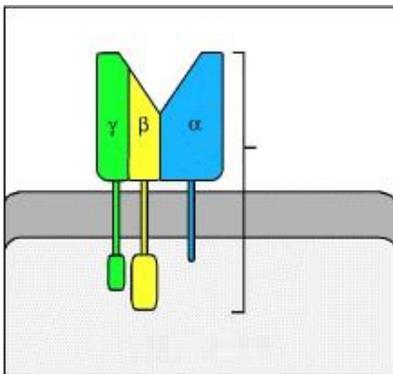


Figura 4. Representación esquemática del receptor de IL-2 de alta afinidad. Es un heterotrímero, los péptidos alfa, beta y gama; los dos últimos forman parte de la superfamilia de receptores de citocinas. tomado de Janeway y cols (2001).

El receptor de IL-2 está compuesto por tres subunidades, α o CD25, β o CD122 y γ o CD132. Las cadenas β y γ son parte de una superfamilia de receptores de citocinas. La afinidad por la IL-2 depende de las subunidades que están presentes en la membrana celular, las subunidades β y γ forman el receptor de baja afinidad y al expresarse la α , se forma el de alta afinidad (Ellery y Nicholls, 2002a; Janeway, y cols., 2001; Minami, y cols., 1993).

La expresión de IL-2 y de las subunidades α y β del receptor de IL-2 (IL-2R α e IL-2R β) se inducen, en los linfocitos T, cuando son activados a través del TCR, ya sea por un antígeno o un mitógeno. Los productores principales de IL-2 son los linfocitos T activados y en éstos también incrementa la expresión de IL-2R α e IL-2R β . Esta coincidencia en la expresión de las proteínas incrementa la posibilidad de que las células T puedan producir y responder a la IL-2 en forma autócrina y parácrina (Ellery y Nicholls, 2002a; Ma, y cols., 2006). La IL-2 dirige la proliferación de linfocitos activados y también protege a las células inmunológicas de señales de apoptosis por la activación de mecanismos anti-apoptóticos (Cantrell y Smith, 1983; Ellery y Nicholls, 2002a). La formación del receptor de alta afinidad (incluyendo a la subunidad alfa, CD25, Figura 5) determina si la célula prolifera o muere por apoptosis inducida por activación (Ellery y Nicholls, 2002b; Hedfors y Brinchmann, 2003).

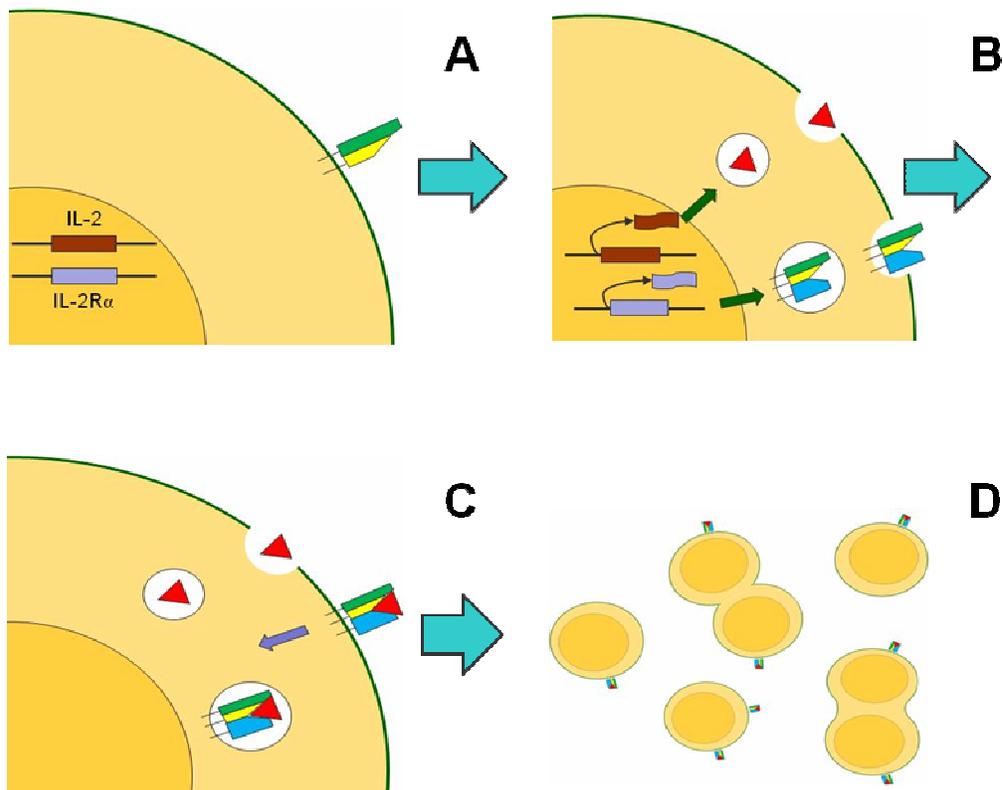


Figura 5. Representación de la inducción de la expresión de la subunidad α del receptor de IL-2, así como la IL-2. A) Receptor de IL-2 de afinidad moderada; B) Los linfocitos T activados expresan el receptor de alta afinidad de IL-2 (cadenas α , γ y β); C) La unión de IL-2 al receptor indica al linfocito la entrada al ciclo celular; D) La IL-2 induce la proliferación. Figura basada en Janeway y colaboradores (2001)

Además de las funciones antes mencionadas, el CD25, se expresa en diferentes estados del desarrollo de los linfocitos, lo que prevé nuevas implicaciones biológicas y celulares en la homeostasis del sistema inmunológico. Los timocitos (linfocitos en maduración presentes en el timo), triple negativos (CD3⁻/CD4⁻/CD8⁻) llegan a presentar el CD25 durante su desarrollo. Sin embargo, no ha quedado claro cuál es

su papel, puesto que, en ratones sin el gen de este receptor, los linfocitos no presentan alteraciones en su desarrollo (Ma, y cols., 2006). La importancia del CD25 y la respuesta a la IL-2 se encuentra en el desarrollo de los linfocitos T reguladores (CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺) (Ma, y cols., 2006). Las células T reguladoras representan entre 5 y 10 % de las células periféricas, son vírgenes, anérgicas, incapaces de proliferar y producir citocinas, a pesar ser estimuladas por medio del TCR. Sin embargo, parece que juegan un papel importante en el balance entre la autoinmunidad y la tolerancia (Asseman y von Herrath, 2002).

I.3.3 Receptor de Transferrina (CD71)

El hierro es un elemento peligrosamente útil para las células. Es esencial para la vida, pero también altamente tóxico en concentraciones elevadas. El hierro es tomado por la célula a través de endocitosis mediada por la transferrina y su receptor, el CD71 (Taketani, 2005) y entonces es utilizado para diversas funciones celulares que van desde el transporte de oxígeno y transferencia de electrones hasta la síntesis del ADN, entre otros procesos.

El CD71 permite que la célula pueda internalizar hierro para que este pueda incorporarse en las proteínas que contienen grupo hemo, en las enzimas oxidativas y en otras que lo requieran. La densidad de CD71 en la membrana celular generalmente es bajo, debido a un proceso constante de reciclaje entre la membrana citoplasmática y vesículas endosomales (Batista, y cols., 2004; Miskimins, y cols., 1986).

Sin embargo, bajo ciertas condiciones, el número de receptores puede aumentar para satisfacer las necesidades celulares. Por ejemplo, se sabe que los reticulocitos requieren una gran cantidad de CD71 para lograr sintetizar elevados niveles de hemoglobina. Las células proliferantes también incrementan el número de receptores CD71 (Miskimins, y cols., 1986). Por lo que la expresión en la superficie celular de receptor de transferrina, representa el grado de la actividad metabólica de la célula y debe aumentar su densidad en proporción a la cantidad de hierro necesario para la proliferación celular activa (Neckers y Cossman, 1983; Pighetti, y cols., 1998). Desde hace más de 20 años, se ha relacionado la expresión del CD71 con la proliferación de linfocitos estimulados por mitógeno (Taketani, y cols., 1985).

Actualmente se sugiere que el CD71 juega un papel importante en los eventos tempranos de la formación de la sinapsis inmunológica, debido a que se ha observado su incorporación parcial en las llamadas balsas lipídicas (lipid rafts). Tanto los receptores de transferrina endosomales como los de la superficie celular aparentemente se incorporan a las balsas lipídicas involucradas en la sinapsis del linfocito T y la célula presentadora de antígeno (Batista, y cols., 2004).

La expresión de la subunidad α del receptor de IL-2 así como la del receptor de transferrina CD71 se han utilizado como marcadores de la activación de linfocitos T, ya que, se expresan muy poco en células en reposo, por lo que son llamados antígenos de activación (Barten, y cols., 2001). Pueden ser detectados fácilmente por medio de ensayos de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo, usando anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (Caruso, y cols., 1997). La

combinación de anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos permite identificar subpoblaciones de linfocitos y, al mismo tiempo, el registro de marcadores que están involucrados en un proceso de activación (Barten, y cols., 2001; Caruso, y cols., 1997; Rodríguez, y cols., 2005).

I.3.4 Tejidos Hematopoyéticos

La médula ósea, el timo, el bazo y los ganglios linfáticos son los órganos hematopoyéticos más importantes para el mantenimiento y funcionamiento del sistema inmunológico, principalmente están encargados de la biogénesis de las células de la sangre.

El tejido hematopoyético se divide en: mieloide y linfoide. El mieloide produce eritrocitos, plaquetas y la mayoría de los leucocitos, corresponde a la médula ósea roja. El tejido linfoide está representado por la médula ósea blanca, el timo, los folículos linfáticos, los ganglios linfáticos y el bazo. A su vez, el tejido linfoide está dividido en primario y secundario, cada uno realiza funciones muy específicas. (Cormack, 1987; Fawcett, 1995).

Los tejidos linfoides primarios tienen como papel principal la producción y desarrollo de linfocitos vírgenes funcionales para el reconocimiento de patógenos y su eliminación (Fawcett, 1995; Janeway, 2001). Dentro de esta clasificación se encuentran la médula ósea y el timo, además del hígado fetal. En el feto y los organismos juveniles, estos tejidos son la fuente de un gran número de nuevos

linfocitos, los cuales migran para poblar los tejidos linfoides periféricos (Janeway, y cols., 2001).

La médula ósea es un tejido dinámico presenta un alto recambio y una gran variedad celular en condiciones normales (Wilkins, 1992). Las cavidades de los huesos largos contienen a la médula ósea que puede contener de un 25 a un 75% de células hematopoyéticas en diferentes estados de maduración y células del estroma, además las proteínas de la matriz extracelular y citocinas (Weiss, 1986; Wilkins, 1992). Se ha señalado que las interacciones entre la matriz extracelular y las células troncales y del estroma son específicas (Haylock y Nilsson, 2005; Nilsson, y cols., 2001).

El timo es un órgano linfoide primario, responsable de la provisión de linfocitos T en el cuerpo. Este órgano provee el ambiente óptimo en el cual se lleva a cabo el desarrollo y la diferenciación de los precursores de células T provenientes de la médula ósea y, posteriormente, los ahora timocitos, seleccionados positivamente, migran hacia los órganos linfoides periféricos (Ribatti, 2006; Ribatti, y cols., 2006).

Los tejidos linfoides secundarios son el bazo, los nódulos linfáticos y los tejidos linfoides organizados y asociados con superficies mucosas, incluyendo las amígdalas, el tejido linfoide asociado con bronquios, intestinos, placas de Peyer y otros. Estos órganos están localizados en sitios estratégicos, en donde los antígenos que entran en el cuerpo son llevados, atrapados y concentrados. Aquí, los linfocitos

están organizados en estructuras que mejoran las interacciones celulares lo que perfecciona la remoción de los patógenos (Cyster, 1999; Fu y Chaplin, 1999).

La función clave de los órganos linfoides es la de proveer microambientes adecuados para hacer eficiente la interacción secuencial de las diferentes subpoblaciones de linfocitos y células no linfoides para lograr la respuesta inmunológica adaptativa (Janeway, y cols., 2001; Pabst, y cols., 2004).

I.3.5 Bazo

Es un órgano abdominal situado en el hipocondrio izquierdo, por debajo del diafragma; casi todo está revestido por el peritoneo visceral. Está unido al estómago, al diafragma y al riñón izquierdo por medio de pliegues peritoneales llamados ligamentos gastroesplénico, frenicoesplénico y esplenorrenal (Fawcett, 1995). Es el órgano linfoide secundario más grande en los mamíferos y está constituido por dos componentes, la pulpa roja y la pulpa blanca, las cuales deben su color a que la primera contiene gran cantidad de eritrocitos y la segunda, folículos linfoides que almacenan gran cantidad de linfocitos, aproximadamente el 25% de los linfocitos maduros del cuerpo (Cormack, 1987; Fu y Chaplin, 1999).

En el bazo existe una regionalización funcional. La pulpa roja depura la sangre de los eritrocitos dañados o viejos; en la blanca se presenta la activación y maduración de linfocitos T y B dependiente de antígeno. La pulpa roja está estructurada en senos venosos, con una red celular constituida por células reticulares estrelladas parecidas

a fibroblastos. Se encuentran, como células libres, macrófagos, eritrocitos y algunas células plasmáticas. La pulpa blanca se organiza en vainas linfoides periarteriales (VLPA o PALS) y éstas siguen a lo largo de los vasos en dirección periférica. En muchos puntos se encuentran centros germinales (Fu y Chaplin, 1999) (Figura 6.).

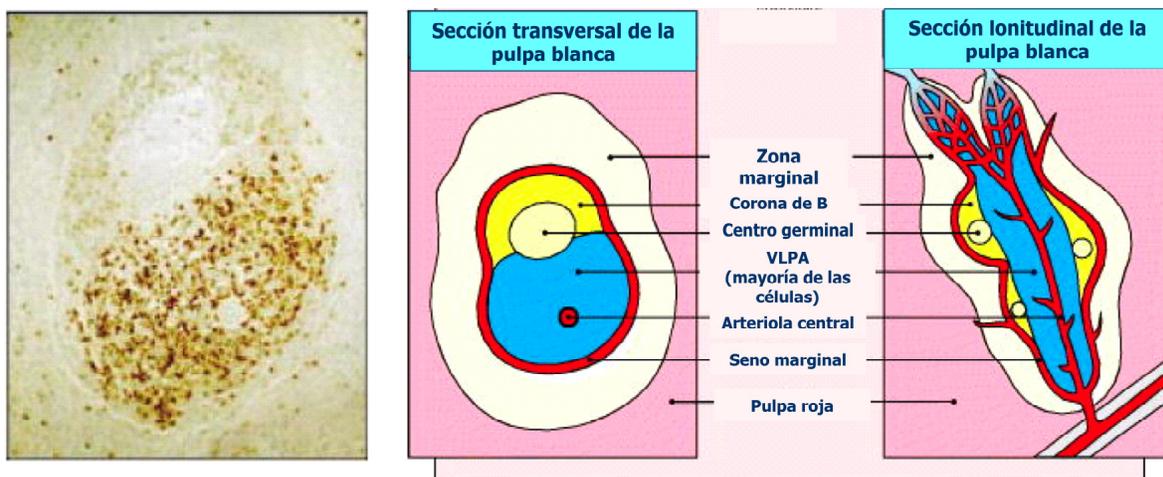


Figura 6. Sección transversal y esquema de la pulpa blanca en bazo. Se señalan cada una de las zonas en los esquemas transversal y longitudinal. Esquema tomado y modificado de Janeway y cols. (Janeway, y cols.)

Durante el periodo de gestación en el hombre, y en los roedores durante el mismo periodo y edad post-natal, el bazo tiene una activa hematopoyesis mieloide, la cual desaparece con el tiempo (Cormack, 1987; Fawcett, 1995).

Como parte de la respuesta adaptativa del sistema inmunológico, las células dendríticas que ya tengan a un antígeno procesado deben encontrarse con los linfocitos específicos del mismo antígeno. Esto se logra cuando las células dendríticas llegan a los órganos linfoides secundarios y, ahí mismo, migran a las zonas ricas en linfocitos T. La organización de los linfocitos T y B alrededor de arteriolas permiten la entrada y salida de las células dendríticas y linfocitos al bazo (Figura 6), así como del microambiente necesario para que el reconocimiento del antígeno por los linfocitos sea rápido (Fu y Chaplin, 1999). Aunque se sabe bien cómo las células dendríticas dejan el torrente sanguíneo para entrar al bazo, poco se conoce de las señales necesarias para dirigir las a la zona T. Se ha observado que algunas quimiocinas son importantes para la migración (Cyster, 2000).

I.4. Ciclo Celular

La reproducción celular es una de las características funcionales principales de las células. El crecimiento y desarrollo adecuados de los organismos vivos depende del apropiado crecimiento y multiplicación de sus células. El ciclo celular o ciclo de vida de la célula, es un conjunto extraordinariamente ordenado de eventos, que incluyen el crecimiento de la célula y la duplicación de su material genético y que culmina con su división en dos células hijas. También se describe como el periodo comprendido entre la formación de la célula por división de su célula madre y el tiempo cuando ella misma se divide y da origen a dos células hijas.

En el inicio, el ciclo celular se dividió básicamente en dos periodos claramente visibles bajo el microscopio: 1) la división, proceso en el que la célula madre reparte su citoplasma (citocinesis) y su material genético (cariocinesis) para generar dos células y 2) la interfase, en el cual la célula aparentaba inactividad, pues presenta un citoplasma y núcleo muy bien definidos y el aspecto estable característico de su estirpe celular. La mayor parte del tiempo del ciclo celular corresponde a la interfase, pero no está inactiva, durante ella cada tipo celular cumple con sus funciones específicas (secreción, transporte, etc). Además, durante la interfase la célula crece, produce energía, sintetiza nuevas moléculas, esto es, tiene una gran actividad metabólica y elabora diversas proteínas por medio de procesos regulados por su material genético. También en una etapa específica de la interfase la célula duplica su ADN; se puede decir que durante la interfase la célula se está preparando para la división. (Johnson y Walker, 1999; López-Casillas, 2002)

Las etapas que se conocen del ciclo celular actualmente, fueron establecidas cuando se emplearon análogos radiactivos del ADN. La incorporación de timidina marcada con tritio, sólo ocurre en una etapa durante el ciclo, que definió dos periodos: a) entre el final de la mitosis y el periodo de síntesis del ADN, que se le denominó “gap” 1 (G1, periodo presintético), y b) entre el final de la síntesis del ADN y el inicio de la mitosis, que se denominó G2 (periodo post-sintético) (Golias, y cols., 2004; Howard y Pelc, 1952; Pelc, 1964).

La fase G1 sigue inmediatamente a la división, aquí la célula incrementa su tamaño e inicia los preparativos para la duplicación del ADN. Durante este periodo, la célula

integra las señales mitogénicas y las inhibidoras de proliferación para tomar una decisión: proseguir hacia la división, o hacer una pausa y se queda quiescente en un estado fuera del ciclo denominado G0. Durante la fase S la célula duplica su ADN, para obtener una copia de cada uno de sus cromosomas lo que le permitirá transmitir una copia a cada una de las dos células generadas después de la mitosis. Al terminar la síntesis, la célula entra en la fase G2, en la cual se prepara para el proceso de división; además, en esta fase ocurren procesos de reparación de ADN para garantizar la integridad del material genético (Calonge y O'Connell, 2008; Johnson y Walker, 1999).

El ciclo celular afecta a todos los procesos celulares: metabolismo, síntesis de proteínas, secreciones, duplicación del ADN, biogénesis de organelos, dinámica del citoesqueleto y segregación de cromosomas (Johnson y Walker, 1999; López-Casillas, 2002; Tyers, 2004)).

La regulación del ciclo celular depende de las ciclinas y de las cinasas dependientes de ciclina (CDK, por sus siglas en inglés). Las CDKs fosforilan diferentes sustratos lo que permiten la progresión de las diferentes fases del ciclo celular. La actividad cinasa de las CDKs depende del efecto activador de las ciclinas, que aumentan en la fase en la que se requieren y disminuyen cuando ya no son necesarias (King y Cidlowski, 1998). El balance activación-inactivación de las CDKs determina si la célula pasa de la fase G1 a S, G2 y en la etapa de la división de metafase a anafase (van den Heuvel, 2005). A esto se le conoce como puntos de control o regulación (check points).

El mecanismo de la actividad de las CDKs y de las ciclinas involucra la actividad de otras proteínas efectoras, las que, a su vez, determinan la continuación o no del ciclo. Esta regulación involucra la expresión y destrucción controladas de las ciclinas, la fosforilación activadora o inhibitoria y la desfosforilación de las CDKs o de los complejos ciclina/CDK (van den Heuvel, 2005).

La transición de la fase G1 a S está regulada por los complejos de ciclina D/CDK4/6 (Knudsen y Knudsen, 2006; Sánchez y Dynlacht, 2005). Uno de los sustratos del complejo ciclina D/cdk4 más estudiados es la proteína de retinoblastoma (RB) (Sánchez y Dynlacht, 2005). En la fase G0 o G1 temprana, la proteína RB se encuentra hipofosforilada y en este estado se encuentra unida al factor de transcripción E2F, inhibiéndolo (Knudsen y Knudsen, 2006; López-Casillas, 2002). Al recibir un estímulo mitogénico, se activa el complejo ciclina/CDK que fosforila a RB en varios sitios. Esto resulta en la disociación de RB de E2F lo que le permite su entrada al núcleo para activar la transcripción de los genes necesarios para iniciar la fase de S (Knudsen y Knudsen, 2006).

Durante la fase S las ciclinas A y B se incrementan, la primera decae durante la prometáfase, la segunda lo hace durante la anafase. Se han descrito dos CDKs que se asocian a estas ciclinas, la CDK1, que se une a las ciclinas A y B, y la CDK2, que lo hace a las ciclinas A y E (Murray, 2004; Sullivan y Morgan, 2007).

El complejo ciclina A/CDK1 fosforila a proteínas requeridas para la duplicación del ADN, proteínas del citoesqueleto, a la histona H1 y a componentes del huso mitótico

(Johnson y Walker, 1999; Pugacheva, y cols., 2006; Sullivan y Morgan, 2007; Ubersax y Ferrell, 2006; Ubersax, y cols., 2003). Durante la fase G2 los niveles de ciclina B se incrementan en el citoplasma; lo que promueve que se complete la condensación de los cromosomas y el ensamblaje del huso mitótico y se ha sugerido que el complejo de ciclina B/CDK1 participa en la regulación del proceso de destrucción de la ciclina A (Johnson y Walker, 1999; Sullivan y Morgan, 2007). En la figura 7 se muestran los complejos ciclinas y CDKs que intervienen en cada fase del ciclo.

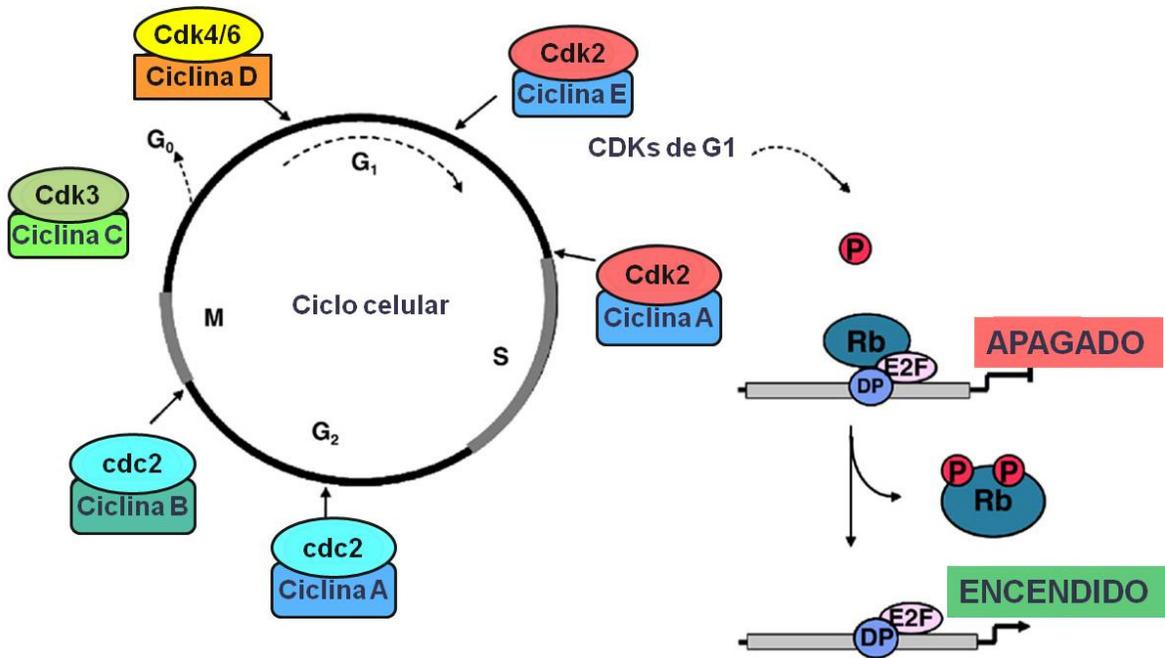


Figura 7. Esquema general de la participación de los complejos de ciclinas/CDKs en cada una de las fases del ciclo celular. La proteína del retinoblastoma (Rb) es modificada por estos complejos y como consecuencia, la forma fosforilada libera al factor E2F, permitiendo que ejerza su función como activador en la expresión de genes (Rashidian, y cols., 2007).

I.5. El Ciclo Celular y el Sistema Inmunológico.

El funcionamiento del sistema inmunológico involucra un control adecuado del ciclo celular de todas las células involucradas. Las células troncales permiten la renovación de las células progenitoras y de un grupo de células capaces de proliferar aceleradamente bajo la acción de las citocinas (Steinman, 2002). Además del recambio rutinario, el sistema hematopoyético muestra una flexibilidad marcada en momentos de estrés fisiológico, por ejemplo la expansión de poblaciones de granulocitos, macrófagos y linfocitos durante la infección (Myatt y Lam, 2007).

Por otro lado, los linfocitos maduros requieren proliferar para establecer una respuesta inmunológica rápida y generar una memoria, después de una exposición a un antígeno. Este proceso depende de una amplia gama de moléculas reguladoras positivas, como las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK, siglas en inglés), así como de reguladoras negativas, inhibidores de CDKs (Balomenos y Martinez, 2000).

El ciclo celular en células hematopoyéticas varía desde la quiescencia hasta la proliferación espectacular. Los reguladores positivos y negativos guían la progresión de las células hacia y a través de la fase G1. Se ha descrito que las ciclinas D2 y D3, pero no la D1, están presentes en las células troncales hematopoyéticas que están pasando por la fase G1 (Steinman, 2002).

Los análisis en diferentes compartimientos hematopoyéticos muestran que la ciclina D2 tiene un papel importante en la expansión clonal de linfocitos B y en el desarrollo de células B. Por otro lado, se ha observado que la ciclina D3 es inducida durante la transición de células pro-B a células pre-B. Además, la ciclina D3 tiene un papel específico en el desarrollo de células T (Myatt y Lam, 2007).

I.6. Relación de la Desnutrición con el Sistema Inmunológico

La desnutrición tiene un impacto negativo fuerte sobre las funciones inmunológicas de los niños, haciéndolos más vulnerables a enfermedades y aumenta el riesgo de muerte (de Onis, y cols., 1993; Woodward, 1998). Varios autores han sugerido que la desnutrición es la principal causa de inmunodeficiencia en el mundo (Chandra, 1999; Dai y McMurray, 1998; Suskind, 1988).

Existen estudios sobre las alteraciones del sistema inmunológico en niños desnutridos y en modelos animales de desnutrición experimental. En ellos se ha descrito una atrofia de órganos linfoides, principalmente el timo, por lo cual Prentice le ha llamado el barómetro de la desnutrición (1999). Este fenómeno es debido, principalmente, a la disminución de compartimientos linfoides (Desai, y cols., 1996; Savino, 2002). También se han observado algunas alteraciones en otros tejidos linfoides como el bazo y los ganglios linfáticos (Chandra, 1991a).

En animales experimentales se observó una reducción en el peso absoluto y relativo del bazo y el timo en los que la desnutrición fue inducida en la etapa prenatal y en la lactancia (Menendez-Patterson, y cols., 1987). En modelos de desnutrición en etapa

adulta también se observó atrofia en el timo, además de alteraciones en las diferentes subpoblaciones celulares (Barone, y cols., 1993). Ortiz y colaboradores (Ortiz, y cols.) demostraron que la apoptosis espontánea se aumenta en el timo de ratas desnutridas durante la lactancia. Posteriormente, el mismo grupo de trabajo demostró que los timocitos doble negativo (CD4-CD8-) son la población más susceptible, aunque también se observó un incremento en la apoptosis de las subpoblaciones CD4+ y CD8+ (Ortiz, y cols., 2009)

La médula ósea también se encuentra alterada durante la desnutrición. Se ha observado alargamiento del ciclo celular en ratas desnutridas durante la lactancia (Ortiz y Betancourt, 1984), así como reducción en la proporción de células proliferantes, tanto in vivo como in vitro (Betancourt, y cols., 1992; Gómez, y cols., 1996).

Por otro lado, la desnutrición en ratones provoca alteración en las características histológicas y ultraestructurales en médula ósea (Xavier, y cols., 2007). Además, se ha observado una eritropoyesis deficiente, con reducción de progenitores eritroides (Borelli, y cols., 2007).

La evaluación del estado del sistema inmunológico se ha realizado por la determinación de los cambios en las proporciones de las diferentes subpoblaciones de linfocitos (Freitag, y cols., 2000; Puri y Chandra, 1985). En estudios en niños encontraron disminución en la proporción de linfocitos T, así como deterioro funcional, con una reducción en las células T CD4+ y un aumento en las CD8+

(Chandra, y cols., 1982; Lal, y cols., 1980). Betancourt y colaboradores (Betancourt, y cols.), encontraron una disminución en el porcentaje de célula T CD4+. Por otro lado, otros autores reportaron bajos porcentajes de (CD3+), así como alteración en la relación CD4+/CD8+ y un ligero aumento de los linfocitos T CD8+ con relación a los niños sanos (Parent, y cols., 1994).

Sin embargo, Nájera y colaboradores (2004), compararon las subpoblaciones de linfocitos en niños desnutridos con niños bien nutridos sin infección y con infecciones y encontraron que los niños bien nutridos con infección mostraron disminución de linfocitos T CD3+ y que los niños desnutridos mostraron baja proporción de linfocitos B.

Dado que los datos en niños han resultado controversiales, se han realizado diversos estudios en modelos experimentales, en donde tanto la desnutrición como los factores asociados, como las infecciones, pueden controlarse (Ortiz, y cols., 1996).

Ratas desnutridas durante la lactancia, tienen menos linfocitos T en sangre periférica que sus hermanas bien nutridas (Ortiz, y cols., 1999). Así mismo, se encontró una disminución de linfocitos CD4+ y CD8+ en órganos linfoides secundarios (Flo, y cols., 1995; Flo, y cols., 1994). Sin embargo, en otros estudios no se observaron cambios en estas subpoblaciones, ni en la relación de CD4+/CD8+, pero sí se observa un incremento en los linfocitos quiescentes (Woodward, y cols., 1995).

Al evaluar la capacidad de respuesta de las células del sistema inmunológico en respuesta a activadores, algunos autores encontraron que los linfocitos de niños

desnutridos tuvieron una respuesta menor a los mitógenos (Chandra, 1991; Chowdhury y cols., 1993). Por otro lado, se propuso que los linfocitos tienen una respuesta rápida al activador, dado que observaron un índice de duplicación mayor a las 48 horas, lo que se interpretó como respuesta rápida al mitógeno o a una duración menor del ciclo celular (Gonzalez, y cols., 1990; Ortiz, y cols., 1994). Además, se observó que la fracción de linfocitos que responden al mitógeno y proliferan es menor en los niños desnutridos, por lo que se propuso que sólo tienen un periodo menor de latencia para entrar al ciclo, además se determinó que la duración del ciclo celular es mayor, lo que probablemente se asocia con una respuesta inmunológica deficiente (Ortiz, y cols., 1994).

Por otro lado, diversos autores observaron que la desnutrición leve y moderada también afecta el estado inmunológico. McMurray y colaboradores (1981) obtuvieron evidencia de reducción en la función mediada por células y en la humoral, en niños con desnutrición leve y moderada. Rodríguez y cols., (2005) observaron menor capacidad de activación de los linfocitos T en niños con desnutrición leve y moderada.

Existen evidencias que señalan los grados de desnutrición leve y moderada en niños, además de la grave, también tienen un alto riesgo de muerte relacionado a enfermedades infecciosas prevenibles y tratables, que indican un sistema inmunológico inmunodeficiente (Rice, y cols., 2000; Scrimshaw, 2003). Los estudios en que se toman en cuenta los niveles de desnutrición, permiten entender las alteraciones que inducen un estado inmunodeficiente.

Dado que los resultados hasta el momento son controversiales, en este trabajo se tiene como propósito:

- Demostrar si el grado de desnutrición afecta la distribución de las subpoblaciones de linfocitos en un modelo de desnutrición experimental libre de infecciones.
- Relacionar el grado de desnutrición con la respuesta de los linfocitos a un estímulo, en este caso in vitro, con ayuda del mitógeno PHA, usando como marcadores de activación al CD25 y CD71.
- Evaluar si los niveles de desnutrición afectan de manera diferente la proliferación in vivo en bazo, y cuáles fases del ciclo celular son afectadas.

I.7. Leptina, relación con el sistema inmunológico

Es una proteína producto del gen *ob*, de 16 kDa de masa molecular aparente que fue descrita como un factor de señal derivado de los adipocitos (Zhang, y cols., 1994). Además, la placenta y el epitelio gástrico sintetizan esta molécula (Dallongeville, y cols., 1998).

Diversos autores han señalado que la leptina está relacionada con la cantidad de grasa corporal y de manera indirecta refleja la disponibilidad de energía ya que regula varios aspectos del metabolismo y funciones endócrinas (Friedman y Halaas, 1998; Kamohara, y cols., 1997; Matarese y La Cava, 2004).

Algunos hallazgos en la estructura de la leptina y de su receptor sugieren que esta proteína puede clasificarse como una citocina, debido a que tiene similitud con las citocinas de cadena helicoidal larga, como la IL-6, IL-11, IL-12, factor de inhibición de leucemia (LIF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor neutrófilo ciliar (CNTF), y oncostatina M (OSM). (Fantuzzi y Faggioni, 2000; Lam y Lu, 2007). El receptor (OB-Rb) comparte similitudes con la familia de receptores de citocinas gp130 (Ahima y Osei, 2004; White, y cols., 1997).

Además, el OB-Rb se distribuye ampliamente y se expresa en las células madre hematopoyéticas y también se expresa en tejidos linfoides. Se ha encontrado que la leptina tiene un efecto sobre la respuesta de los linfocitos T a diferentes agentes, donde regula de manera diferencial a las células nativa y de memoria y la producción

de diferentes citocinas (Fantuzzi y Faggioni, 2000; Lord, y cols., 1998; Mito, y cols., 2004). Algunos autores han señalado la importancia de la leptina en la atrofia linfóide y la inmunosupresión durante la inanición (Howard, y cols., 1999; Lord, y cols., 1998).

Un estudio realizado en ratones obesos deficientes en leptina, se demostró que la administración de esta hormona protege al timo de la atrofia durante la inanición (Howard, y cols., 1999). Otros estudios en ratones han observado que esta hormona influye en el incremento de la proliferación de células vírgenes y la producción de INF- γ y IL-2, promoviendo la respuesta TH1 y suprimiendo la TH2 (Lord, y cols., 1998). Por otro lado, estudios realizados en ratas, demuestran un incremento en los niveles de leptina durante en la inflamación intestinal experimental (Barbier, y cols., 1998).

Por otro lado, Palacio y colaboradores, en un estudio en niños desnutridos, determinaron la producción de citocinas proinflamatorias por células mononucleares de sangre periférica, y observaron que después de haber recuperado un 10% de peso, los niveles de leptina incrementaron, además de un aumento significativo de IL-1 y TNF- α (Palacio, y cols., 2002). Un estudio realizado en nuestro grupo de trabajo, demostró que esta hormona tiene efecto positivo sobre la activación in vitro de linfocitos de niños desnutridos (Rodríguez, y cols., 2007).

I.8. Modelos Experimentales en la Investigación de la Desnutrición

Los animales de laboratorio han sido de gran importancia para la investigación y obtener el conocimiento necesario para el desarrollo del tratamiento de diversas enfermedades que, de otro modo, hubieran sido más difíciles de descubrir. Incluso, gran parte de los avances en medicina y ciencias afines se han logrado por experimentos en animales. Aunque los estudios en animales no son totalmente extrapolables a lo que sucede en humanos, son una herramienta muy poderosa para el estudio de padecimientos, y probar tratamientos potenciales (Senior, 1995). Se estima que el 70% de los animales de experimentación son para estudios en investigación de fármacos, prueba de vacunas, compuestos biológicos diversos, investigación en cáncer, mientras que el 30% son usados para propósitos de investigación básica y enseñanza, entre otros. (Baumans, 2004).

El estudio de las secuelas que padecen los niños durante y después de la desnutrición es de gran importancia, puesto que es en ellos en los que es necesario conocer los efectos desfavorables que se producen debido a la desnutrición. Sin embargo, por razones éticas así como por los factores extranutricionales que la acompañan, es indispensable utilizar modelos en animales de experimentación (Ortiz, 1987).

Para estudiar los efectos de la desnutrición, se han empleado rata, ratón, conejillo de indias, y muchos otros, en distintas etapas de la vida (prenatal, postnatal y edad adulta). Otra ventaja, es la posibilidad de realizar estudios tanto in vivo como in vitro,

así como analizar posibles efectos en diferentes grados de desnutrición. Asimismo, el ciclo de vida relativamente corto de los modelos animales y su bajo costo han hecho eficiente la experimentación en animales (Galler y Kanis, 1987; Ortiz, y cols., 1996).

Se han usado básicamente dos métodos para inducir desnutrición durante la lactancia en animales experimentales. Uno está basado en la baja calidad de la leche, donde las crías son alimentadas por una madre desnutrida (Marin, y cols., 1995). El otro método consiste en reducir la cantidad de alimento, al incrementar el número de cría por nodriza; por lo tanto, la cantidad de leche consumida por cría es menor (Ortiz, y cols., 1999; Winick y Noble, 1966).

En nuestro grupo de trabajo, se ha realizado el método de competencia de alimento durante la lactancia para estudiar los efectos de la desnutrición. Este método ha demostrado ser un método altamente reproducible y eficiente para inducir desnutrición, el cual produce altas proporciones de ratas desnutridas de segundo y tercer grado, con un bajo efecto en el índice de mortalidad (Ortiz, 1987; Ortiz, y cols., 1996; Ortiz, y cols., 1999).

I.9. Citometría de Flujo

La Citometría de Flujo (CF) es una herramienta que integra tecnologías de vanguardia, como la mecánica de fluidos, la óptica incluyendo el uso del láser, la electrónica y la informática. Esta herramienta permite medir de manera rápida objetiva, cuantitativa y precisa diferentes características de la célula o partícula (Ortiz, y cols., 2006). Los citómetros de flujo permiten el análisis simultáneo de diferentes características de la célula, como el tamaño, forma y complejidad, así como cualquier componente celular o función, marcada con un colorante fluorescente o fluorocromo.

Aunque la CF es una tecnología relativamente reciente, se ha propiciado un incremento en el uso de este instrumento aplicado a diferentes técnicas para el análisis de características celulares, tanto en los laboratorios de investigación básica como en laboratorios clínicos (Barrera-Ramírez, y cols., 2004; Ortiz, y cols., 2006).

Se pueden mencionar algunas aplicaciones como: diagnóstico de enfermedades, análisis de la función celular, seguimiento de la terapia contra el cáncer, detección de células fetales, cinética celular, identificación de células tumorales, citogenética (identificación de cromosomas, detección de micronúcleos), biología y bioquímica celular (Ortiz, y cols., 2006).

El creciente número de aplicaciones de la citometría de flujo ha aumentado en paralelo a las mejoras del instrumento en diferentes modelos de distintas marcas

(Brown y Wittwer, 2000), así como el desarrollo de nuevos fluorocromos, y nuevas herramientas de análisis por computadora (software) (Baumgarth y Roederer, 2000).

I.9.1 Bases de la Citometría de Flujo

En la Figura 8, se muestra un esquema para explicar cómo la desviación de luz incidente en la célula puede dar información acerca del tamaño y la complejidad interna de la célula. La desviación frontal (FSC), se origina por la difracción del láser sobre la célula o partícula. El detector de FSC mide la cantidad de luz desviada, la cual es directamente proporcional al área de la superficie celular y de este modo se puede clasificar a las células por tamaño relativo. En cuanto a la complejidad interna, la luz incidente que cruza la membrana celular y se interna en el citoplasma, al encontrarse con membranas internas se desvía en distintos ángulos. El detector de SSC identifica la luz desviada a 90°, y según la cantidad relativa de luz desviada, se puede relacionar con la cantidad de membranas internas en la célula (Darzynkiewicz, 1994; Dickinson, 1999).

La Figura 8 ejemplifica una gráfica resultante de los parámetros FSC y SSC de una muestra de sangre, en donde los linfocitos son las células de menor tamaño y con pocas membranas internas, los monocitos son más grandes y con mayor complejidad con respecto a los linfocitos y los granulocitos, ubicados en la parte superior de la gráfica, son las células más grandes y complejas de los leucocitos.

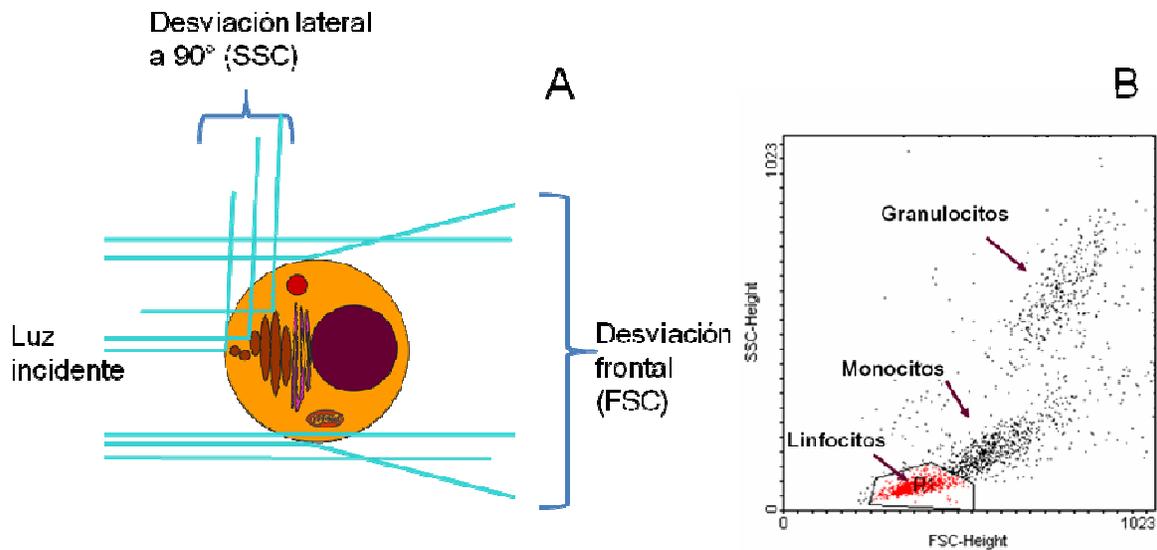


Figura 8. La detección de la desviación del láser al incidir en la célula, es útil para identificar células por su tamaño y complejidad relativa. Un ejemplo muy claro, son las células de sangre periférica. A) De forma esquemática se muestra la desviación frontal y la lateral cuando el láser incide sobre la célula. B) Se muestra una gráfica de puntos de una muestra de sangre, en donde se grafica la desviación frontal que indica tamaño relativo y desviación lateral que indica la complejidad interna.

La identificación de otras características de la célula se basa en el uso de marcadores celulares y fluorocromos. Estas moléculas fluorescentes tienen la capacidad de absorber la luz en una longitud de onda y emitir la energía absorbida en una longitud de onda mayor. En general, hay dos tipos de fluorocromos para citometría de flujo, los que se unen de forma no covalente a estructuras dentro de la

célula y aquellas que se unen covalentemente para otras pruebas (Darzynkiewicz, 1994; Ormerod, 2008)

En varios ensayos, se usan anticuerpos contra las moléculas que se desean identificar. Estos anticuerpos suelen marcarse con la unión de fluorocromos, como el isotiocianato de fluoresceína o FITC (emisión verde), la ficoeritrina o PE (emisión naranja), aloficocianina o APC (absorción en rojo y emisión en rojo), por decir algunos (Dickinson, 1999; Ormerod, 2008). En la Figura 9 se muestra un esquema en la que se ejemplifica la identificación de linfocitos B y T con ayuda de anticuerpos unidos a FITC y PE.

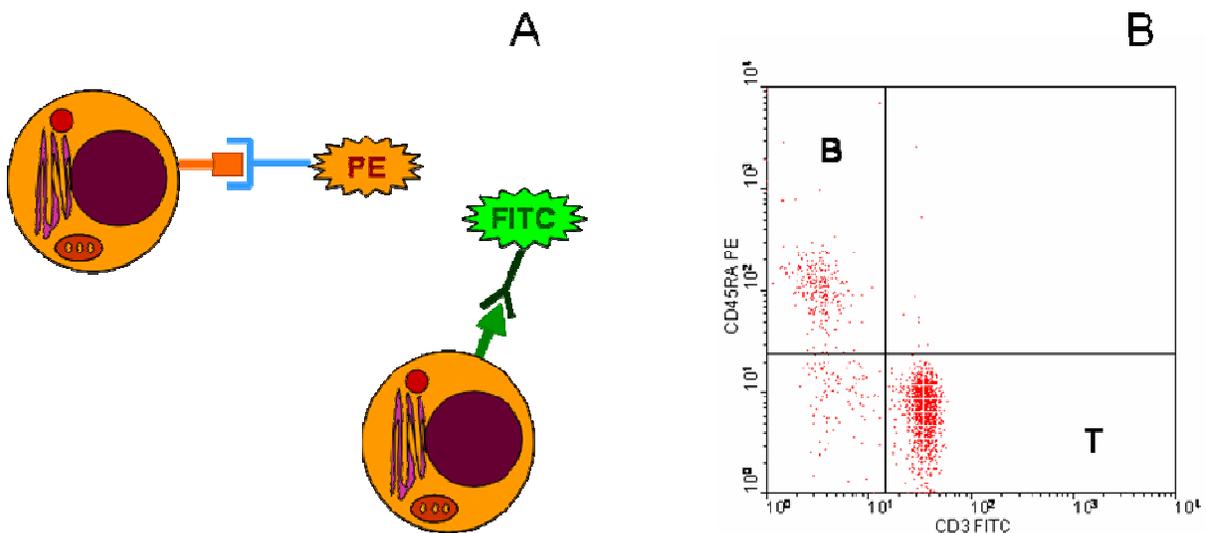


Figura 9. Los anticuerpos conjugados con fluorocromos son una herramienta útil para identificar subpoblaciones celulares. Ejemplo de esto es la identificación de subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica.

I.9.2 Inmunofenotipo y Activación de Linfocitos

Las primeras aplicaciones de la citometría de flujo se dirigieron a la identificación de parámetros inmunológicos, en un inicio, enfocados a la identificación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos. Alrededor de los años setenta, se logró caracterizar y separar células T y B por medio del uso de anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos que se unían a determinantes de la superficie celular (Herzenberg y De Rosa, 2000), lo que permitió que se ampliara la aplicación de esta tecnología en investigación clínica y práctica (Tung, y cols., 2007). El uso de la cuenta de células T CD4+ como herramienta para el seguimiento de la progresión del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), dio un impulso importante al avance de la citometría de flujo, y también abrió las posibilidades para aplicar a otras áreas clínicas (Mandy, 2004; Tung, y cols., 2007). Casi paralelamente, la identificación del inmunofenotipo se aplicaba en la identificación de leucemias, o el seguimiento de tratamientos contra las mismas (Brown y Wittwer, 2000; Goetzman, 1993). Además, la inmunotipificación también ha sido útil en la identificación o seguimiento de otras inmunodeficiencias y en el análisis de células madre (Tung, y cols., 2007).

Por otro lado, se han desarrollado ensayos para identificar por citometría de flujo marcadores de la funcionalidad de los linfocitos. La identificación de la expresión de marcadores que sólo se expresan por estimulación, es una herramienta útil para entender los mecanismos que permiten a los linfocitos activarse con diferentes estímulos (Caruso, y cols., 1997) En humanos, se ha evaluado la expresión de los

receptores CD25, CD71 y CD69 en diferentes padecimientos, como en individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), pacientes con diabetes tipo I, lupus eritematoso sistémico, y con trasplante renal, entre otros (Lim, y cols., 1998; Posselt, y cols., 2003).

I.9.3 Proliferación Celular

La proliferación celular se ha estudiado utilizando diferentes metodologías, algunas de ellas usan al mismo ADN como molécula que permite observar los cambios que ocurren durante el ciclo celular y para determinar la cinética de proliferación celular. Se han empleado diferentes metodologías para estudiar el paso de las células a través del ciclo celular:

La autorradiografía era el método más ampliamente utilizado desde finales de los años 50 para el estudio del ciclo celular se ha realizado (Quastler y Sherman, 1959). El precursor radiactivo más usado fue la timidina tritiada y estos estudios requieren de mucho tiempo y esfuerzo técnico para su realización (Darzynkiewicz, y cols., 2004; Zatterstrom, y cols., 1992). Otra desventaja es que puede dar alteraciones en la proliferación celular por la incorporación y/o eliminación del precursor radioactivo (Ortiz, 1987).

La bromodesoxiuridina (BrdU) es un análogo de la timidina que se ha utilizado para que al incorporarse al ADN de células proliferantes, sea posible estudiar la proliferación celular (Gratzner, y cols., 1979). El uso de anticuerpos monoclonales

acoplados con fluorocromos, ha permitido identificar la incorporación de la BrdU al ADN, ya sea por microscopía de fluorescencia (Gratzner y Leif, 1981), o por citometría de flujo (Darzynkiewicz y Huang, 2004; Dolbeare, y cols., 1983; Ortiz, y cols., 2006). A partir de esta técnica se han desarrollado modelos para medir la duración del ciclo y el tiempo de duplicación de la población celular proliferante de una sola muestra en cierto tiempo después de la administración de la BrdU (Begg, y cols., 1985; Eidukevicius, y cols., 2005).

II. JUSTIFICACIÓN

La desnutrición es un problema de salud en nuestro país y los efectos en los niños son devastadores, debido a que en los primeros años de vida los requerimientos nutricionales son mayores. Se ha observado una estrecha relación de la desnutrición con la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y se ha demostrado que la desnutrición afecta la integridad del sistema inmunológico. Actualmente, resulta de interés estudiar los efectos de la desnutrición moderada y grave sobre las respuestas específicas de los diferentes actores del sistema inmunológico para determinar cuál o cuáles son los más afectados.

Para tal efecto, se planteó estudiar, en un modelo experimental de desnutrición, los efectos de la desnutrición moderada y grave en las subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica y de bazo, así como la respuesta de linfocitos T de bazo ante un estímulo in vitro. Además, debido a la importancia del bazo como órgano linfoide secundario, se propuso estudiar proporción de sus células en cada una de las fases del ciclo celular, y la proliferación celular por medio del análisis de la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) como marcador.

III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la activación in vitro de linfocitos y la proliferación in vivo de células de bazo de ratas bien nutridas y ratas desnutridas de 21 días de edad con segundo y tercer grado de desnutrición inducida por competencia de alimento durante la lactancia.

IV. OBJETIVOS PARTICULARES

1) Evaluar el número de células en sangre y bazo, así como la concentración de proteínas y leptina en el modelo de inducción de la desnutrición experimental durante la lactancia.

2) Evaluar, por medio de citometría de flujo, las diferentes subpoblaciones de linfocitos T totales, B, NK, los T4 y T8 en ratas desnutridas de segundo y tercer grado y testigos sanos, obtenidos a partir de sangre periférica y del bazo.

3) Determinar, por citometría de flujo, el efecto de la desnutrición de segundo y tercer grado sobre la activación de linfocitos de bazo en cultivos primarios in vitro .

4) Determinar el efecto de la desnutrición sobre la proliferación in vivo de células de bazo de ratas de 21 días de edad.

V. HIPÓTESIS

Se ha observado que la desnutrición afecta de manera importante la capacidad proliferativa celular general de los organismos sujetos a este síndrome, por lo que si se generan ratas desnutridas de segundo y tercer grado por competencia de alimento durante la lactancia y a los 21 días de edad el sistema inmunológico se ve afectado, esto se reflejaría en: a) la disminución de las poblaciones celulares de los linfocitos tanto en sangre periférica como en los esplenocitos; b) la disminución de la capacidad de activación de linfocitos de bazo cultivados in vitro; c) la proliferación de las células del bazo evaluadas in vivo.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

En el esquema del diseño experimental, se muestra la secuencia de pasos llevados a cabo para realizar este estudio y cumplir con los objetivos propuestos. (Figura 10)

Además, se evaluaron parámetros relacionados con el estado nutricional de las ratas, como peso corporal, déficit de peso, peso del bazo, concentración de células en sangre y bazo, así como la concentración de proteínas, por método de Fenol-Folín (Lowry, y cols., 1951) y leptina en sangre (Hardie, y cols., 1996; Pagano, y cols., 1997). Para medir los niveles de leptina se utilizó el método de Quantikine (R&D Systems, E.U.A.)

VI.1. Desnutrición por competencia de alimento

Se emplearon ratas de la cepa Wistar producidas en el Bioterio de la UAM Iztapalapa, que cuenta con un lugar especial para esta especie, con un ciclo de luz de 12/12 horas luz/obscuridad. Las nodrizas son alimentadas con alimento balanceado para roedores (PMI 5008).

Al día siguiente del nacimiento de las crías, fueron distribuidas en dos lotes: lote experimental (desnutridas) en la cual se colocaron de 16 a 18 crías con una nodriza, y lote testigo (bien nutridas) con seis a siete crías por nodriza. Las crías fueron pesadas cada dos a tres días, desde el día uno hasta el día 21 (destete).

Para identificar el grado de desnutrición en las ratas al destete, se agruparon en tres grados de acuerdo con déficit de peso respecto de las bien nutridas:

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

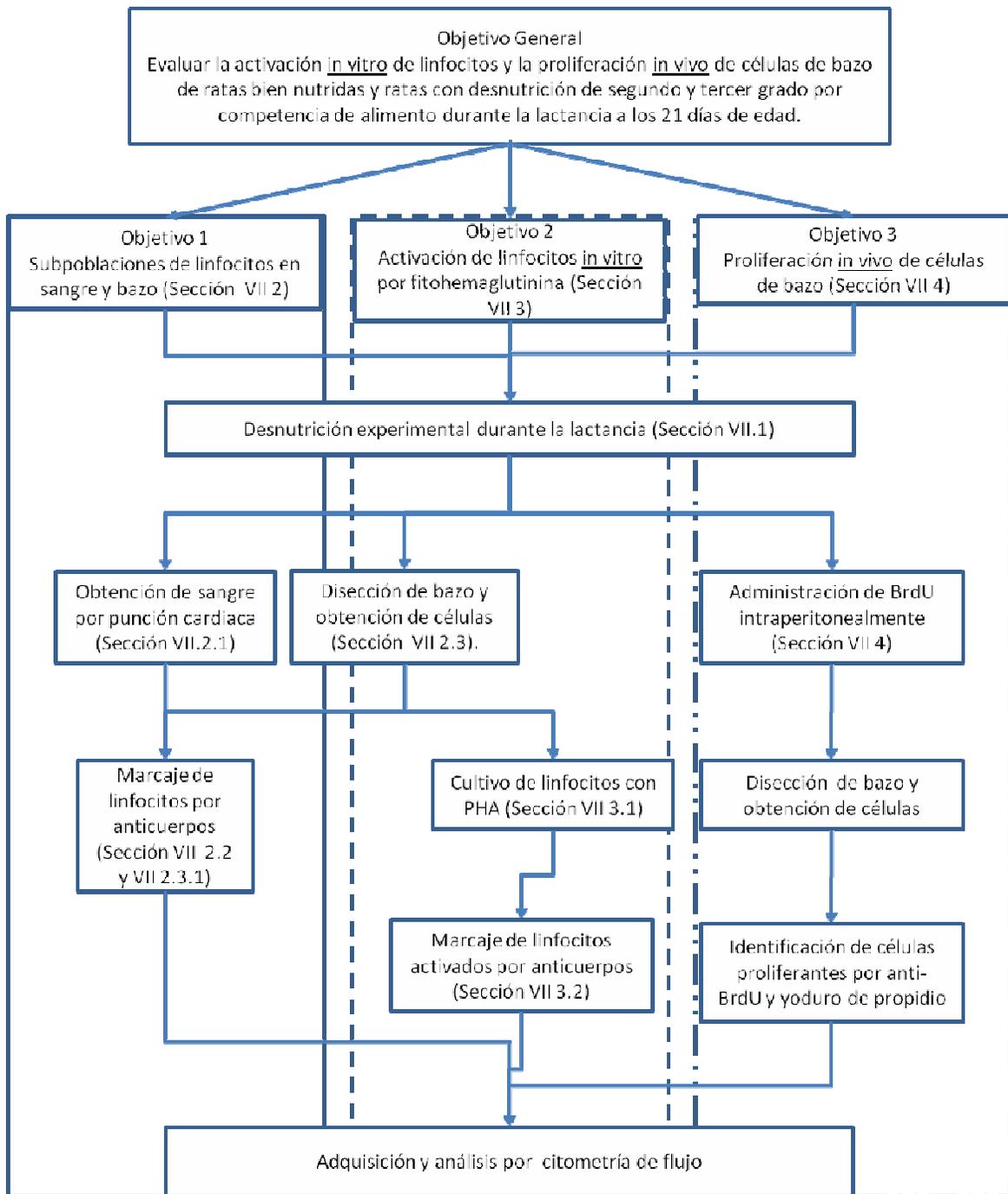


Figura 10. Diagrama del diseño experimental. Se muestra el objetivo general y los objetivos particulares y los pasos que se siguieron para cumplir cada uno. En cada recuadro se indica la sección correspondiente al material y métodos.

VI.2. Subpoblaciones de linfocitos

VI.2.1 Extracción de sangre

Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y la sangre se extrajo por punción cardiaca con una jeringa heparinizada.

VI.2.2 Identificación de subpoblaciones de linfocitos en sangre

Se realizó la cuenta leucocitaria en una cámara de Neubauer haciendo una dilución 1:20 con solución de Turk, se contó en un microscopio Olympus, usando el objetivo 40x.

Se realizaron frotis de sangre para realizar conteo diferencial de las poblaciones de leucocitos (linfocitos, monocitos y granulocitos). Los frotis se dejaron secar a temperatura ambiente y se tiñeron con colorante de Wright (0.24g de colorante de Wright en 100 mL de metanol), durante 15 minutos, después sin eliminar el colorante, se adicionó con una pipeta Pasteur 2-3 volúmenes de amortiguador salino de fosfatos a pH 6.8 dejando actuar la mezcla durante 10 minutos. Enseguida se lavó el portaobjetos bajo agua corriente y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco el portaobjetos, se procedió a contar al microscopio con el objetivo 40x un total de 200 leucocitos.

Además, se hizo la identificación por medio de citometría de flujo, utilizando gráficas de puntos de tamaño contra complejidad interna, basados en la desviación de la luz,

en donde la desviación frontal (FSC) indica el tamaño y la desviación lateral a 90° (SSC) indica la complejidad interna. Los linfocitos fueron identificados como las células de menor tamaño y complejidad interna, siguiéndolas los monocitos, y como células más grandes y complejas, los granulocitos (Figura 11A).

Para la identificación de leucocitos se utilizó el anticuerpo anti-CD45 TC, mientras que para linfocitos T, B y NK, se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-CD3 FITC, anti-CD45RA PE y el anti NKR-P1A APC, respectivamente; para la identificación de los linfocitos T4 y T8, se utilizaron los anti-CD4 Cy-Chrome y el anti-CD8 PE, respectivamente (Figuras 11B, C y D).

A cada 100 μ L de sangre se le añadieron 2 μ L de cada uno de los anticuerpos y se dejaron incubar por 30 minutos. Se añadieron 2 mL de la solución de lisis (BD), se mezcló y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron procesadas para su tinción como se indica en el Anexo 1. Posteriormente, las muestras fueron leídas en el citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson). Las gráficas de punto utilizadas para la identificación y análisis de las células de sangre periférica se muestran en la figura 11.

Se obtuvo el número de células por mililitro de sangre ($\times 10^6/\text{mL}$) de cada una de las subpoblaciones de linfocitos utilizando la siguiente fórmula:

$$N_{sple} = \frac{\%sp}{100} \times \frac{cli}{100} \times cle$$

en donde:

N , número de células; Sp , subpoblación; le , leucocitaria; $\%sp$, porcentaje de la subpoblación seleccionada; cli , cuenta linfocitaria; c/e , cuenta leucocitaria.

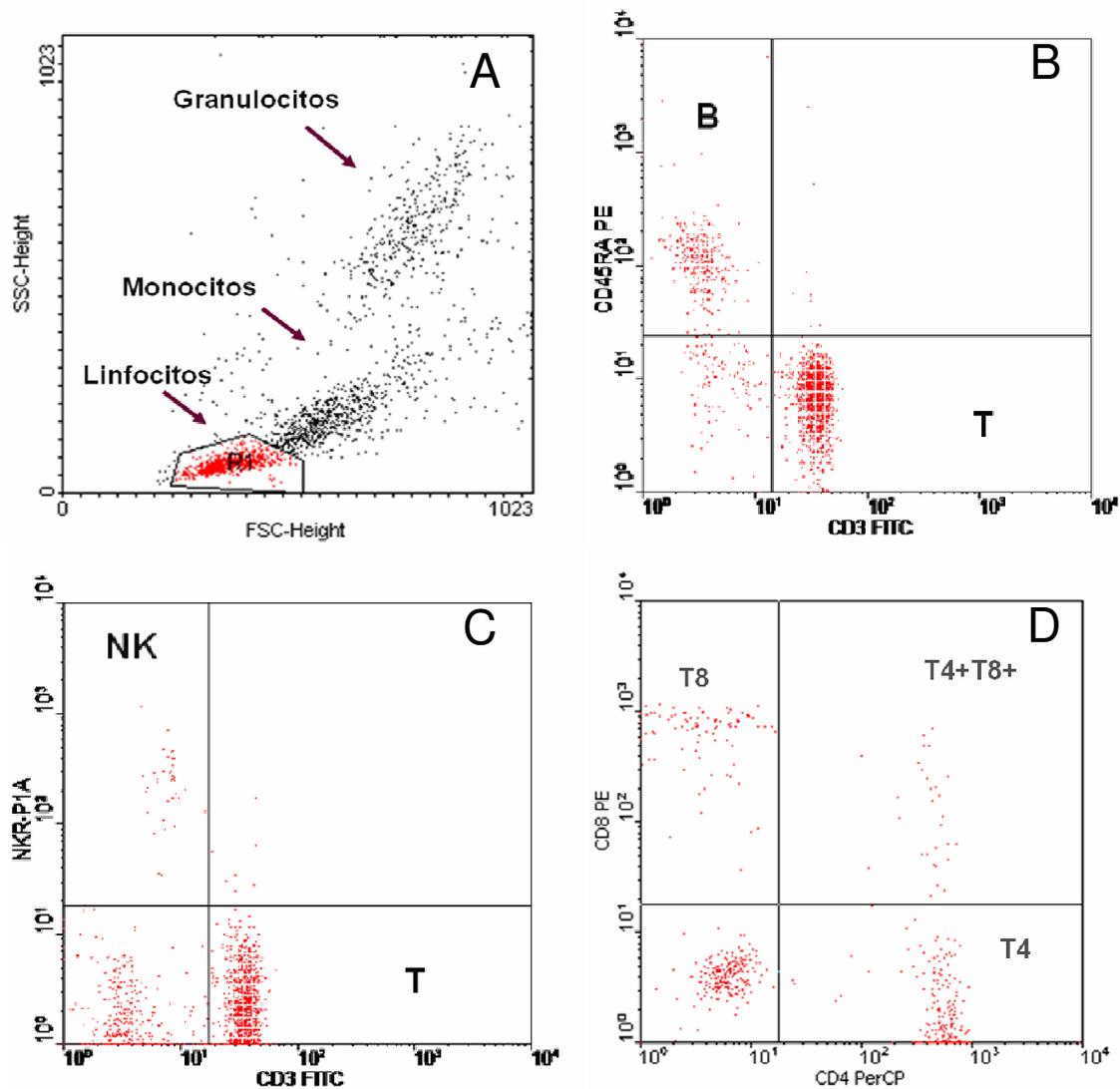


Figura 11. Gráficas de punto utilizadas para identificar y analizar linfocitos de sangre periférica. (A) Región de linfocitos en la gráfica de FSC vs SSC (tamaño vs complejidad interna). (B) A partir de la región de linfocitos (R1), se grafica CD3 FITC para identificar a los linfocitos T y CD45RA para identificar linfocitos B. (C) De la región 1, se grafica CD3 FITC y NKR-P1A para identificar células NK. (D) Identificación de células T-CD4 (ayudadoras) y T-CD8 (citotóxicas).

VI.2.3 Extracción de bazo

Después de sacrificar a la rata por dislocación cervical, el bazo se disecó y se colocó en tubos con medio ISCOVE (Gibco), después se pesó en una balanza analítica. El tejido se disgregó con ayuda de una malla de plástico y un pistilo de vidrio. Las células se recuperaron en 4 mL de medio ISCOVE.

La cuenta leucocitaria se realizó usando una cámara de Neubauer haciendo una dilución de 1:40 con solución de Turk, en un microscopio Olympus, usando el objetivo 40x.

VI.2.4 Identificación de linfocitos en bazo

La tinción específica de las moléculas de superficie celular se realizó con los siguientes anticuerpos específicos contra antígenos de rata: a) anti CD3-FITC, anti CD45RA Cy-Chrome (Pharmingen), anti NK APC (Caltag), para la identificación de linfocitos T, B y NK, o b) anti CD3 FITC, anti CD8 PE y anti CD4 Cy-Chrome (Pharmingen), para la identificación de los linfocitos T4 y T8. El procedimiento para la tinción específica se describe en el Anexo 1. Las muestras se leyeron en el citómetro de flujo FACScalibur de Becton Dickinson.

VI.3. Activación de los linfocitos de bazo in vitro

VI.3.1 Cultivos de linfocitos de bazo

Las células de bazo, se sembraron en una concentración de 5×10^6 células en 1 mL de medio ISCOVE (Gibco). Se añadió PHA (Sigma), para una concentración final de 25 µg/mL de cultivo. El tiempo de cultivo fue de 24 h, en una atmósfera de CO₂ al 5% y 95% de humedad.

Se evaluó la viabilidad mediante la técnica de exclusión del colorante vital azul tripano en un microscopio Olympus, con un objetivo de 40x. Las células vivas se observaron birrefringentes al microscopio, mientras que las muertas se tiñeron completamente de azul.

VI.3.2 Marcaje de células en cultivo por anticuerpos monoclonales

La combinación de anticuerpos (Pharmingen) que se utilizaron fue la siguiente: anti-CD3 conjugado con isoticianato de fluoresceína (FITC) para linfocitos T; anti-CD25 conjugado con ficoeritrina (PE) para el receptor de IL-2, anti- CD45RA Cy-Chrome, para la identificación de de linfocitos B, anti-NKR-P1A APC para la identificación de células NK. El cultivo se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 500 µL de PBS. En el anexo 2 se indican los pasos que se siguieron para el procedimiento de tinción de células. En la Figura 12 se muestran las gráficas de punto utilizadas para identificar las regiones de linfocitos y linfocitos T, y

para el análisis de las células activadas. Las figuras 12C y 12D corresponden a los linfocitos T sin activar y activados CD25+, respectivamente.

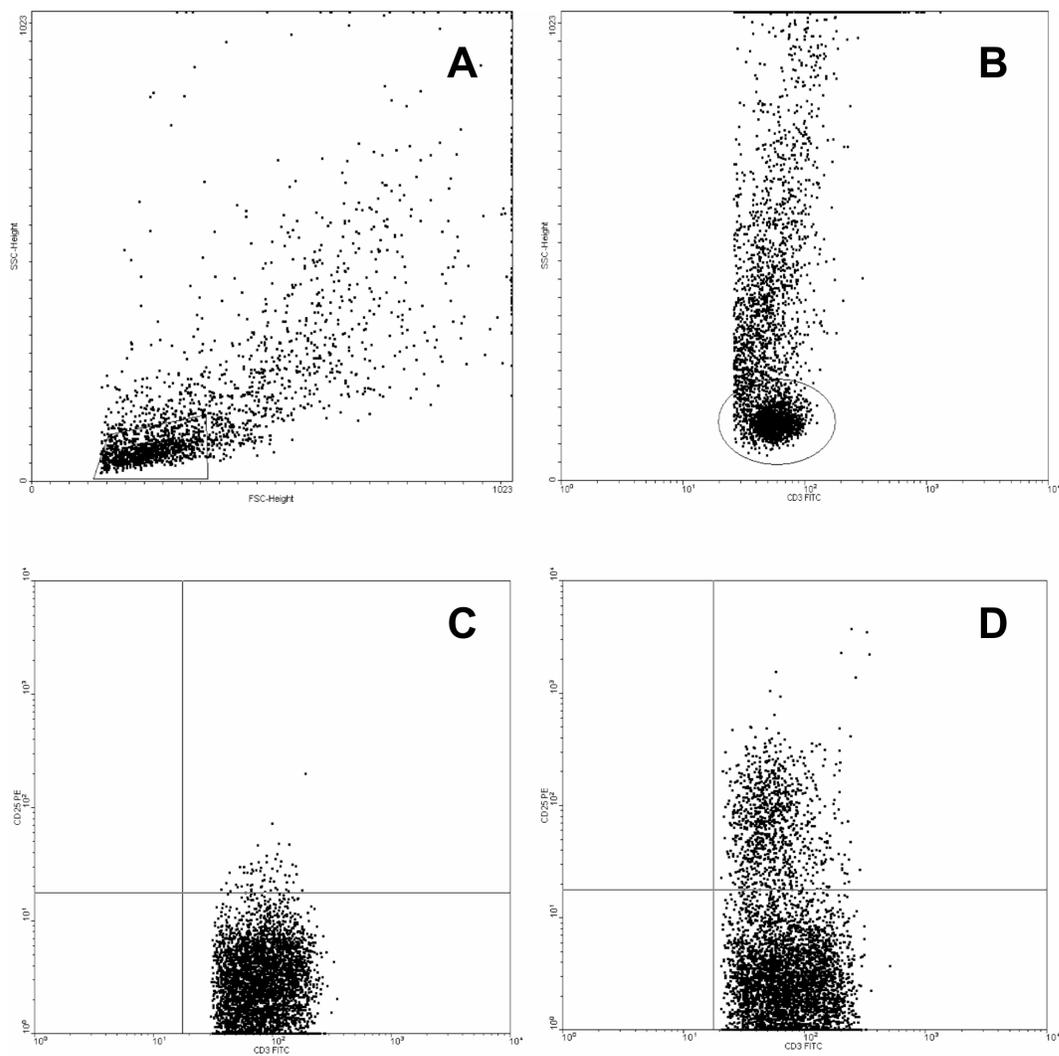


Figura 12. Gráficas de punto utilizadas para identificar linfocitos activados. (A) Región de linfocitos en la gráfica de FSC vs SSC (tamaño vs complejidad interna). (B) Distribución de FSC y CD3 FITC para identificar a los linfocitos T. Para identificar a los linfocitos activados, se seleccionaban las células de las regiones A y B. C y D son ejemplos de expresión de CD25 en linfocitos CD3+ sin estimular o estimulados en cultivos de bazo, respectivamente.

VI.4. Detección de Proliferación in vivo

A las ratas se les aplicó una dosis intraperitoneal de 1mg de BrdU por gramo de peso corporal. La BrdU se dejó incorporar durante 2, 4, 6 y 8 horas, los animales se sacrificaron y se disecó el bazo, como se mencionó previamente en la sección VII 2.3, solo que se usó solución PBS, en lugar de medio de cultivo. Las células se fijaron en etanol al 70% frío (pH=2) y se refrigeraron durante 24 horas. Se marcaron con anticuerpos contra BrdU, según las indicaciones del fabricante (Roche) y se añadió yoduro de propidio (Sigma, 5 µg/mL final) y se incubaron 15 min. Finalmente, se fijaron en paraformaldehído (1%, en PBS) y se analizaron 20,000 células en un citómetro de flujo (modelo FACScan, Becton Dickinson). Se usaron gráficas de contorno, donde se determinó el porcentaje de células positivas a BrdU (Figura 10).

El índice de marcaje (LI) se obtuvo como el porcentaje de células que incorporaron BrdU del total de las células analizadas. El tiempo de de la fase S (TS) y el de duplicación de la población (Tpot) se calcularon según las fórmulas propuestas por Begg y colaboradores (1985)

VI.5. Análisis de datos

La incorporación de BrdU se analizó con el programa Cell-Quest, utilizando gráficas de punto de contenido de ADN contra incorporación de BrdU (Figura 13). Los datos de subpoblaciones de linfocitos fueron analizados en el programa Win MDI. Las

comparaciones entre los grupos se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, utilizando el programa JMP (SAS Institute Inc., NC, EUA) o el NOPANDEV Se analizaron un mínimo de 2000 células por muestra.

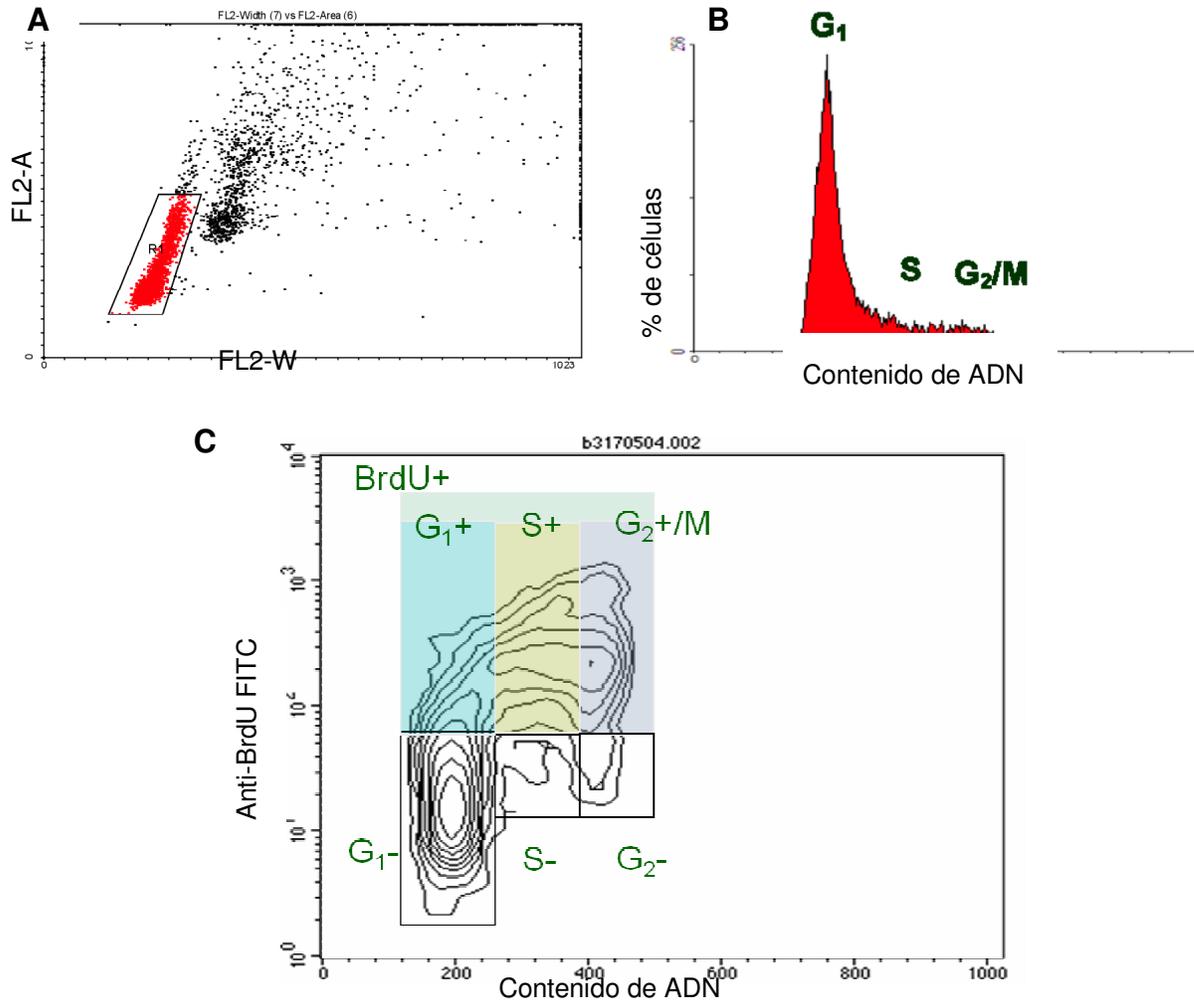


Figura 13. Gráficas para el análisis del contenido de ADN e incorporación de BrdU. **A.** Se muestra una gráfica de puntos de los parámetros FL2-W vs FL2-A, para seleccionar la población de células para analizar, discriminando los dobletes. **B.** Histograma del contenido de ADN y frecuencia de células, en donde se señala el pico correspondiente a las células en G₁, las que están en fase S y el pico de las células en G₂/M. **C.** Gráfica de contorno en donde se señalan las células en distintas fases del ciclo y se indican las que incorporaron BrdU durante el proceso de síntesis de ADN.

VII. RESULTADOS

VII.1. Evaluación de la desnutrición experimental durante la lactancia

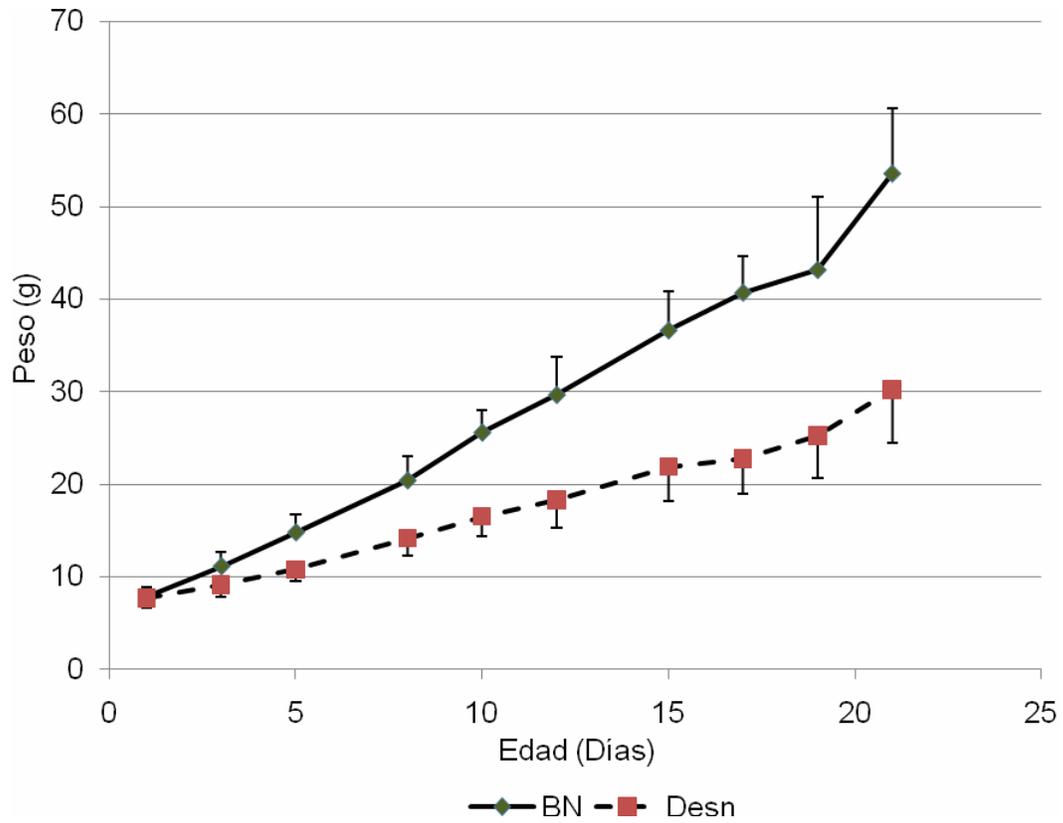
La gráfica 1 muestra la curva de crecimiento de 16 camadas de ratas bien nutridas y 16 de desnutridas experimentalmente durante el periodo de lactancia, desde el día uno, correspondiente al día siguiente de nacidas, al día 21, que corresponde al día del destete. El promedio de peso corporal al siguiente día de nacidas fue de 7.7 ± 1.0 g. El peso de las ratas desnutridas experimentalmente fue significativamente menor al de las bien nutridas desde los cinco días de edad ($p < 0.05$).

En la evaluación del procedimiento de inducción de desnutrición experimental durante la lactancia sobre el aumento en el peso corporal, se observó que las ratas bien nutridas (BN) de 21 días de nacidas tuvieron un peso promedio de 54.6 ± 2.2 g (Cuadro 1), las desnutridas de segundo grado (Desn 2º), de 35.9 ± 1.9 g, con un déficit de peso 33.7 ± 3.5 %, mientras que las desnutridas de 3er grado (Desn 3º), 26.6 ± 3.1 g y un déficit de 50.7 ± 6.0 %, con respecto a las testigo BN. Los valores de peso corporal fueron significativamente diferentes, cuando se compararon los lotes de ratas desnutridas con bien nutridas. Estos valores señalan que el método de desnutrición experimental por competencia de alimento tuvo un profundo efecto negativo considerable sobre el aumento de peso corporal, y además permite obtener ratas con diferentes grados de desnutrición.

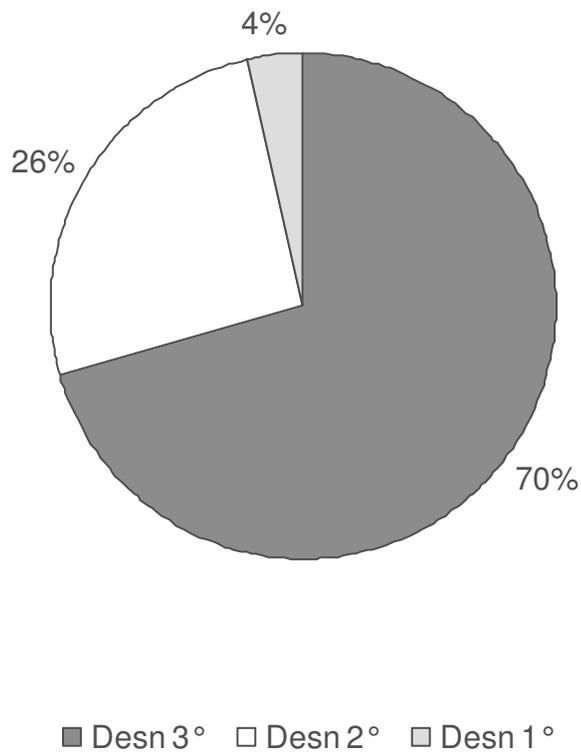
En la gráfica 2 se muestra la distribución por grado de desnutrición de ratas desnutridas al destete, según el déficit de peso. Los datos mostrados indican que este modelo genera ratas con diferentes grados de desnutrición, predominando las de tercer grado.

En el cuadro 1 se muestran los valores del peso de bazo, número de células obtenidas del bazo, leucocitos en sangre periférica, concentración de proteínas y leptina en plasma. Se observa el efecto de la desnutrición en cada uno de estos parámetros.

El peso de bazo se observó disminuido en aproximadamente 44% en ratas Desn 2° y un 63% en Desn 3°. Esta observación se corroboró en el análisis del número de células, porque la celularidad en ratas desnutridas fueron 43% y 52% menores en relación con las ratas BN. Se calculó la relación entre el peso del bazo y el peso corporal y se encontró que disminuye claramente en ambos grupos de desnutridas comparadas con las del testigo ($p < 0.05$ en ambos casos). Sin embargo, en la relación entre el número de células y el peso del bazo, no se encontró diferencia estadística lo que indica que se mantiene la densidad celular en los bazos de ratas desnutridas y bien nutridas aunque el tamaño del bazo sí fue menor..



Gráfica 1. Curva de crecimiento de ratas bien nutridas (BN) y desnutridas experimentalmente (Desn) durante el periodo de lactancia (promedio \pm D.E.) BN: n=110; Desn: n=193.



Gráfica 2. Distribución del porcentaje de ratas desnutridas experimentalmente, clasificadas por grado de desnutrición, al considerar el déficit de peso: Desn 1°, 10 al 24%; Desn 2°, del 25 al 39%; y Desn 3°, 40% o más.

VII.2. Biometría de leucocitos en sangre periférica

En el cuadro 2 se muestran los números de leucocitos, linfocitos, monocitos y granulocitos. En cuanto al porcentaje de linfocitos, se observó un 88.4 % en ratas BN, 88.6 % en ratas Desn de 2° grado y 83.2 % en ratas Desn 3° grado. Se observa que en ambos grupos de ratas desnutridas hubo diferencia estadística en comparación con el grupo de BN en el número de leucocitos y en el de linfocitos en sangre periférica ($p < 0.05$). Además, se observa también que las ratas con desnutrición grave, tienen significativamente menor número de linfocitos que las ratas con desnutrición moderada. También se observó que el número de monocitos es menor en ambos grupos de ratas desnutridas, en comparación con las BN (BN vs Desn 2°, 0.05; BN vs Desn 3°, $p < 0.05$). En cuanto a los granulocitos, no hubo diferencia entre los grupos (Cuadro 2).

Cuadro 1. Parámetros generales determinados en ratas desnutridas por competencia durante la lactancia (Desn) y bien nutridas (BN) a los 21 días de edad.

Parámetro	BN	Desn 2°	Desn 3°
Peso corporal (g)	54.2 ± 2.5	35.9 ± 1.9 *	26.6 ± 3.1 *#
Déficit de peso	—	33.7 ± 3.5	50.7 ± 6.0
Peso del bazo (mg)	274.9 ± 43.7	154.0 ± 42.7*	101.7 ± 21.7*#
Peso del bazo (mg)/Peso corporal (g)	5.1 ± 0.8	4.3 ± 1.1*	4.1 ± 0.9*
Déficit %	—	44.0 ± 15.5	63.0 ± 7.7
Células(x10 ⁶)/bazo	200.0 ± 55.5	115.0 ± 35.7 *	76.6 ± 21.1 *#
Déficit %	—	38.3 ± 18.8	62.4 ± 11.7
Células(x10 ⁶)/100mg de bazo	73.2 ± 17.6	79.2 ± 29.7	75.2 ± 14.7
Leucocitos en sangre periférica (x10 ⁶)/mL	3.7 ± 1.2	2.2 ± 0.5*	1.9 ± 0.6*
Proteínas en plasma (mg/ml)	36.4 ± 7.0	29.2 ± 3.2*	23.9 ± 5.9*#
Leptina en plasma (ng/mL)	10.6 ± 4.9	6.6 ± 3.5*	3.9 ± 2.2*#

Los valores se representan en promedio ± desviación estándar. Los promedios o valores con diferencia estadística están seguidos por superíndices. *Diferencia estadística con el grupo de BN, p<0.05; # Diferencia estadística entre Desn 2° y Desn3°, p<0.05. BN, n=12; Desn 2°, n=10; Desn 3°, n=10. La concentración de proteínas en plasma fue determinada por método de Lowry. La leptina se determinó por el método de ELISA (Hardie, y cols., 1996).

Cuadro 2. Número de leucocitos, linfocitos, monocitos y granulocitos en ratas desnutridas por competencia durante la lactancia (Desn) y bien nutridas (BN) a los 21 días de edad.

Parámetro	BN	Desn 2°	Desn 3°
Leucocitos ^a	3.7 ± 0.3	2.2 ± 0.1 *	1.9 ± 0.1 *
Linfocitos ^a	3.2 ± 0.3	1.9 ± 0.1 *	1.6 ± 0.1 *,#
Monocitos ^b	2.7 ± 0.8	1.2 ± 0.3 *	1.1 ± 0.5 *
Granulocitos ^b	2.0 ± 0.5	1.7 ± 0.2	1.4 ± 0.4

Los valores se representan en promedio ± error estándar. Los promedios o valores con diferencia estadística están seguidos por sobreíndices. *Diferencia estadística con el grupo de BN, p<0.05; # Diferencia estadística entre Desn 2° y Desn3°, p<0.05. ^a (x10⁶/mL); ^b (x10⁵/mL)

VII.3. Biometría de las Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica

En el cuadro 3 se muestran los porcentajes promedio de las subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica de ratas bien nutridas y desnutridas de segundo y tercer grado. Se observa que tanto el grupo de ratas desnutridas de 2° como las de 3° presentaron un porcentaje menor que las ratas BN (BN vs. Desn 2°, p < 0.05; BN vs. Desn 3°, p < 0.05); además, se observa que también existe diferencia estadística entre ambos grupos de ratas desnutridas (Desn 2° vs. Desn 3°, p < 0.05). En el porcentaje de linfocitos B no se observó diferencia estadística entre las ratas desnutridas con las BN; sin embargo, al comparar a las desnutridas de 2° con las desnutridas de 3°, sí se encontró diferencia estadística, mostrando un mayor

porcentaje las de segundo con respecto a las de tercero ($p < 0.05$). Las células NK de las ratas desnutridas de segundo y tercer grado presentaron una tendencia a la alza, en comparación con las ratas BN (BN vs Desn 2º, $p < 0.05$; BN vs Desn 3º, $p < 0.05$), aunque no se encontró diferencia entre las desnutridas de 2º y 3º.

Cuadro 3. Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de ratas desnutridas (Desn) de 2º y 3º y bien nutridas (BN) (%).

Subpoblación	BN	Desn 2º	Desn 3º
T	55.6 ± 1.7	43.4 ± 2.9*	49.0 ± 1.7*#
B	29.3 ± 2.9	39.3 ± 3.6*	29.3 ± 2.2 #
NK	2.6 ± 0.4	4.1 ± 0.6*	7.6 ± 2.0*
Linfocitos Totales	87.5 ± 2.3	85.4 ± 3.0	87.2 ± 2.8
Células no linfoides	12.5 ± 2.3	14.6 ± 3.0	12.8 ± 2.8

Los datos son presentados como promedio ± error estándar. *Diferencia estadística con las ratas BN ($p < 0.05$). # Diferencia estadística con las Desn 2º ($p < 0.05$). BN, $n=17$; Desn 2º, $n=15$; Desn 3º, $n=12$.

El cuadro 4 muestra los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T en la región CD3+. El porcentaje de linfocitos TCD4+ en la región de linfocitos del grupo de desnutridas de segundo grado disminuyó, comparándolo con las BN, aunque no se encontró diferencia estadística, debida probablemente a la variabilidad. Se observó disminución en las células CD3+CD4+ en el grupo de ratas Desn 3°. El porcentaje de linfocitos CD3+CD4+CD8+ incrementó en ambos grupos de ratas desnutridas, pero no se observó diferencia estadística. No se observó diferencia en las otras subpoblaciones en ninguno de los grupos.

El número de linfocitos T, B y NK por mililitro de sangre se muestran en la Cuadro 5. Los linfocitos T disminuyeron tanto en el grupo de Desn 2° ($p < 0.05$) como en el grupo de Desn 3° ($p < 0.05$), comparando ambos con el grupo BN. Los linfocitos B también disminuyeron en ambos grupos de ratas desnutridas (BN vs Desn 2°, $p < 0.05$ BN vs Desn 3°, $p < 0.05$). Además, se observó que las ratas del grupo Desn 3° tuvieron menos linfocitos B en comparación con las Desn 2° ($p < 0.05$). Las células NK no mostraron diferencia estadística en ninguno de los grupos. En cuanto a las células CD4+ y CD8+, se observó que la desnutrición disminuyó el número en sangre de todas las subpoblaciones.

En el Cuadro 5 se muestra el número de linfocitos T4, T8 y dobles positivos en cada grupo. Se observó que los números de linfocitos T4 fueron significativamente más bajos en las ratas desnutridas de segundo y tercer grado, que en las bien nutridas (BN vs Desn 2°, $p < 0.05$; BN vs Desn 3°, $p < 0.05$). Los linfocitos T8 disminuyeron en

las ratas Desn 2°, pero no fue así en el grupo Desn 3°. Los linfocitos T CD4+CD8+ (dobles positivos, DP) incrementaron en el grupo de las Desn 3° mientras que las Desn 2° no tuvieron diferencia significativa en comparación con las ratas BN (BN vs. Desn 2°, $p < 0.05$; BN vs. Desn 3°, $p < 0.05$).

Cuadro 4. Subpoblaciones de linfocitos T (CD3+) obtenidos de sangre en ratas, Desn 2°, Desn 3° y BN a los 21 días de edad. (% \pm E.E.)

Subpoblación	BN	Desn 2°	Desn 3°
CD4+	69.3 \pm 2.0	66.7 \pm 3.4	62.8 \pm 4.1*
CD8+	24.1 \pm 1.9	25.5 \pm 3.3	24.4 \pm 1.6
CD4+CD8+	4.6 \pm 0.5	5.5 \pm 1.6	6.3 \pm 1.5
CD4 ⁻ CD8 ⁻	1.9 \pm 0.6	2.2 \pm 0.5	1.9 \pm 0.4

Los datos son presentados como promedio \pm error estándar. *Diferencia estadística con las ratas BN ($p < 0.05$). # Diferencia estadística con las Desn 2° ($p < 0.05$).

Cuadro 5. Número de linfocitos en sangre periférica de ratas Desn 2°, Desn 3° y BN a los 21 días de edad. (% ± E.E.) (x10⁵células/ml de sangre periférica)

Subpoblación	BN n= 17	Desn 2° n= 15	Desn 3° N= 12
T	18.0 ± 1.6	7.7 ± 0.8*	7.6 ± 0.8*
B	9.5 ± 1.3	7.2 ± 0.9	4.4 ± 0.6*#
NK	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.1
Células no linfoides	0.9 ± 0.2	1.2 ± 0.3	1.7 ± 0.5
CD4	12.9 ± 1.4	5.7 ± 0.7*	4.6 ± 0.5*
CD8	4.8 ± 0.6	2.8 ± 0.6*	2.1 ± 0.3*
CD4+CD8+	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.6	0.8 ± 0.2*
CD4 ⁻ CD8 [‡]	7.0 ± 0.2	3.6 ± 0.7	3.3 ± 0.5

Nota: Los datos son representados como promedio ± error estándar. *Diferencia estadística con las ratas BN (p < 0.05). # Diferencia estadística con las Desn 2° (p<0.05). ‡ x10⁴ células/ml

VII.4. Subpoblaciones de linfocitos en bazo

En el Cuadro 6 se resumen los datos de las subpoblaciones de linfocitos de bazo (T, B y NK) en ratas BN y Desn. Se observaron porcentajes significativamente menores de linfocitos CD3 en las ratas desnutridas que en las bien nutridas ($p < 0.05$). Asimismo, el total de linfocitos disminuyó significativamente en la región analizada ($p < 0.05$), aumentando las células no linfoides ($p < 0.05$).

Las subpoblaciones CD3+CD4+ y CD3+CD8+ se muestran en el cuadro 7. Los porcentajes de linfocitos CD4+ disminuyeron significativamente en ambos grupos de ratas desnutridas ($p < 0.05$). Sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de ratas desnutridas, probablemente debido a la alta variabilidad. La subpoblación CD4-CD8- se incrementó en las ratas Desn 3° en comparación con las BN.

La concentración de las subpoblaciones T y B de linfocitos (Cuadro 8), se encuentran disminuidas en ambos grupos de ratas desnutridas, y se observó una disminución significativa en el número de linfocitos T de ratas del grupo Desn 3°, en comparación con el grupo Desn 2°. El número de linfocitos CD4+ y CD8+ fue menor en ambos grupos de ratas desnutridas, al comparar con el grupo de ratas BN.

**Cuadro 6. Subpoblaciones de linfocitos obtenidos de bazo en ratas
Desn 2°, Desn 3° y BN a los 21 días de edad. (% ± E.E.)**

Subpoblación de	BN	Desn 2°	Desn 3°
linfocitos	n= 10	n= 7	n= 7
T	46.6 ± 2.6	36.8 ± 2.5*	38.1 ± 2.7*
B	26.6 ± 2.8	28.2 ± 3.0	23.0 ± 3.0
NK	3.9 ± 0.6	3.4 ± 0.5	5.1 ± 0.9
Linfocitos totales	76.8 ± 3.1	71.4 ± 4.4	65.9 ± 4.4*
Células no linfoides*	24.7 ± 2.9	30.6 ± 4.4	34.1 ± 4.4*

Promedios ± error estándar (E.E.). * Diferencias estadísticas en comparación con el grupo de ratas BN, $p < 0.05$: CD3+, (Desn 2°) y (Desn 3°); Total de linfocitos, (Desn 3°); Células no linfoides, (Desn 3°)

Cuadro 7. Subpoblaciones de linfocitos T (CD3+) en bazo de ratas Desn 2°, Desn 3° y BN a los 21 días de edad.
(% ± E.E.)

Subpoblación	BN	Desn 2°	Desn 3°
CD4+	53.8 ± 1.3	47.0 ± 3.2*	42.2 ± 5.5*
CD8+	36.9 ± 1.6	42.0 ± 4.1	44.8 ± 5.0
CD4+CD8+	5.3 ± 0.5	5.2 ± 0.8	5.8 ± 2.1
CD4 ⁻ CD8 ⁻	3.9 ± 1.4	5.9 ± 2.7	7.2 ± 2.5*

Los datos son presentados como promedio ± error estándar. *Diferencia estadística con las ratas BN ($p < 0.05$). # Diferencia estadística con las Desn 2° ($p < 0.05$).

Cuadro 8. Número de las subpoblaciones de linfocitos obtenidos de bazo de ratas desnutridas por competencia durante la lactancia (células x10⁶/mL)

Subpoblación de linfocitos	BN n= 10	Desn 2º n= 7	Desn 3º n= 7
T	69.7 ± 8.5	34.2 ± 4.7*	21.5 ± 3.7*#
B	39.9 ± 5.7	25.9 ± 4.6*	12.1 ± 2.1*
NK	6.8 ± 1.5	2.8 ± 0.5	2.4 ± 0.5
T-CD4	29.0 ± 3.8	14.3 ± 1.9*	5.7 ± 1.4*#
T-CD8	19.6 ± 2.5	13.4 ± 3.2	6.1 ± 1.2*
CD4+CD8+	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.6*	0.6 ± 0.3*#

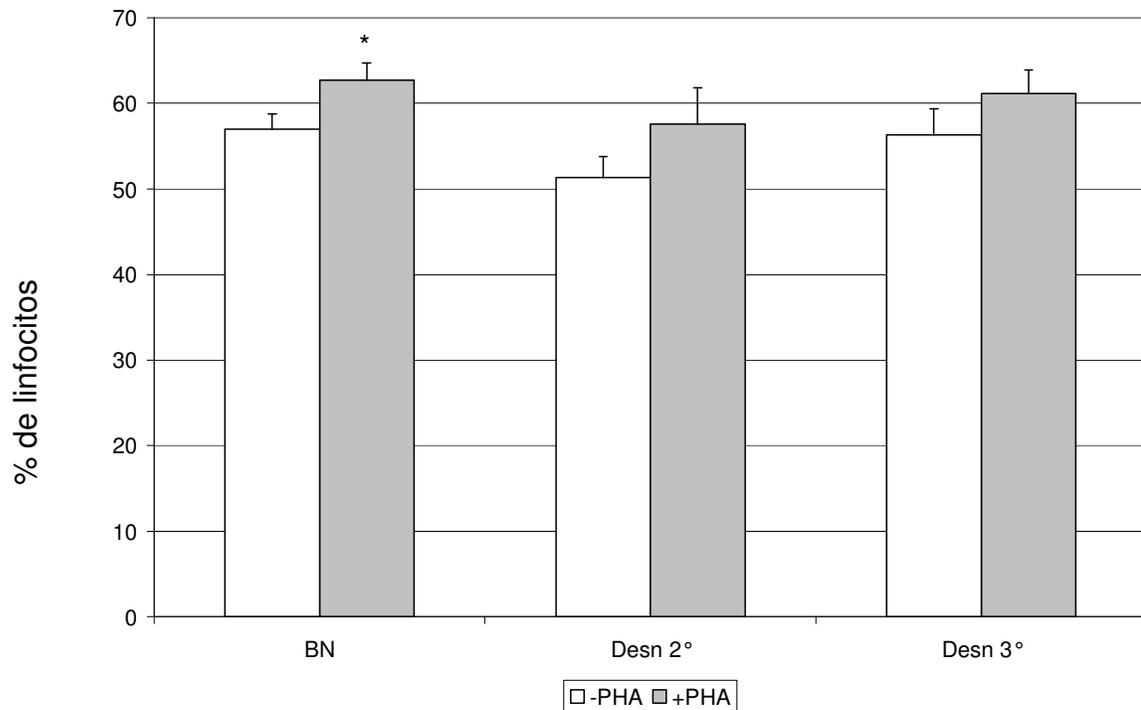
Los datos son el promedio ± error estándar. BN, bien nutrida, Desn, desnutridas de 2º o 3º grado. *Diferencia estadística con las ratas BN (p < 0.05). # Diferencia estadística con las Desn 2º.

VII.5. Activación de linfocitos de bazo en cultivo

La Gráfica 3 muestra el porcentaje de linfocitos T de células de bazo en cultivo, estimulados con PHA. Los linfocitos T estimulados de ratas testigo mostraron un comportamiento normal, puesto que se observó un incremento, lo que resulta de la proliferación, observando una diferencia significativa en los linfocitos T de cultivos estimulados con PHA y los controles negativos no estimulados. No se observó diferencia significativa en linfocitos estimulados y no estimulados entre los grupos de ratas BN y Desn. Sin embargo, se observó una ligera tendencia a incrementarse el porcentaje de linfocitos T en cultivos estimulados, tanto en ratas con desnutrición grave como en ratas con desnutrición moderada.

VII.5.1 Análisis de la proporción de célula que expresan de CD71+

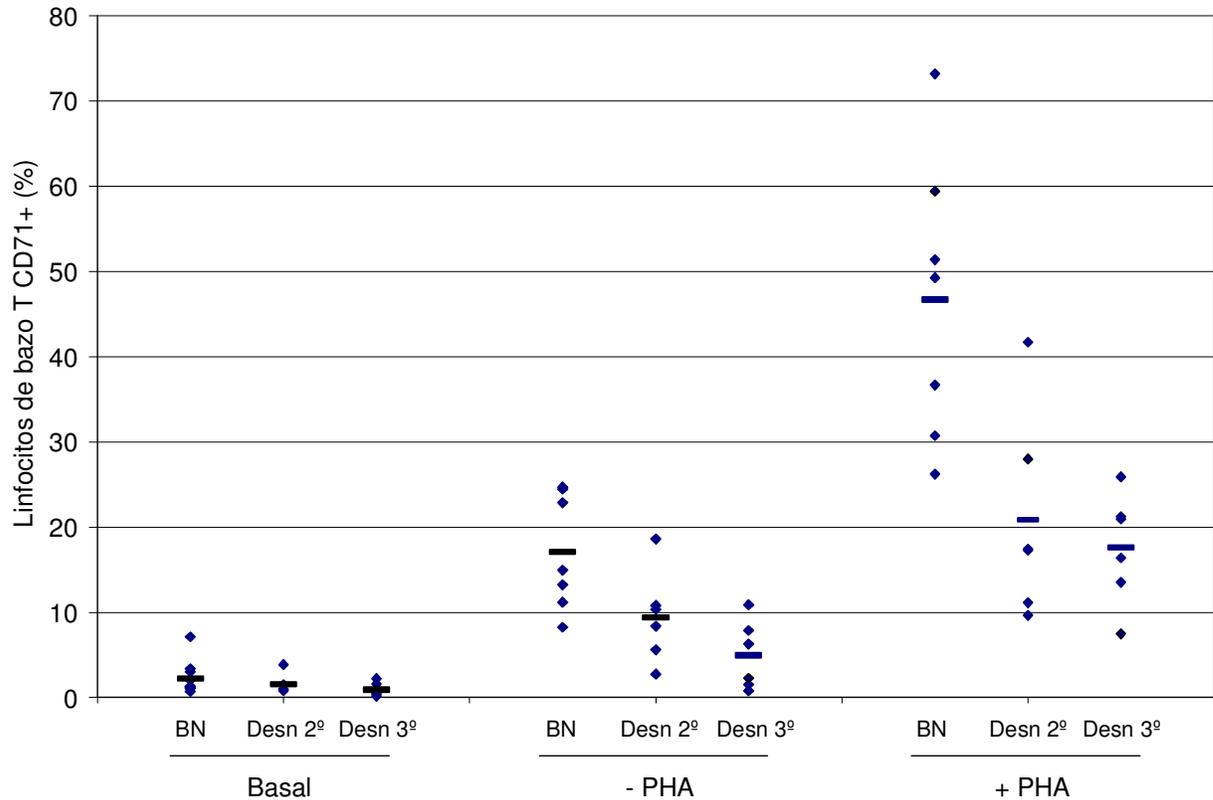
Los porcentajes de células activadas CD3+CD71+ se presenta en la Gráfica 4. No se observa diferencia entre los grupos para la subpoblación CD3+CD71+ recién obtenidos. La desnutrición afectó negativamente el incremento de la expresión de CD71+ en las células CD3+CD71+ cultivadas por 24h con o sin mitógeno (Gráfica 4). Después de la activación celular, el porcentaje promedio de CD3+ fue mayor en las ratas bien nutridas que en ambos grupos de ratas desnutridas (BN vs Desn 2°, $p < 0.05$; BN vs Desn3°). Además, se observó una correlación positiva entre el peso del bazo y el porcentaje de células que expresan el receptor CD71 ($R=0.97$).



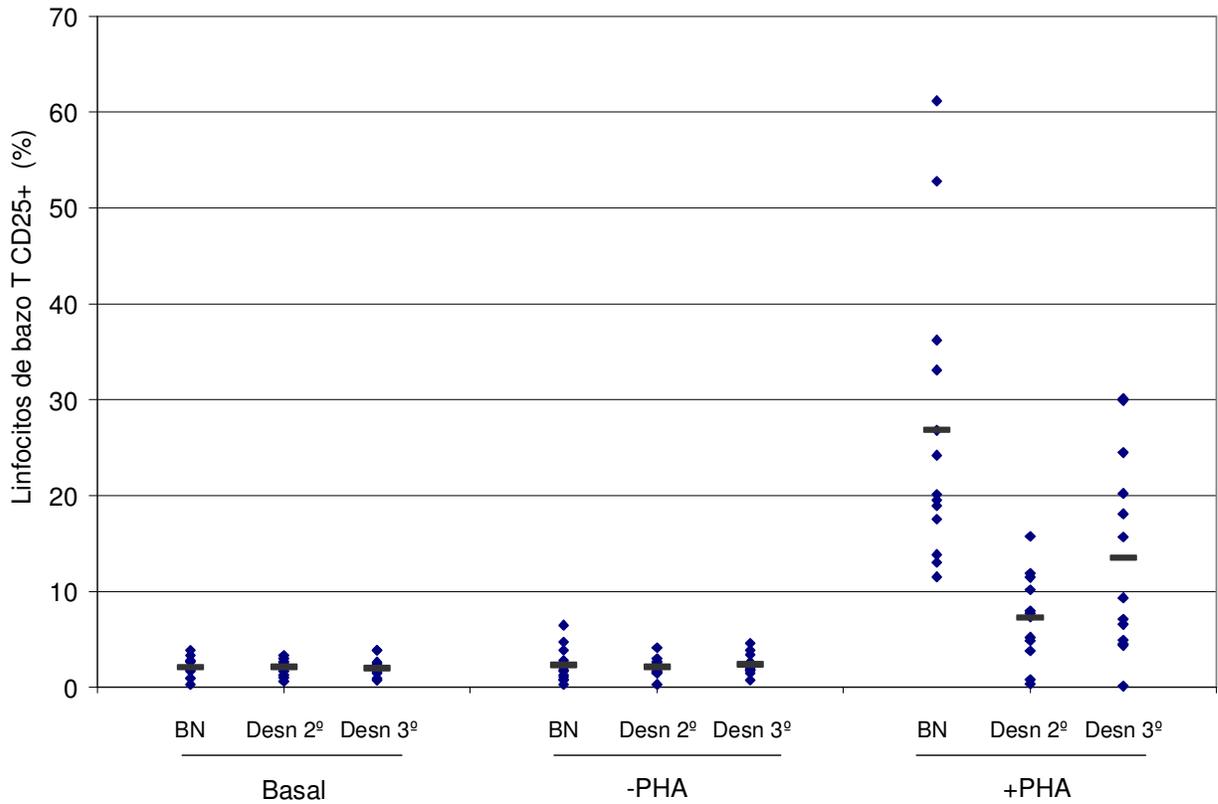
Gráfica 3. Porcentaje de linfocitos T obtenidos de bazo de ratas desnutridas por competencia en la lactancia, en cultivos sin estimular (-PHA) y estimulados (+PHA). Ratas bien nutridas (BN), desnutridas de segundo grado (Desn 2°) y de tercer grado (Desn 3°). Los valores son promedio \pm error estándar. * Diferencia estadística entre los cultivos sin estimular y estimulados en las ratas BN.

VII.5.2 Expresión de CD25+

Los porcentajes de linfocitos CD3+CD25+ se muestran en la Gráfica 5. El porcentaje de CD3+CD25+ aislados de bazo fue 2.1% en el grupo de ratas BN, 2.0 en Desn 2º y 2.0% en Desn 3º, no se observó diferencia significativa entre los grupos. Porcentajes semejantes se observaron en los cultivos por 24h sin PHA. Después de la activación in vitro con PHA, el incremento en células CD3+CD25+ fue menor en las ratas Desn. A pesar de que las ratas Desn 2º tuvieron el menor incremento de CD3+CD25+, no se observó diferencia entre Desn 2º y Desn 3º, probablemente debido a la gran variación dentro de los grupos. A diferencia de la expresión CD71+, no se observó correlación con el peso de bazo.



Gráfica 4. Activación *in vitro* de linfocitos CD3+CD71+ obtenidos del bazo de ratas desnutridas por competencia durante la lactancia de 21 días de edad, -PHA, testigo sin estimular; +PHA, estimulados, Basal, determinación justo antes de iniciar el cultivo. Diferencia estadística: Basal: BN>Desn 3º; -PHA: BN>Desn 2º; BN>Desn 3º; +PHA: BN>Desn 2º; BN>Desn 3º. Las células CD71+ se incrementaron significativamente en los tres grupos después de la estimulación *in vitro* con PHA. Cada punto representa un dato y las barras representan los promedios.



Gráfica 5. Porcentajes de linfocitos activados en condiciones: antes del cultivo (basal), en cultivo sin estimular (-PHA) y estimulados (+PHA) en cultivos de bazo de ratas BN, Desn 2° y Desn 3°. Linfocitos CD3+CD25+. No hubo diferencia entre los grupos en condiciones basales y -PHA. Los porcentajes de CD3+CD25+ incrementaron significativamente en ratas BN después de la activación in vitro con PHA.

VII.6. Proliferación de células de bazo in vivo

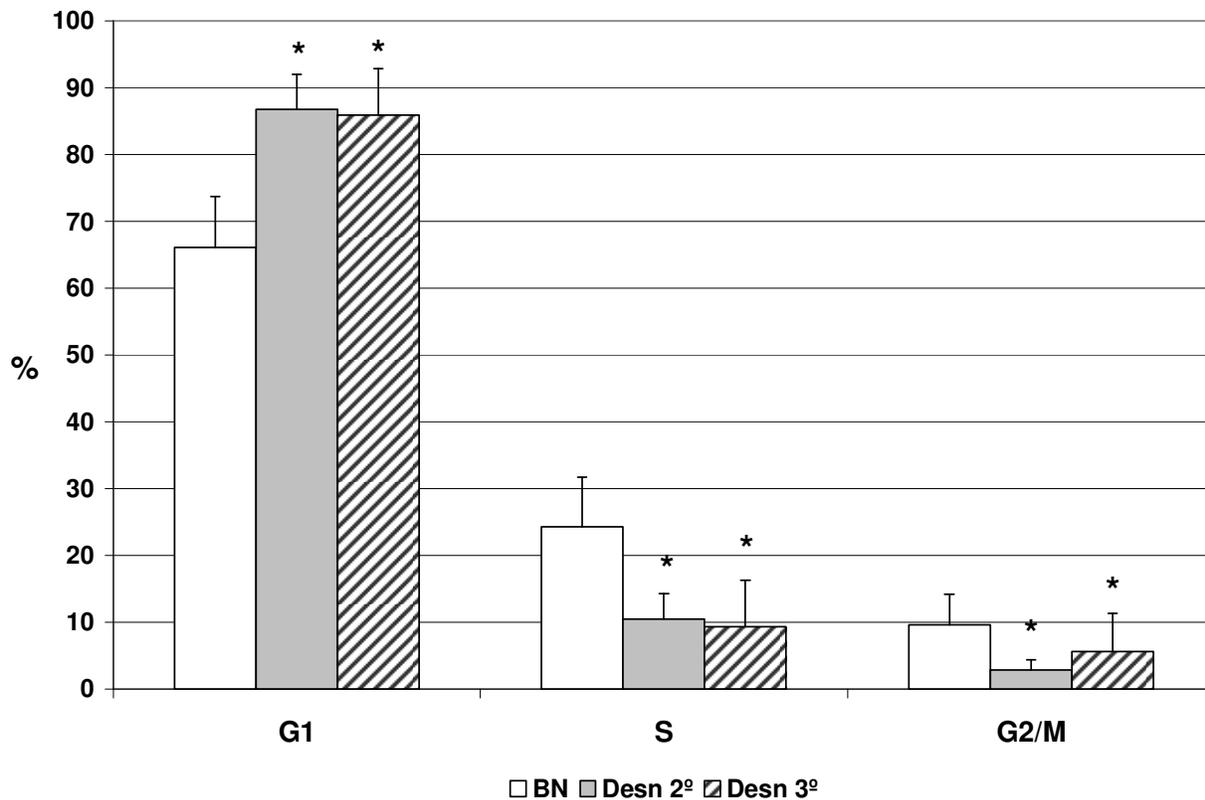
Se analizó el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo, usando como marcador el contenido de ADN, revelado por la fluorescencia de yoduro de propidio, intercalante del ADN (Figura 9 A y B). En la Gráfica 6 se muestra la distribución de las células en cada una de las fases del ciclo. La proporción de células en fase G₁ fue de 66.1 ± 7.6 en ratas BN, 86.8 ± 5.2 en DN2^o y 85.9 ± 7.0 , observándose diferencia significativa de ambos grupos de ratas desnutridas con respecto al de bien nutridas ($p < 0.05$). La proporción de fase S fue de 24.3 ± 7.4 en ratas BN, 10.5 ± 3.8 en DN2^o y 9.3 ± 7.0 , con una diferencia significativa entre ambos grupos de ratas desnutridas con relación al observado en las bien nutridas ($p < 0.05$). La fase G₂/M fue de 9.6 ± 4.6 en ratas BN, 2.8 ± 1.6 en DN2^o y 5.6 ± 5.7 en DN3^o, observándose diferencia significativa de ambos grupos de ratas desnutridas con el de BN (Gráfica 7).

En cuanto a la incorporación de BrdU, en las ratas bien nutridas se observa que incrementó a través del tiempo, lo que indica una activa proliferación. Sin embargo, a partir de las 2 horas de incorporación, se observa que las ratas desnutridas tienen una menor incorporación de BrdU, en comparación con las ratas BN, lo que está reflejando que la proliferación está disminuida (Gráfica 8).

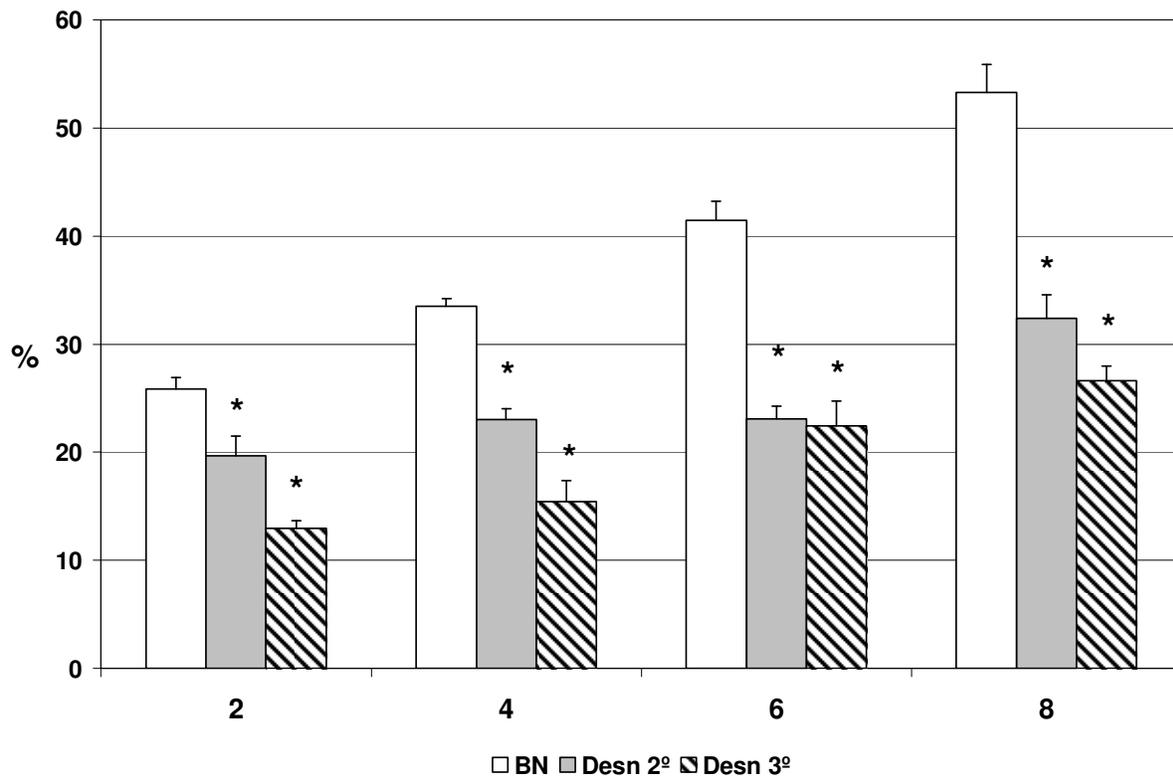
En la Gráfica 9 se muestra la distribución de células positivas a BrdU en cada una de las fases del ciclo. Se observa que en ambos grupos de ratas desnutridas hay menor porcentaje de células positivas a BrdU en todas las fases del ciclo. En las ratas

desnutridas moderadas se puede apreciar que a las 8 h, cambia un poco la distribución, puesto que se incrementa el porcentaje de células positivas en la fase S y disminuye en la fase G1.

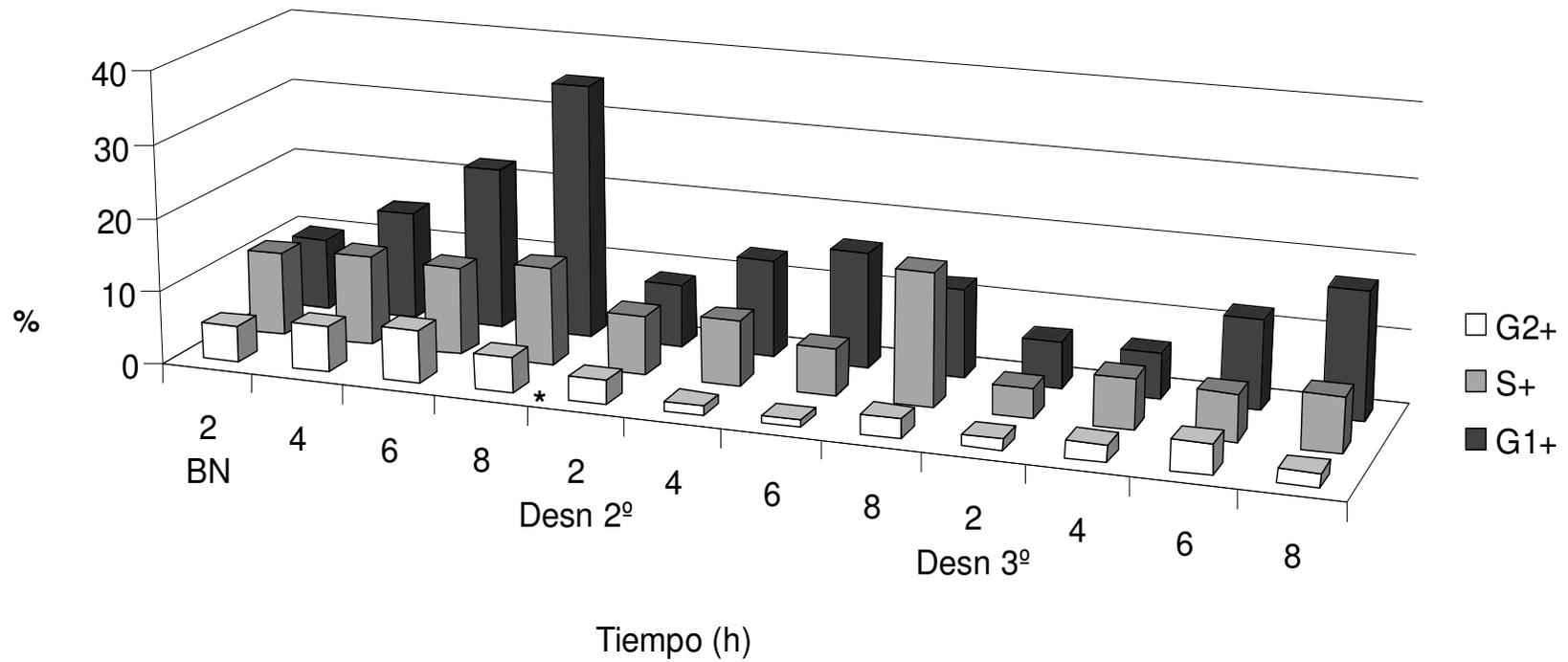
En la Gráfica 9 se muestran los valores de TS y Tpot. TS se define como el tiempo que dura la fase S; Tpot se define como el tiempo que tarda en duplicarse una población si no hay pérdida celular. Se observa que el TS es similar en los tres grupos de ratas, por lo que no se observa diferencia estadística, a pesar de observarse un ligero incremento en el TS de las ratas Desn 3^o (BN: 12.0 ± 1.5 ; Desn 2^o: 12.2 ± 1.4 ; Desn 3^o: 15 ± 2.8).



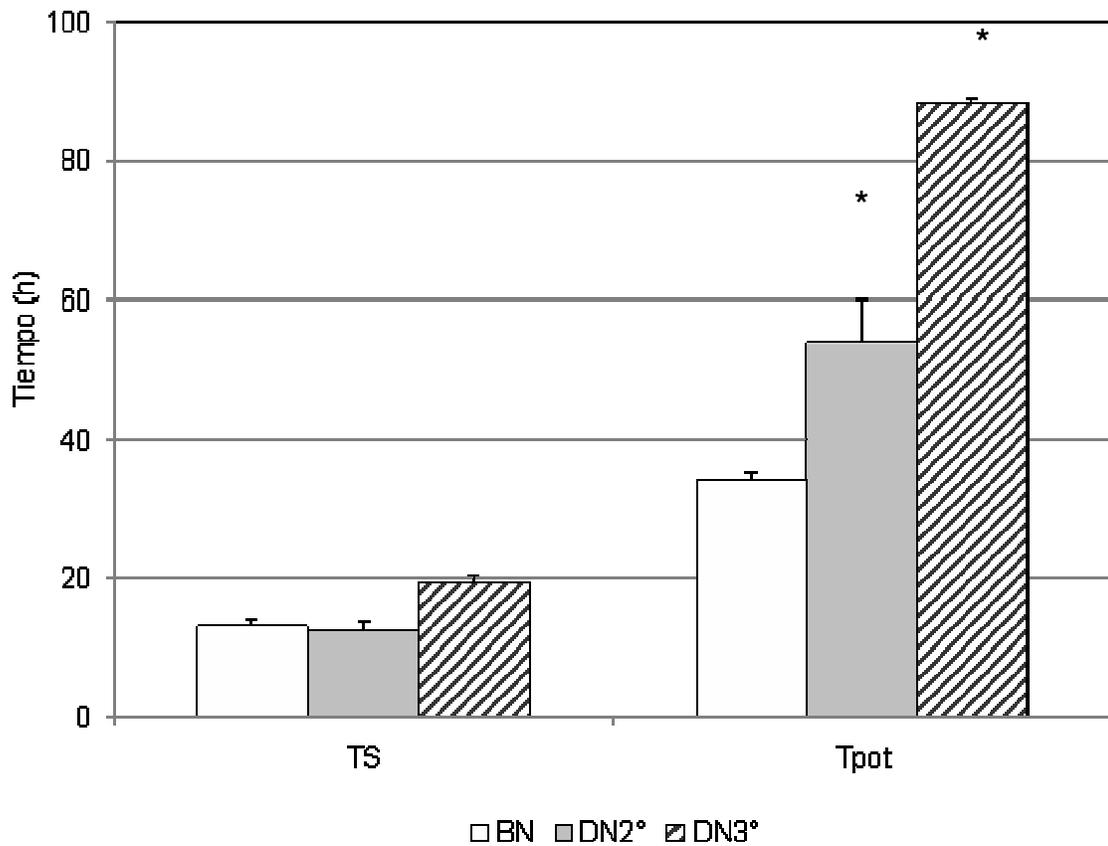
Gráfica 6. Distribución de células de bazo de ratas bien nutridas, desnutridas de segundo y de tercer grado en fases del ciclo celular identificadas por contenido de ADN. Se observa que ambos grupos de ratas desnutridas tienen un porcentaje significativamente menor de células en las fases S y G2/M en comparación con las ratas bien nutridas ($p < 0.05$).



Gráfica 7. Índice de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) in vivo en células de bazo de ratas bien nutridas (BN) y desnutridas (Desn) de 2º y 3º grado a las 2, 4, 6 y 8 horas. El índice de incorporación se refiere al porcentaje de células que incorporaron BrdU. Se grafican los promedios y errores estándar. Los resultados mostraron que la incorporación de BrdU fue menor en ambos grupos de ratas desnutridas en cada tiempo ($p < 0.05$).



Gráfica 8. Distribución en cada fase del ciclo de las células que incorporaron BrdU in vivo en células de bazo de ratas bien nutridas (BN) y desnutridas (Desn) de 2º y 3º grado a las 2, 4, 6 y 8 horas.



Gráfica 9. Se muestran los valores de TS y Tpot. TS es definido como el tiempo que dura la fase S; Tpot es definido como el tiempo que tarda en duplicarse una población si no hay pérdida celular. Los resultados muestran que el TS es similar en todos los grupos de ratas. Se observó que el Tpot fue significativamente mayor en ambos grupos de ratas desnutridas en comparación con el grupo de ratas bien nutridas ($p < 0.05$).

VIII.DISCUSIÓN

La desnutrición provoca vulnerabilidad de los organismos ante las infecciones y éstas repercuten en su estado nutricional, convirtiéndose en un círculo vicioso (Chandra, 1999). La mayoría de los estudios experimentales sobre la desnutrición se han realizado con animales adultos, mientras que en este trabajo se estudiaron ratas lactantes, edad muy vulnerable a los efectos de la desnutrición. Se ha demostrado la importancia de este periodo, las deficiencias nutricionales durante esta etapa causan efectos más graves y sus secuelas son permanentes. Las alteraciones son más trascendentes que las observadas cuando la desnutrición se presenta en edad adulta (Boule, y cols., 2003). En nuestro grupo de trabajo se ha establecido el método de inducción de la desnutrición durante el periodo de lactancia en ratas, ya que esta edad es semejante al periodo en el que se presenta con mayor frecuencia la desnutrición en niños (Ortiz y Betancourt, 1984; Ortiz, y cols., 1996). Además, es interesante mencionar que las ratas desnutridas por competencia de alimento durante la lactancia muestran varios síntomas similares a las características clínicas observadas en los niños desnutridos. Por ello, se propone que el modelo simula las condiciones de la desnutrición en la infancia (Ortiz y cols, 2009).

La concentración de proteínas en suero es otro indicador reportado en la desnutrición en trabajos anteriores (Ortiz, 1987; Waterlow, y cols., 1960). Los datos obtenidos en este trabajo confirman las observaciones publicadas antes, y además los resultados mostraron que se afecta de manera importante en la desnutrición moderada.

La leptina es una hormona generada principalmente por el tejido adiposo que regula el peso corporal (Frederich, y cols., 1995a; Frederich, y cols., 1995b). Los niveles de leptina también se observaron disminuidos en ambos grupos de ratas desnutridas, lo cual debe estar directamente relacionado a la cantidad de tejido adiposo. También se observó que la cantidad de leptina se relacionó con el nivel de desnutrición, observándose que en la desnutrición grave hay el menor nivel de esta hormona. En niños desnutridos se ha observado que la concentración de leptina se encuentra en concentraciones bajas (Soliman, y cols., 2000). Diversas evidencias indican que la leptina es capaz de modular la respuesta inmunológica y la deficiencia de esta hormona está estrechamente asociada con una respuesta inmunológica alterada (Fantuzzi y Faggioni, 2000; Lord, y cols., 1998; Mito, y cols., 2004). Cabe recordar que la leptina tiene parecido con citocinas y el receptor tiene semejanza con la familia de receptores de citocinas gp130 (Ahima y Osei, 2004; White, y cols., 1997); (Lam y Lu, 2007; Rosenblum, y cols., 1996).

El mecanismo propuesto por el cual la leptina regula el sistema inmunológico es que al unirse al receptor en las células de tejidos hematopoyéticos induce una serie de señales que estimulan la proliferación de células troncales e incrementa el número de colonias linfoideas, mieloides y eritroides (Bennett, y cols., 1996). En este estudio, al relacionar los bajos niveles de leptina con los datos obtenidos en los linfocitos de sangre y bazo, se observa una estrecha relación entre la concentración de leptina y las proporciones disminuídas de linfocitos CD4+, así como el número de linfocitos.

VIII.1. Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica

El número y la proporción de leucocitos en la sangre periférica la distribución en leucocitos en el cuerpo y estado general del sistema inmunológico (Dhabhar, y cols., 1995). Si se encuentran alteradas, entonces es probable que exista un desequilibrio en el funcionamiento de este sistema.

En este trabajo, el número de leucocitos en ratas bien nutridas se determinó que es entre 2.2×10^6 / 6.6×10^6 células por mL de sangre. Parece que hasta ahora no se habían reportado valores para ratas de 21 días de edad, por lo que no se tiene una referencia para comparar los datos obtenidos. En ratas adultas oscilan entre 4×10^6 /mL y 12×10^6 /mL (Ruiz y Fuentes, 1996). El número de leucocitos de ratas con desnutrición moderada y grave disminuyó claramente comparado con las ratas bien nutridas, teniendo los valores más bajos las ratas con desnutrición grave. Lo anterior refleja alteraciones en la producción, maduración y distribución de los leucocitos debido quizá, a la reducción de la proliferación celular en la médula ósea. En trabajos realizados en médula ósea se observó que la proliferación se encuentra disminuida (Betancourt, y cols., 1992), así mismo se percibió un aumento en el tiempo de generación de ciclo en células de la médula ósea de ratas desnutridas (Betancourt, y cols., 1992; Gómez, y cols., 1996).

Los resultados del presente estudio se muestran en forma clara que los linfocitos T se encuentran disminuidos en ambos grupos de ratas desnutridas, mientras que los linfocitos B no se alteraron claramente. Además de la proporción de linfocitos,

también se afecta su concentración, siendo los linfocitos T la subpoblación más afectada. En otros trabajos se ha observado también que la desnutrición afecta el porcentaje de linfocitos (Feledi, y cols., 1993; Mainali y McMurray, 1998; Ortiz, y cols., 1999). Por otro lado, Fló y cols (1993) observaron que la desnutrición en ratas inducida durante la lactancia disminuye el porcentaje de linfocitos CD4+ y CD8+ en tejidos linfoides asociados al intestino.

La disminución en el porcentaje y número de linfocitos T en sangre periférica, muy probablemente sea reflejo del deficiente funcionamiento del timo, debido a que se ha reportado que la desnutrición atrofia el timo (Chandra, 1991b; Ortiz, y cols., 2001; Slobodianik, y cols., 1989). El timo es el lugar donde se lleva a cabo la maduración de los linfocitos T, por lo cual es fundamental para la inmunidad adquirida, papel importante de los linfocitos T (Ortiz, y cols., 2000). En un estudio efectuado en timo, se demostró que la atrofia observada en ratas con desnutrición grave inducida durante la lactancia, se asocia con el incremento de apoptosis espontánea (Ortiz, y cols., 2001). Resultados publicados recientemente por nuestro grupo de trabajo, muestran que el incremento en la apoptosis en timo de ratas desnutridas de 21 días de edad, se encuentra asociado con los timocitos dobles negativos (CD4-CD8-), lo que parece indicar que la desnutrición afecta la diferenciación temprana de los linfocitos en timo. Así mismo, se observaron incrementos en las frecuencias de apoptosis en los timocitos CD4+ y CD8+ (Ortiz, y cols., 2009).

Con relación a los resultados del presente trabajo, es relevante mencionar que se

observaron alteraciones importantes en el grupo de ratas desnutridas de segundo grado, indicando que ellas también pueden ser muy vulnerables. Existen algunos estudios, en los que se hace mención de que la desnutrición leve (primer grado) y moderada (segundo grado), contribuyen a un funcionamiento deficiente del sistema inmunológico (Rice, y cols., 2000). Entonces, si la desnutrición transcurre hasta alcanzar el nivel de moderada, se supondría que el organismo estaría más susceptible a enfermedades, lo cual agravaría la desnutrición, convirtiéndose en un círculo perjudicial para el organismo (Chandra, 1999).

No obstante, parece ser que este es el primer estudio en modelos experimentales de animales jóvenes (durante la lactancia) que enfoca a los niveles moderado y grave de la desnutrición, analizando las proporciones y número de linfocitos en sangre periférica. Algunos autores han informado que, en ratas con desnutrición grave durante la lactancia, se presentan alteraciones en las proporciones de linfocitos T y B en mucosa intestinal (Feledi, y cols., 1993; Flo, y cols., 1993). Otros trabajos realizados en ratones desnutridos después de la lactancia, han sugerido que un desequilibrio en las subpoblaciones de linfocitos T, pueden contribuir a la inmunodepresión (ten Bruggencate, y cols., 2001).

VIII.2. Subpoblaciones de linfocitos en bazo

Estudios previos en animales adultos mostraron que el número de linfocitos en bazo disminuye durante la restricción calórica (Cunha, y cols., 2003). En 1991, Chandra reportó que hay una pérdida de células linfoides alrededor de las arteriolas (Chandra,

1991c). Se han observado resultados similares en modelos animales con baja ingesta de proteínas y dietas deficientes en micronutrientes, como zinc, cobre o vitaminas (Bala, y cols., 1991; Zhao y Ross, 1995). A diferencia de los estudios antes mencionados, en este trabajo se evaluó la disminución de ingesta de todos los nutrientes durante el periodo de la lactancia.

Los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T y B de las ratas bien nutridas son semejantes a los que han sido referidos por otros autores en ratas adultas (Robinson, y cols., 2002).

La disminución de linfocitos en bazo de ratas desnutridas reforzaría lo propuesto para las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica, en donde se propone que se está reflejando la función disminuida de la médula ósea en la producción celular (Betancourt, y cols., 1992; Gómez, y cols., 1996), así como el funcionamiento deficiente del timo (Ortiz, y cols., 2009; Ortiz, y cols., 2001).

VIII.3. Activación de linfocitos de bazo en cultivo

La especificidad de la respuesta inmunológica está determinada por la interacción entre el receptor de linfocitos y el antígeno. Ya que, con esta interacción, el linfocito se activa, iniciando la síntesis de Interleucina 2 (IL-2), de la cadena α del receptor de alta afinidad para la IL-2 (CD25), y su entrada al ciclo celular (Szamel y Resch, 1995). La activación de los linfocitos en respuesta a un mitógeno ha sido una herramienta muy útil para valorar, bien que indirectamente, el funcionamiento del

sistema inmunológico, aunque sólo determina la capacidad para responder ante un antígeno solo. La aparición de la cadena α del receptor de interleucina-2 (CD25), se presenta cuando el linfocito recibe un estímulo. Además, la del receptor de transferrina, CD71, representa el estado de actividad metabólica en la célula (Neckers y Cossman, 1983; Pighetti, y cols., 1998). Esto hace de CD25 y CD71 se consideran dos buenos marcadores para determinar la activación de linfocitos en respuesta a un mitógeno.

Los datos mostrados en este trabajo muestran la población de los linfocitos CD3+CD71+ en ratas con desnutrición moderada y grave después de 24 horas de cultivo es menor que la de los testigos.

Los resultados de la activación de células de bazo en cultivo, muestran una tendencia de los linfocitos de ratas con desnutrición moderada y grave a activarse menos que los de las bien nutridas, el incremento de linfocitos T-CD25+ de los cultivos con PHA, es menor. La cantidad tan baja de células CD71+ y CD25+ en ambos grupos de ratas desnutridas indica una activación deficiente. Si la expresión de CD25 se encuentra disminuida, también nos está hablando de una menor capacidad de proliferación de los linfocitos, que limita su respuesta ante un antígeno (Feledi, y cols., 1993). Aunque no fue el propósito de este trabajo evaluar la proliferación en cultivos, los porcentajes de linfocitos T en cultivos estimulados de ratas desnutridas indica que la proliferación fue baja. Posteriormente podría estudiarse la proliferación de los linfocitos ante un estímulo.

Bossuyt y colaboradores (2001) observaron que en ratones con dieta pobre en proteínas observaron una respuesta similar a la encontrada en este trabajo. Por otro lado, en un estudio realizado en ratas desnutridas, en cual se evaluó la relación del sistema central de noradrenalina con el sistema inmunológico, también se observó una respuesta disminuída de los linfocitos al mitógeno concanavalina A, en el que se observó menor proliferación (Bossuyt, y cols., 2001; Schlesinger, y cols., 1995). Otros trabajos, en los que evaluaron la respuesta in vivo a tuberculosis pulmonar en conejillos de indias con desnutrición proteica observaron menor respuesta proliferativa de los linfocitos (Dai y McMurray, 1998; McMurray y Bartow, 1992). Aunque estos modelos mencionados tienen otras condiciones y cada uno evalúa aspectos diferentes, apoyan el hecho de que la desnutrición disminuye la respuesta a mitógenos.

Nájera y cols, en linfocitos provenientes de niños desnutridos (2001), evaluaron otro marcador de activación de linfocitos, CD69, en respuesta al mitógeno PHA, para activar linfocitos T y Pokweed para activar los linfocitos B; en ese trabajo se encontró que los linfocitos CD4+ de niños desnutridos tuvieron respuesta disminuida al estímulo, comparándolo tanto con niños bien nutridos como con los de bien nutridos infectados. Además, Rodríguez y cols (2005) demostraron que los linfocitos que expresan CD69 y CD25 no se incrementaron en respuesta al estímulo de acetato de forbol-miristato (activador de la proteína cinasa C). Asimismo, observaron alteraciones en la producción de citocinas por células CD4+ y CD8+ en respuesta al estímulo disminuyó, encontrándose también que las células productoras de citocinas

TH1 (IL-2 e INF- γ) estaban disminuidas y que las productoras de citocinas TH2 se incrementaban (IL-4 e IL-10), por lo que se propone que la desnutrición altera el balance de las respuestas inmunológicas de tipo 1 y tipo 2

Sobre los datos obtenidos en este trabajo, hay que señalar puntualmente que, el no encontrar diferencia en la activación entre los linfocitos de ratas con desnutrición moderada y grave, señala que la desnutrición moderada representa tanto riesgo como la grave al impedir la respuesta inmunológica adecuada del organismo desnutrido moderado a enfermedades infecciosas.

VIII.4. Proliferación in vivo de linfocitos de bazo

Winick y Noble (1966), reportaron que la desnutrición durante la lactancia afecta el crecimiento del bazo, y que esta disminución se observa aún después de tiempo de recuperación nutricional y hasta la edad de 133 días. Nuestros resultados confirman que la desnutrición grave disminuye la proliferación de células de bazo en ratas desnutridas por competencia durante la lactancia (del nacimiento a los 21 días de edad). En las ratas que desarrollaron desnutrición moderada se observó también una incorporación de BrdU menor que podría estar indicando que: a) hay menos células en proliferación; b) el tiempo del ciclo celular es mayor.

En trabajos realizados en médula ósea, se observó que la proliferación de las células provenientes de ratas desnutridas se hace más lento que el de las ratas bien nutridas, así como hay un menor porcentaje de células en proliferación activa

(Betancourt, y cols., 1992; Gómez, y cols., 1996; Ortiz y Betancourt, 1984). Gómez y cols. (1996) observaron un tiempo de ciclo prolongado en ratas desnutridas, en donde la fases G1+1/2M se más sensibles a la desnutrición y mientras que no se encontró diferencia en las fases S y la G2+1/2M, y se propone que la desnutrición dificulta a las células completar la fase G1, lo que estaría relacionado con la deficiencia de nutrimentos esenciales requeridos para la síntesis de proteínas necesarias para actividades específicas de G1 y la progresión (Murray, y cols., 1991).

En este estudio se observó que el tiempo de duplicación de la población (T_{pot}), es menor en los testigos BN que en ambos grupos de ratas desnutridas, lo cual puede ser a consecuencia de un ciclo celular prolongado. Al no observar cambios en el tiempo de la fase S, se estaría apoyando que también en el bazo, la fase alterada del ciclo es la G1.

Por otro lado, en otro estudio realizado para evaluar el daño al ADN en células de tejidos linfoides de ratas desnutridas, se observó que la desnutrición está asociada con el incremento en el daño al ADN en bazo, médula ósea y linfocitos de sangre, lo que estaría relacionado con la pérdida de la capacidad para reparar el daño (Cortés, y cols., 2001). El ciclo celular tiene puntos de restricción que evalúan la integridad del ADN y si este se encuentra dañado, la célula no puede proseguir en el ciclo (Elledge, 1996; Kuerbitz, y cols., 1992).

Visión general de los resultados

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la desnutrición moderada y grave tiene los siguientes efectos:

- Disminución de la concentración de proteínas y leptina en sangre.
- Disminución en el número de linfocitos y del porcentaje de linfocitos CD3+CD4+ en sangre y bazo, lo que puede reflejar las alteraciones en médula ósea y timo para la producción y maduración de linfocitos.
- La activación disminuída de los linfocitos T in vitro.
- Baja la proliferación de células de bazo in vivo. Un incremento del tiempo de duplicación de la población y sin modificación en el tiempo de la fase S, lo que indica un efecto en la fase G1.

Los efectos de estas alteraciones en suma, disminuirían de manera importante la respuesta del sistema inmunológico ante el reto de una infección. El esquema de la figura 14 muestra las repercusiones.

Además, como aportación importante de este trabajo, se demuestra que la desnutrición moderada representa tanto riesgo como la grave.

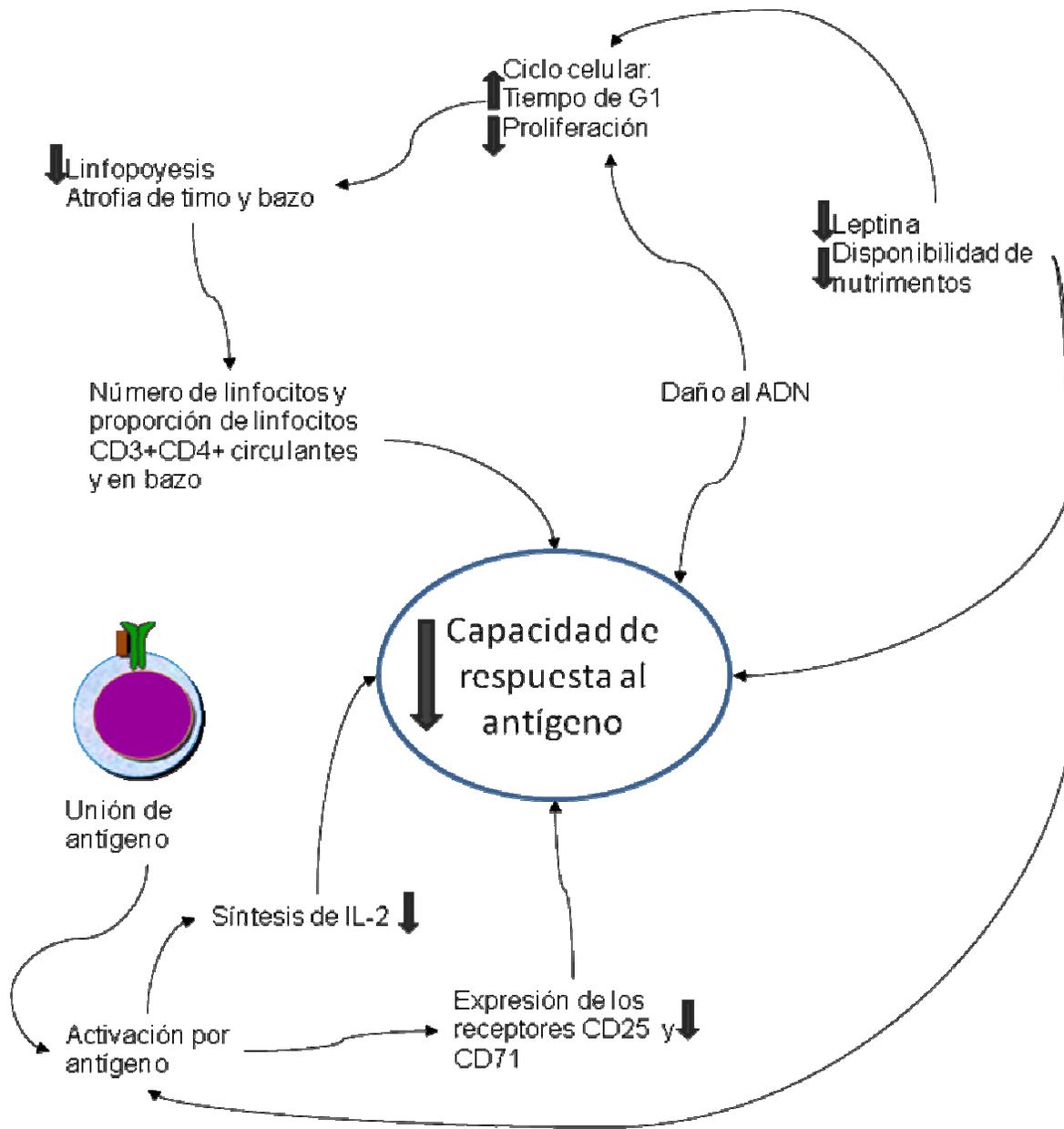


Figura 14. Esquema en la que se resume las repercusiones de la desnutrición moderada y grave sobre los componentes del sistema inmunológico y la respuesta al antígeno.

IX. CONCLUSIONES.

Las ratas con desnutrición grave por competencia en la lactancia de 21 días de edad presentan un número menor de leucocitos, principalmente de linfocitos y monocitos que los testigos normales de la misma edad., así como concentraciones disminuídas de proteínas y leptina en sangre periférica.

La desnutrición, tanto en el nivel moderado como en el grave, afecta las subpoblaciones de linfocitos en sangre y bazo, observándose una disminución en los linfocitos T y de estos a los T4 principalmente.

La activación de linfocitos de bazo en respuesta a PHA, disminuye en la desnutrición moderada y grave, lo que provoca que la funcionalidad de estas células se afecte.

La desnutrición moderada y grave afecta de manera similar e importante a la proliferación de células de bazo, lo cual se ve reflejado en una proporción mayor de células en fase G1 y menor en S y G2, así como un mayor tiempo de duplicación de la población. Esto vuelve a indicar que la fase G1 es la que está siendo afectada por la desnutrición.

Como conclusión general, la desnutrición moderada tiene efectos tan importantes como la desnutrición grave en el sistema inmunológico. Los datos pueden explicar, en parte, la susceptibilidad a infección asociada con la desnutrición.

X. PERSPECTIVAS

El hallazgo interesante en este estudio es que la desnutrición moderada altera de manera negativa la activación *in vitro* de los linfocitos T. Aún queda por confirmar cuál subpoblación de linfocitos T es la que se afecta, CD4+ o CD8+. Además, debe evaluarse la capacidad proliferativa de los linfocitos en respuesta al estímulo.

El estudio del efecto de la leptina en la activación *in vitro* en linfocitos de ratas desnutridas experimentalmente ayudará a complementar lo que se ha observado en niños desnutridos, con la ventaja de que se elimina el factor de las infecciones presentes en los niños.

Por otro lado, implementar un modelo *in vivo* para estudiar la respuesta de los linfocitos al antígeno contribuiría a dilucidar los mecanismos involucrados en la respuesta inmunológica y el ciclo celular.

Además, la continuación de los estudios de la proliferación *in vivo* permitirá determinar la duración de la fase G1. También se abre la posibilidad de evaluar si las subpoblaciones de células de tejidos linfoides tienen diferencias en el ciclo celular y cómo se controla durante la desnutrición.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. y Pober, J. S. 1999. Inmunología celular y molecular. Interamericana/McGraw-Hill. Madrid. pp.

Ahima, R. S. y Osei, S. Y. 2004. Leptin signaling. *Physiol Behav*, 81:223-41.

Ashraf, M. T. y Khan, R. H. 2003. Mitogenic lectins. *Med Sci Monit*, 9:RA265-9.

Asseman, C. y von Herrath, M. 2002. About CD4pos CD25pos regulatory cells. *Autoimmun Rev*, 1:190-7.

Azuma, M. 2006. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodont Res*, 41:361-373.

Bala, S., Failla, M. L. y Lunney, J. K. 1991. Alterations in splenic lymphoid cell subsets and activation antigens in copper-deficient rats. *J Nutr*, 121:745-53.

Balomenos, D. y Martinez, A. C. 2000. Cell-cycle regulation in immunity, tolerance and autoimmunity. *Immunol Today*, 21:551-5.

Barbier, M., Cherbut, C., Aube, A. C., Blottiere, H. M. y Galniche, J. P. 1998. Elevated plasma leptin concentrations in early stages of experimental intestinal inflammation in rats. *Gut*, 43:783-90.

Barone, K. S., O'Brien, P. C. y Stevenson, J. R. 1993. Characterization and

mechanisms of thymic atrophy in protein-malnourished mice: role of corticosterone. *Cell Immunol*, 148:226-33.

Barrera-Ramírez, L. M., Drago-Serrano, M. E., Pérez-Ramos, J., Zamora, A. C., Gómez-Arroyo, F., Sáenz-Espuñes, T. R. y Mendoza-Pérez, F. 2004. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Ins Nal Enf Res Mex*, 17:42-55.

Barten, M. J., Gummert, J. F., van Gelder, T., Shorthouse, R. y Morris, R. E. 2001. Flow cytometric quantitation of calcium-dependent and -independent mitogen-stimulation of T cell functions in whole blood: inhibition by immunosuppressive drugs in vitro. *J Immunol Methods*, 253:95-112.

Batista, A., Millan, J., Mittelbrunn, M., Sanchez-Madrid, F. y Alonso, M. A. 2004. Recruitment of transferrin receptor to immunological synapse in response to TCR engagement. *J Immunol*, 172:6709-14.

Baumans, V. 2004. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Ther*, 11 Suppl 1:S64-6.

Baumgarth, N. y Roederer, M. 2000. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods*, 243:77-97.

Begg, A. C., McNally, N. J., Shrieve, D. C. y Karcher, H. 1985. A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample.

Cytometry, 6:620-6.

Bennett, B. D., Solar, G. P., Yuan, J. Q., Mathias, J., Thomas, G. R. y Matthews, W. 1996. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol*, 6:1170-80.

Betancourt, M., González, C., Ortiz, R., Zumano, E., Siller, N., Espinoza, M. y Romero, R. 1995. Peripheral lymphocyte subpoblation in children with severe malnutririon. *Med Sci Res*, 23:405-406.

Betancourt, M., Ortiz, R. y González, C. 1992. Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation. *Mutat Res*, 283:173-7.

Billadeau, D. D., Nolz, J. C. y Gomez, T. S. 2007. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nature Reviews Immunology*, 7:131-143.

Black, R. E., Morris, S. S. y Bryce, J. 2003. Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet*, 361:2226-34.

Borelli, P., Blatt, S., Pereira, J., de Maurino, B. B., Tsujita, M., de Souza, A. C., Xavier, J. G. y Fock, R. A. 2007. Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. *Br J Nutr*, 97:307-14.

Bossuyt, P. J., Rector, E. S. y Taylor, C. G. 2001. Dietrary zinc deficiency and protein-energy malnutrition decrease in vitro murine T lymphocytes cell cycle. *J Nutr*

Immunol, 5:71-84.

Boule, N. G., Tremblay, A., Gonzalez-Barranco, J., Aguilar-Salinas, C. A., Lopez-Alvarenga, J. C., Despres, J. P., Bouchard, C., Gomez-Perez, F. J., Castillo-Martinez, L. y Rios-Torres, J. M. 2003. Insulin resistance and abdominal adiposity in young men with documented malnutrition during the first year of life. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27:598-604.

Brown, M. y Wittwer, C. 2000. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*, 46:1221-9.

Cahalan, M. D. y Chandy, K. G. 1997. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr Opin Biotechnol*, 8:749-56.

Calonge, T. M. y O'Connell, M. J. 2008. Turning off the G2 DNA damage checkpoint. *DNA Repair (Amst)*, 7:136-40.

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

Cantrell, D. A. y Smith, K. A. 1983. Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth. *J Exp Med*, 158:1895-911.

Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., Canaris, A. D., De Francesco, M. A., Fiorentini, S., Peroni, L., Fallacara, F., Dima, F., Balsari, A. y Turano, A. 1997. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell

proliferation. *Cytometry*, 27:71-6.

Chandra, R. K. 1991a. 1990 McCollum Award lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr*, 53:1087-101.

Chandra, R. K. 1991b. Immunocompetence is a sensitive and functional barometer of nutritional status. *Acta Paediatr Scand Suppl*, 374:129-32.

Chandra, R. K. 1991c. Interactions between early nutrition and the immune system. *Ciba Found Symp*, 156:77-89; discussion 89-92.

Chandra, R. K. 1999. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proc Nutr Soc*, 58:681-3.

Chandra, R. K., Gupta, S. y Singh, H. 1982. Inducer and suppressor T cell subsets in protein energy malnutrition. Analysis by monoclonal antibodies. *Nutr Res*, 2:21-26.

Chilson, O. P., Boylston, A. W. y Crumpton, M. J. 1984. Phaseolus vulgaris phytohaemagglutinin (PHA) binds to the human T lymphocyte antigen receptor. *Embo J*, 3:3239-45.

Chilson, O. P. y Kelly-Chilson, A. E. 1989. Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. *Eur J Immunol*, 19:389-96.

Cormack, D. H. 1987. en *Histología de HAM*. Harla. México.

Cortés, E., González, C., Betancourt, M. y Ortiz, R. 2001. Assessment of DNA

damage in spleen, bone marrow, and peripheral blood from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay. *Teratog Carcinog Mutagen*, 21:231-47.

Cravioto, J. y Arrieta, R. 1985. *Nutrición, desarrollo mental, conducta y aprendizaje*. Ed. INCYTAS-DIF. México. 191 pp.

Cunha, W. D., Friedler, G., Vaisberg, M., Egami, M. I. y Costa Rosa, L. F. 2003. Immunosuppression in undernourished rats: the effect of glutamine supplementation. *Clin Nutr*, 22:453-7.

Cyster, J. G. 1999. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*, 286:2098-102.

Cyster, J. G. 2000. Leukocyte migration: scent of the T zone. *Curr Biol*, 10:R30-3.

Dai, G. y McMurray, D. N. 1998. Altered cytokine production and impaired antimycobacterial immunity in protein-malnourished guinea pigs. *Infect Immun*, 66:3562-8.

Dallongeville, J., Fruchart, J. C. y Auwerx, J. 1998. Leptin, a pleiotropic hormone: physiology, pharmacology, and strategies for discovery of leptin modulators. *J Med Chem*, 41:5337-52.

Darzynkiewicz, Z. 1994. *Flow Cytometry*. Academic Press. San Diego.

Darzynkiewicz, Z., Crissman, H. y Jacobberger, J. W. 2004. *Cytometry of the cell*

cycle: cycling through history. *Cytometry A*, 58:21-32.

Darzynkiewicz, Z. y Huang, X. 2004. Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 5:Unit 5 7.

de Onis, M. 2000. Measuring nutritional status in relation to mortality. *Bull World Health Organ*, 78:1271-4.

de Onis, M., Blossner, M., Borghi, E., Frongillo, E. A. y Morris, R. 2004. Estimates of global prevalence of childhood underweight in 1990 and 2015. *Jama*, 291:2600-6.

de Onis, M., Monteiro, C., Akre, J. y Glugston, G. 1993. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global Database on Child Growth. *Bull World Health Organ*, 71:703-12.

Desai, M., Crowther, N. J., Lucas, A. y Hales, C. N. 1996. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr*, 76:591-603.

Dhabhar, F. S., Miller, A. H., McEwen, B. S. y Spencer, R. L. 1995. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J Immunol*, 154:5511-27.

Dickinson, B. 1999. Operator Training Manual (BDIS). Becton Dickinson. San José. pp.

Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallavicini, M. G. y Gray, J. W. 1983. Flow cytometric

measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. Proc Natl Acad Sci U S A, 80:5573-7.

Eidukevicius, R., Characiejus, D., Janavicius, R., Kazlauskaite, N., Pasukoniene, V., Mauricas, M. y Den Otter, W. 2005. A method to estimate cell cycle time and growth fraction using bromodeoxyuridine-flow cytometry data from a single sample. BMC Cancer, 5:122.

Elledge, S. J. 1996. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. Science, 274:1664-72.

Ellery, J. M. y Nicholls, P. J. 2002a. Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. Cytokine Growth Factor Rev, 13:27-40.

Ellery, J. M. y Nicholls, P. J. 2002b. Possible mechanism for the alpha subunit of the interleukin-2 receptor (CD25) to influence interleukin-2 receptor signal transduction. Immunol Cell Biol, 80:351-7.

ESNA. 2003. Perfiles nutricionales por país: México. Roma. 45 pp.

Fantuzzi, G. y Faggioni, R. 2000. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. J Leukoc Biol, 68:437-46.

FAO. 2004. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2004. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 40 pp.

FAO. 2007a. La FAO insiste en la alimentación como un derecho humano más. Roma.

FAO. 2007b. The most fundamental human right is the right to food. Strasbourg.

FAO. 2008a. Hunger on the rise. Rome.

FAO. 2008b. Situación alimentaria en América Latina y el Caribe. Chile. 1-4 pp.

Fawcett, D. W. 1995. Tratado de Histología. Interamericana McGraw-Hill. Madrid. 1044 pp.

Feledi, C. A., Goldman, C. K., Hebe, L., Massouh, E. J. y Roux, M. E. 1993. B and T cells in the intestinal mucosa of malnourished rats after the oral administration of cholera toxin. *Comun Biol*, 11:275-282.

Flo, J., Benedetti, R., Feledi, C., Ariki, S. G., Goldman, H., Roux, M. E. y Massouh, E. 1995. Alterations of GALT due to malnutrition and decrease in the secretory immune response to cholera toxin. *Adv Exp Med Biol*, 371A:513-5.

Flo, J., Elias, F., Massouh, E. y Roux, M. E. 1994. Impairment of B and T cell maturation in gut associated lymphoid tissues due to malnutrition during lactation. *Dev Comp Immunol*, 18:543-55.

Flo, J., Massouh, E. J. y Roux, M. E. 1993. Long term effects of malnutrition during lactation on GALT. *Reg Immunol*, 5:100-5.

Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Lollmann, B., Lowell, B. B. y Flier, J. S. 1995a. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*, 1:1311-4.

Frederich, R. C., Lollmann, B., Hamann, A., Napolitano-Rosen, A., Kahn, B. B., Lowell, B. B. y Flier, J. S. 1995b. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest*, 96:1658-63.

Freitag, K. A., Saker, K. E., Thomas, E. y Kalnitsky, J. 2000. Acute starvation and subsequent refeeding affect lymphocyte subsets and proliferation in cats. *J Nutr*, 130:2444-9.

Friedman, J. M. y Halaas, J. L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395:763-70.

Fu, Y. X. y Chaplin, D. D. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol*, 17:399-433.

Galler, J. R. y Kanis, K. B. 1987. Animal models of malnutrition applied to brain research. *Curr Topics Nutr Disease*, 16:57-73.

Goetzman, E. A. 1993. Flow cytometry: basic concepts and clinical applications in immunodiagnosics. *Clin Lab Sci*, 6:177-82.

Golias, C. H., Charalabopoulos, A. y Charalabopoulos, K. 2004. Cell proliferation and

cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract*, 58:1134-41.

Gómez, F. 1946. Desnutrición. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 3:543-551.

Gómez, J. L., Campos, C., Rangel, P. y Ortiz, R. 1996. Cell cycle phase duration in bone marrow cells from malnourished rats during suckling. *Mutat Res*, 352:57-60.

Gonzalez, C., Villasenor, L. y Betancourt, M. 1990. [Kinetics of in vitro proliferation of lymphocytes from malnourished children]. *Rev Invest Clin*, 42:18-22.

Gratzner, H. G. y Leif, R. C. 1981. An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry*, 1:385-93.

Gratzner, H. G., Young, I. T. y Sher, S. E. 1979. An immunocytochemical approach to cell kinetics automation. *J Histochem Cytochem*, 27:496-9.

Hardie, L. J., Rayner, D. V., Holmes, S. y Trayhurn, P. 1996. Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA. *Biochem Biophys Res Commun*, 223:660-5.

Haylock, D. N. y Nilsson, S. K. 2005. Stem cell regulation by the hematopoietic stem cell niche. *Cell Cycle*, 4:1353-5.

Hedfors, I. A. y Brinchmann, J. E. 2003. Long-term proliferation and survival of in vitro-activated T cells is dependent on Interleukin-2 receptor signalling but not on the

high-affinity IL-2R. *Scand J Immunol*, 58:522-32.

Hernández-Navarro, L. 2008. Alimentos: silencioso asesinato en masa en países en desarrollo. *La Jornada*,

Herzenberg, L. A. y De Rosa, S. C. 2000. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunol Today*, 21:383-90.

Hoebe, K., Janssen, E. y Beutler, B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, 5:971-4.

Howard, A. y Pelc, S. R. 1952. Techniques of autoradiography and the application of the stripping-film method to problems of nuclear metabolism. *Br Med Bull.*, 8:132-135.

Howard, J. K., Lord, G. M., Matarese, G., Vendetti, S., Ghatei, M. A., Ritter, M. A., Lechler, R. I. y Bloom, S. R. 1999. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J Clin Invest*, 104:1051-9.

Itano, A. A. y Jenkins, M. K. 2003. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol*, 4:733-9.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. y Shlomchik, M. 2001. *Immunobiology*. Garland Science. New York and London. 900 pp.

Jenkins, M. K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D. L., McSorley, S. J., Reinhardt, R.

L., Itano, A. y Pape, K. A. 2001. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol*, 19:23-45.

Johnson, D. G. y Walker, C. L. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39:295-312.

Kaler, S. G. 2008. Diseases of poverty with high mortality in infants and children: malaria, measles, lower respiratory infections, and diarrheal illnesses. *Ann N Y Acad Sci*, 1136:28-31.

Kamohara, S., Burcelin, R., Halaas, J. L., Friedman, J. M. y Charron, M. J. 1997. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*, 389:374-7.

Kilpatrick, D. C. 1999. Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. *Mol Biotechnol*, 11:55-65.

King, K. L. y Cidlowski, J. A. 1998. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 60:601-17.

Knudsen, E. S. y Knudsen, K. E. 2006. Retinoblastoma tumor suppressor: where cancer meets the cell cycle. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231:1271-81.

Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V. y Kastan, M. B. 1992. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

89:7491-5.

Lal, N., Bazaz-Malik, G. y Sehgal, H. 1980. Profile of T and B lymphocytes in malnourished children. *Indian J Med Res*, 71:576-80.

Lam, Q. L. y Lu, L. 2007. Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol*, 4:1-13.

Lim, L. C., Fiordalisi, M. N., Mantell, J. L., Schmitz, J. L. y Folds, J. D. 1998. A whole-blood assay for qualitative and semiquantitative measurements of CD69 surface expression on CD4 and CD8 T lymphocytes using flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol*, 5:392-8.

López-Casillas, F. 2002. El ciclo celular bien vale un galardón. *Ciencia*, 53:74-77.

Lord, G. M., Matarese, G., Howard, J. K., Baker, R. J., Bloom, S. R. y Lechler, R. I. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 394:897-901.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-75.

Ma, A., Koka, R. y Burkett, P. 2006. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol*, 24:657-79.

Mainali, E. S. y McMurray, D. N. 1998. Protein deficiency induces alterations in the distribution of T-cell subsets in experimental pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*,

66:927-31.

Mandy, F. F. 2004. Twenty-five years of clinical flow cytometry: AIDS accelerated global instrument distribution. *Cytometry A*, 58:55-6.

Marin, M. C., De Tomas, M. E., Serres, C. y Mercuri, O. 1995. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. *J Nutr*, 125:1017-24.

Marshak-Rothstein, A. y Ohashi, P. S. 2007. Intricate connections between innate and adaptive autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 19:603-5.

Matarese, G. y La Cava, A. 2004. The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends Immunol*, 25:193-200.

McMurray, D. N. y Bartow, R. A. 1992. Immunosuppression and alteration of resistance to pulmonary tuberculosis in guinea pigs by protein undernutrition. *J Nutr*, 122:738-43.

McMurray, D. N., Loomis, S. A., Casazza, L. J., Rey, H. y Miranda, R. 1981. Development of impaired cell-mediated immunity in mild and moderate malnutrition. *Am J Clin Nutr*, 34:68-77.

Medzhitov, R. y Janeway, C. A., Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*, 9:4-9.

Medzhitov, R. y Janeway, C. A., Jr. 1998. An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol*, 10:12-5.

Menendez-Patterson, A., Fernandez, S., Diaz, F. y Marin, B. 1987. 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*, 43:287-96.

Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T. y Taniguchi, T. 1993. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol*, 11:245-68.

Miskimins, W. K., McClelland, A., Roberts, M. P. y Ruddle, F. H. 1986. Cell proliferation and expression of the transferrin receptor gene: promoter sequence homologies and protein interactions. *J Cell Biol*, 103:1781-8.

Mito, N., Yoshino, H., Hosoda, T. y Sato, K. 2004. Analysis of the effect of leptin on immune function in vivo using diet-induced obese mice. *J Endocrinol*, 180:167-73.

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

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. y Coffman, R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136:2348-57.

Mosmann, T. R., Kobie, J. J., Lee, F. E. y Quataert, S. A. 2009. T helper cytokine patterns: defined subsets, random expression, and external modulation. *Immunol*

Res,

Muller, O. y Krawinkel, M. 2005. Malnutrition and health in developing countries. *Cmaj*, 173:279-86.

Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116:221-34.

Murray, L. E., Singer, R. A., Fenwick, R. G., Jr. y Johnston, G. C. 1991. The G1 interval in the mammalian cell cycle: dual control by mass accumulation and stage-specific activities. *Cell Prolif*, 24:215-28.

Myatt, S. S. y Lam, E. W. 2007. Promiscuous and lineage-specific roles of cell cycle regulators in haematopoiesis. *Cell Div*, 2:6.

Nájera, O., González, C., Toledo, G., Cortés, E., López, L., Betancourt, M. y Ortiz, R. 2001. Early activation of T, B and NK lymphocytes in infected malnourished and infected well-nourished children. *J Nutr Immunol*, 5:85-97.

Nájera, O., González, C., Toledo, G., López, L. y Ortiz, R. 2004. Flow cytometry study of lymphocyte subsets in malnourished and well-nourished children with bacterial infections. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11:577-80.

Neckers, L. M. y Cossman, J. 1983. Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80:3494-8.

Nilsson, S. K., Johnston, H. M. y Coverdale, J. A. 2001. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*, 97:2293-9.

Ormerod, M. G. 2008. *Flow Cytometry: A Basic Introduction*. Oxford University Press. Oxford. pp.

Ortiz, R. 1987. Efecto de la desnutrición sobre las células de la médula ósea de rata. Doctor en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 138.

Ortiz, R. y Betancourt, M. 1984. Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. *J Nutr*, 114:472-6.

Ortiz, R., Campos, C., Gómez, J. L., Espinoza, M., Ramos-Motilla, M. y Betancourt, M. 1994. Sister-chromatid exchange (SCE) and cell proliferation in lymphocytes from infected and non-infected children with severe protein calorie malnutrition (PCM). *Mutat Res*, 312:33-7.

Ortiz, R., Cortés, E., Pérez, L., González, C. y Betancourt, M. 1996. Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation. *Med Sci Res*, 24:843-846.

Ortiz, R., Cortés, E., Pérez, L., González, C., Rodríguez, E. y Betancourt, M. 1999. Desnutrición experimental por competencia de alimento durante la lactancia y su efecto sobre la fórmula leucocitaria en sangre periférica. *Animal Experim*, 4:33-39.

Ortiz, R., Cortés, L., Cortés, E. y Medina, H. 2009. Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocyte subpopulations of rats. *Clinical Experimental Immunol*, 155:96-106.

Ortiz, R., Cortés, L., Gómez, J. L., González, C. y Cortés, E. 2000. Análisis con citometría de flujo de los diferentes tipos de timocitos en ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. *Ciencia en la frontera*, 1:77-84.

Ortiz, R., Cortés, L., González-Marquez, H., Gómez, J. L., González, C. y Cortés, E. 2001. Flow cytometric analysis of spontaneous and dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes from severely malnourished rats. *Br J Nutr*, 86:545-8.

Ortiz, R., Rodríguez, L., Cortés, L., Nájera, O., Rodríguez, E. y Cortés, E. 2006. Estudios con citometría de flujo. Inmunofenotipo, proliferación, diferenciación, muerte celular y análisis de ADN. en E. A. Pimentel, R. Ortiz y M. Breña. *Tópicos de Genética*. Universidad Autónoma del Estado de México y Sociedad Mexicana de Genética. Toluca. 345-366 pp.

Pabst, O., Herbrand, H., Bernhardt, G. y Forster, R. 2004. Elucidating the functional anatomy of secondary lymphoid organs. *Curr Opin Immunol*, 16:394-9.

Pagano, C., Englaro, P., Granzotto, M., Blum, W. F., Sagrillo, E., Ferretti, E., Federspil, G. y Vettor, R. 1997. Insulin induces rapid changes of plasma leptin in lean but not in genetically obese (fa/fa) rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 21:614-8.

Palacio, A., Lopez, M., Perez-Bravo, F., Monkeberg, F. y Schlesinger, L. 2002. Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. *J Clin Endocrinol Metab*, 87:3040-6.

Panyi, G., Varga, Z. y Gaspar, R. 2004. Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol Lett*, 92:55-66.

Parent, G., Chevalier, P., Zalles, L., Sevilla, R., Bustos, M., Dhenin, J. M. y Jambon, B. 1994. In vitro lymphocyte-differentiating effects of thymulin (Zn-FTS) on lymphocyte subpopulations of severely malnourished children. *Am J Clin Nutr*, 60:274-8.

Parslow, G., Stites, D. P., Terr, A. I. y Imboden, J. B. 2002. *Inmunología básica y clínica*. El Manual Moderno. México. 918 pp.

Pelc, S. R. 1964. Labelling of DNA and Cell Division in So Called Non-Dividing Tissues. *J Cell Biol*, 22:21-8.

Pelletier, D. L. 1994. The relationship between child anthropometry and mortality in developing countries: implications for policy, programs and future research. *J Nutr*, 124:2047S-2081S.

Pena, M. y Bacallao, J. 2002. Malnutrition and poverty. *Annu Rev Nutr*, 22:241–253.

Pighetti, G. M., Eskew, M. L., Reddy, C. C. y Sordillo, L. M. 1998. Selenium and vitamin E deficiency impair transferrin receptor internalization but not IL-2, IL-2

receptor, or transferrin receptor expression. *J Leukoc Biol*, 63:131-7.

Posselt, A. M., Vincenti, F., Bedolli, M., Lantz, M., Roberts, J. P. y Hirose, R. 2003. CD69 expression on peripheral CD8 T cells correlates with acute rejection in renal transplant recipients. *Transplantation*, 76:190-5.

Prentice, A. M. 1999. The thymus: a barometer of malnutrition. *Br J Nutr*, 81:345-7.

Pugacheva, E. N., Roegiers, F. y Golemis, E. A. 2006. Interdependence of cell attachment and cell cycle signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 18:507-15.

Puri, S. y Chandra, R. K. 1985. Nutritional regulation of host resistance and predictive value of immunologic tests in assessment of outcome. *Pediatr Clin North Am*, 32:499-516.

Quastler, H. y Sherman, F. G. 1959. Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp Cell Res*, 17:420-38.

Rashidian, J., Iyirhiaro, G. O. y Park, D. S. 2007. Cell cycle machinery and stroke. *Biochim Biophys Acta*, 1772:484-93.

Reiner, S. L. 2007. Development in motion: helper T cells at work. *Cell*, 129:33-6.

Ribatti, D. 2006. The fundamental contribution of Robert A. Good to the discovery of the crucial role of thymus in mammalian immunity. *Immunology*, 119:291-5.

Ribatti, D., Crivellato, E. y Vacca, A. 2006. Miller's seminal studies on the role of

thymus in immunity. *Clin Exp Immunol*, 144:371-375.

Rice, A. L., Sacco, L., Hyder, A. y Black, R. E. 2000. Malnutrition as an underlying cause of childhood deaths associated with infectious diseases in developing countries. *Bull World Health Organ*, 78:1207-21.

Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., González de Cossío, T., Hernández-Prado, B. y Sepúlveda, J. 2001. Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado nutricional de niños y mujeres en México. Cuernavaca. 320 pp.

Robinson, L. E., Clandinin, M. T. y Field, C. J. 2002. The role of dietary long-chain n-3 fatty acids in anti-cancer immune defense and R3230AC mammary tumor growth in rats: influence of diet fat composition. *Breast Cancer Res Treat*, 73:145-60.

Rodríguez, L. 2005. Evaluación por citometría de flujo de la producción de citocinas en linfocitos de niños desnutridos. Investigación en ciencias biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México. 110.

Rodríguez, L., Gonzalez, C., Flores, L., Jimenez-Zamudio, L., Graniel, J. y Ortiz, R. 2005. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12:502-7.

Rodríguez, L., Graniel, J. y Ortiz, R. 2007. Effect of leptin on activation and cytokine synthesis in peripheral blood lymphocytes of malnourished infected children. *Clin Exp Immunol*,

Rosenblum, C. I., Tota, M., Cully, D., Smith, T., Collum, R., Qureshi, S., Hess, J. F., Phillips, M. S., Hey, P. J., Vongs, A., Fong, T. M., Xu, L., Chen, H. Y., Smith, R. G., Schindler, C. y Van der Ploeg, L. H. 1996. Functional STAT 1 and 3 signaling by the leptin receptor (OB-R); reduced expression of the rat fatty leptin receptor in transfected cells. *Endocrinology*, 137:5178-81.

Ruiz, E. y Fuentes, A. M. 1996. Evaluación de la biometría hemática en la rata de laboratorio. *Rev Mex Patol Clin*, 43:80-85.

Sánchez, I. y Dynlacht, B. D. 2005. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol*, 16:311-21.

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

Schlesinger, L., Arevalo, M., Simon, V., Lopez, M., Munoz, C., Hernandez, A., Carreno, P., Belmar, J., White, A. y Haffner-Cavaillon, N. 1995. Immune depression induced by protein calorie malnutrition can be suppressed by lesioning central noradrenaline systems. *J Neuroimmunol*, 57:1-7.

Schmidt, W. P., Cairncross, S., Barreto, M. L., Clasen, T. y Genser, B. 2009. Recent diarrhoeal illness and risk of lower respiratory infections in children under the age of 5 years. *Int J Epidemiol*,

Scrimshaw, N. S. 2003. Historical concepts of interactions, synergism and

antagonism between nutrition and infection. *J Nutr*, 133:316S-321S.

Senior, K. 1995. Defending the use of animals to research human disease. *Mol Med Today*, 1:220-5.

Sharon, N. y Lis, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14:53R-62R.

Slobodianik, N. H., Pallaro, A. N., Roux, M. E. y Rio, M. E. 1989. Effect of low-quality dietary protein on the thymus of growing rats. *Nutrition*, 5:417-8.

Smith, K. A. 1989. The interleukin 2 receptor. *Annu Rev Cell Biol*, 5:397-425.

Smith, K. A. 2006. The structure of IL2 bound to the three chains of the IL2 receptor and how signaling occurs. *Med Immunol*, 5:3.

Soliman, A. T., ElZalabany, M. M., Salama, M. y Ansari, B. M. 2000. Serum leptin concentrations during severe protein-energy malnutrition: correlation with growth parameters and endocrine function. *Metabolism*, 49:819-25.

Steinman, R. A. 2002. Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene*, 21:3403-13.

Sullivan, M. y Morgan, D. O. 2007. Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:894-903.

Suskind, R. M. 1988. Malnutrition and the immune response. *Beitr Infusionther Klin*

Ernahr, 19:1-25.

Szamel, M. y Resch, K. 1995. T-cell antigen receptor-induced signal-transduction pathways--activation and function of protein kinases C in T lymphocytes. Eur J Biochem, 228:1-15.

Taketani, S. 2005. Aquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation. Tohoku J Exp Med, 205:297-318.

Taketani, S., Kohno, H. y Tokunaga, R. 1985. Expression and phosphorylation of transferrin receptors in mitogen-activated peripheral blood lymphocytes. J Biochem, 98:1639-46.

ten Bruggencate, S. J., Hillyer, L. M. y Woodward, B. D. 2001. The proportion of CD45RA(+)CD62L(+) (quiescent-phenotype) T cells within the CD8(+) subset increases in advanced weight loss in the protein- or energy-deficient weanling mouse. J Nutr, 131:3266-9.

Tung, J. W., Heydari, K., Tirouvanziam, R., Sahaf, B., Parks, D. R. y Herzenberg, L. A. 2007. Modern flow cytometry: a practical approach. Clin Lab Med, 27:453-68, v.

Tyers, M. 2004. Cell cycle goes global. Curr Opin Cell Biol, 16:602-13.

Ubersax, J. A. y Ferrell, J. E., Jr. 2006. A noisy 'Start' to the cell cycle. Mol Syst Biol,

2:2006 0014.

Ubersax, J. A., Woodbury, E. L., Quang, P. N., Paraz, M., Blethrow, J. D., Shah, K., Shokat, K. M. y Morgan, D. O. 2003. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*, 425:859-64.

Van de Poel, E., Hosseinpoor, A. R., Speybroeck, N., Van Ourti, T. y Vega, J. 2008. Socioeconomic inequality in malnutrition in developing countries. *Bull World Health Organ*, 86:282-91.

van den Heuvel, S. 2005. Cell-cycle regulation. *WormBook*, 1-16.

von Andrian, U. H. y Sallusto, F. 2007. Lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol*,

Waterlow, J. C., Cravioto, J. y Stephen, J. M. 1960. Protein malnutrition in man. *Adv Protein Chem*, 15:131-238.

Weiss, D. J. 1986. Histopathology of canine nonneoplastic bone marrow. *Vet Clin Pathol*, 15:7-11.

White, D. W., Kuropatwinski, K. K., Devos, R., Baumann, H. y Tartaglia, L. A. 1997. Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. *J Biol Chem*, 272:4065-71.

Wilkins, B. S. 1992. Histology of normal haemopoiesis: bone marrow histology. I. *J Clin Pathol*, 45:645-9.

Winick, M. y Noble, A. 1966. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr*, 89:300-6.

Winslow, M. M., Neilson, J. R. y Crabtree, G. R. 2003. Calcium signalling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 15:299-307.

Woodward, B. 1998. Protein, calories, and immune defenses. *Nutr Rev*, 56:S84-92.

Woodward, B. D., Bezanson, K. D., Hillyer, L. M. y Lee, W. H. 1995. The CD45RA⁺ (quiescent) cellular phenotype is overabundant relative to the CD45RA⁻ phenotype within the involuted splenic T cell population of weanling mice subjected to wasting protein-energy malnutrition. *J Nutr*, 125:2471-82.

Xavier, J. G., Favero, M. E., Vinolo, M. A., Rogero, M. M., Dagli, M. L., Arana-Chavez, V. E., Borojevic, R. y Borelli, P. 2007. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. *Histol Histopathol*, 22:651-60.

Zatterstrom, U. K., Johansson, M., Kallen, A., Baldetorp, B., Oredsson, S., Wennerberg, J. y Killander, D. 1992. Comparison of BrdUrd and [³H]TdR incorporation to estimate cell proliferation, cell loss, and potential doubling time in tumor xenografts. *Cytometry*, 13:872-9.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. y Friedman, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*,

372:425-32.

Zhao, Z. y Ross, A. C. 1995. Retinoic acid repletion restores the number of leukocytes and their subsets and stimulates natural cytotoxicity in vitamin A-deficient rats. *J Nutr*, 125:2064-73.

ABREVIATURAS

APC	Alofococianina
BN	Ratas bien nutridas
CD	Moléculas de superficies
CD3	Linfocitos T
CD25	Subunidad alfa del receptor de IL-2
CD45RA	Linfocitos B en rata
CD71	Receptor de transferrina
CPA	Célula procesadora de antígeno
Desn	Rata desnutridas
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter. Clasificador de células activado por fluorescencia.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

FSC	Dispersión de luz frontal
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor de interleucina 2
LI	Índice de incorporación de BrdU, índice de marcaje
MN	Malnourished rats, ratas desnutridas.
NKR-P1A	Células asesinas o natural killers
OMS	Organización Mundial de la Salud
PE	Ficoeritrina
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PHA	Fitohemaglutinina
SSC	Dispersión de luz lateral
TCR	Receptor de linfocitos T
Tpot	Tiempo de duplicación de la población de células
TS	Tiempo de duración de la fase S
WN	Well-nourished rats, ratas bien nutridas

ANEXO 1

En esta sección se describen algunas metodologías mencionadas en Material y Métodos.

Marcaje de células por anticuerpos monoclonales

- 1) Se incubó un millón de células con la cantidad sugerida de anticuerpos (2 a 5 μL) durante 30 minutos, en oscuridad a temperatura ambiente (T.A.).
- 2) Si la muestra es sangre periférica, se dio el tratamiento de lisis de eritrocitos. En agitación, se añadieron 4 mL de solución de lisis (1g de NH_4Cl , 1g de KHCO_3 y 0.037g de Na_2EDTA en un litro de agua destilada pH 7.4).
- 3) Se dejó reposar la muestra en la solución de lisis por 10 minutos.
- 4) Se centrifugó a 400g por cinco minutos y se retiró el sobrenadante.
- 5) Se añadieron 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se resuspendió el botón celular.
- 6) Se centrifugó a 400g por cinco minutos y se retiró el sobrenadante.
- 7) Las células se fijaron con 500 μL de paraformaldehído al 1% en PBS, 0.1% de azida de sodio.
- 8) Se adquirió la muestra en el citómetro de flujo, modelo FACScalibur, con láser

de argón a 488nm y láser de diodo rojo. Se utilizó el programa Cell Quest en la adquisición de los datos.

En el caso de las células de bazo, se omitieron los pasos del 2 al 3 y se sustituyeron por la resuspensión en 2 mL PBS con albúmina al 1%.

Cuantificación de proteínas totales en muestras de plasma de sangre periférica

El contenido de proteínas en plasma se realizó siguiendo la técnica de cuantificación de Lowry. Previamente se obtuvo el plasma de la siguiente manera:

La sangre se obtuvo por punción cardiaca con una jeringa heparinizada, inmediatamente después de la dislocación cervical de la rata. La sangre se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Se obtuvo el plasma y se guardó a -20°C hasta el momento de la cuantificación.

a) Curva patrón:

1. A 6 tubos se colocaron los siguientes volúmenes (μL) de albúmina sérica bovina (BSA) con una concentración de 0.5mg /mL: 0, 20, 40, 60, 80 y 100, respectivamente.
2. Se añadieron a cada tubo los siguientes volúmenes (μL) de agua: 100,80, 60, 40, 20 y 0 respectivamente. El volumen final será de 100 μL .
3. Preparó la solución ACB de la siguiente manera: De la solución A (Na_2CO_3 al

10% en NaOH 0.5M) se tomaron 5mL, de la solución B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%) se tomaron 0.15 mL y de la solución C (Tartrato de potasio al 2%) se adicionan 0.15mL.

4. Se agregó a cada tubo 100 μL de la solución ACB la cual se preparó en el momento y se agitó cada tubo. El volumen final fue de 200 μL . Se incubaron los tubos por 15 minutos.
5. Preparó la solución de Fenol-Folin en una dilución 1:10 con agua.
6. Se agregaron 300 μL de la solución de folin diluido en agitación a cada uno de los tubos. El volumen final fue de 500 μL . Se incubaron por 45 minutos.
7. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a 750 nm.

b) Muestras de plasma:

1. Se hizo una dilución de las muestras 1:10.
2. En tubos de ensaye se agregaron 90 μL de agua y 10 μL de muestra diluida.
El volumen final fue de 100 μL .
3. Repetir los pasos del 3 al 10 de la preparación de la curva patrón.

La preparación de la curva y de las muestras fue simultánea.

Cuantificación de leptina en plasma.

La cuantificación de leptina se realizó por medio de la técnica de ELISA, en plasma de sangre de ratas. El kit de reactivos utilizado fue de la marca R&D Systems para cuantificación de leptina en ratón que reconoce leptina de rata. Se siguió el protocolo propuesto por el fabricante.

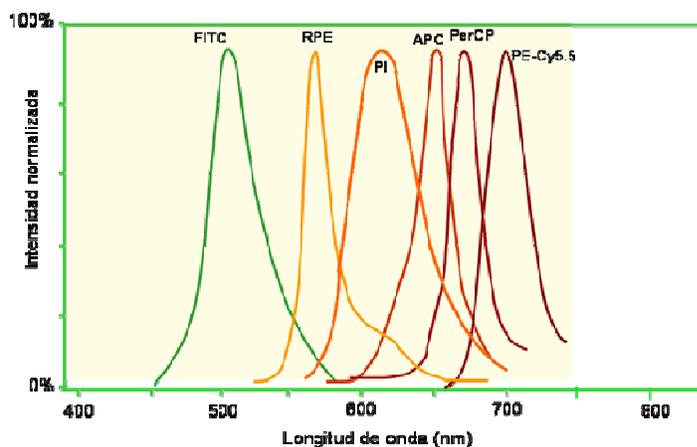
1. Se diluyó el anticuerpo de captura para leptina en PBS
2. Se colocó el anticuerpo de captura diluido por pozo, se cubrió la placa y se dejó incubar toda la noche.
3. La placa se lavó tres veces con solución de lavado (Tween al 0.05% en PBS). Se removió el líquido después de cada lavado.
4. Se bloqueó la placa con solución bloqueadora en cada pozo. (albúmina al 1%, sacarosa al 5% en PBS con NaN_2 al 0.05%, almacenado de 2 a 8°C).
5. Se lavó como en el paso 3.
6. Se adicionó 100µL de la muestra diluida y se cubrió la placa e incubó por 20 min a temperatura ambiente.
7. Se lavó como en paso 3.

8. Se agregó el anticuerpo de detección diluido en diluyente (albúmina al 1% en PBS, pH 7.2 a 7.4, filtrado). Se dejó incubar por 2 h en oscuridad a TA. Se lavó
9. Se agregó la estreptavidina-peroxidasa diluida a cada pozo. Se dejó incubar a TA por 2h en oscuridad. Se lavó.
10. Se adicionó la solución de sustrato a cada pozo (solución de peroxidasa estabilizada más el cromógeno, tetrametilbenzidina). Se dejó incubar por 20 min a TA evitando el contacto con la luz.
11. Se adicionó la solución de paro a cada pozo y se mezcló.
12. La placa se leyó a 450 nm.

ANEXO 2

Fluorocromo	Excitación (nm)	Emisión (nm)
R-Ficositrina (PE)	480;565	578
PE-cianina 5 (Cy-chrome, Tricolor)	495;564	696
Tiocianato de fluoresceína (FITC)	495	519
Proteína de clorofila peridina (PerCP)	490	675
Alofocianina (APC)	650	660
Fluorocromos para Ácidos Nucléicos		
DAPI	345	455
SYTOX Blue	431	480
YOYO-1	491	509
Naranja de acridina	503	530/640
Yocuro de Propidio (PI)	493	617

A



B

Figura 15. Se muestran algunos de los fluorocromos más comunes en citometría de flujo. A) Se muestran los espectros de excitación y de emisión de cada fluorocromo. B) Se muestran los picos de emisión de algunos fluorocromos detectables por el citómetro modelo FACScalibur (BD).

ARTÍCULO PUBLICADO

Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry

E. Cortés-Barberena,^{*†}
H. González-Márquez,^{*}
J. L. Gómez-Olivares^{*} and
R. Ortiz-Muñiz^{*}

^{*}Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa, Departamento
Ciencias de la Salud, and [†]Doctorado en Ciencias
Biológicas, Universidad Autónoma
Metropolitana, México

Accepted for publication 25 February 2008
Correspondence: R. Ortiz, Departamento de
Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa, Avenida San Rafael
Atlixco 186 CP 09340, México DF, México.
E-mail: arom@xanum.uam.mx

Introduction

Malnutrition occurs as a consequence of inadequate food intake and/or low-protein diets and is distributed widely throughout the world, but particularly in developing countries. It is associated generally with poverty. Individuals of low socio-economic class have little or no access to health services and education and are more vulnerable to malnutrition than those from middle and high socio-economic classes [1]. Approximately 12 million children younger than age 5 years die every year in developing countries, and half of those deaths are related to preventable disease and malnutrition [2]. The effects of malnutrition may be particularly devastating during childhood because of rapid growth rate and increased nutrient requirements [3].

Laboratory animals have been very useful in studying the effects of malnutrition at different levels, because non-nutritional factors such as infections and drugs that affect human studies may be controlled. In addition, studies may be performed both *in vivo* and *in vitro* [4]. Several studies on the effects of malnutrition with experimental animal models

Summary

Malnutrition is distributed widely throughout the world and is a particular problem in developing countries. Laboratory animals have been very useful in studying the effects of varying levels of malnutrition because non-nutritional factors that affect humans may be controlled. The objective of the present study was to determine the effects of moderate and severe malnutrition on lymphocyte proportions and activation markers of T cells in experimentally malnourished rats during lactation by flow cytometry. Lower absolute (total) and relative (%) numbers of CD3⁺ and CD4⁺ lymphocyte subpopulations were observed in moderately (second degree) and severely (third degree) malnourished rats compared with well-nourished rats ($P < 0.05$). Both groups of malnourished rats showed a significant decrease in the percentage of CD71⁺ cells at 24 h post-activation with phytohaemagglutinin (PHA). After 24 h activation of spleen cells with PHA, a lower percentage of CD25⁺ cells was observed in malnourished than well-nourished rats ($P < 0.05$). In conclusion, the results of this study indicated an altered expression of CD71 and CD25 during activation of T lymphocytes in malnourished rats and may partially explain increased susceptibility to infection associated with malnutrition. Moreover, these results demonstrated that moderate malnutrition affects the response of T lymphocytes as much as severe malnutrition.

Keywords: CD25, CD71, flow cytometry, lymphocyte activation, malnutrition

have been conducted during the lactation period, which is critical in the growth and development of breastfed pups or infants [5]. The effects of malnutrition during nursing are more severe than those observed in adults [4,6]. Malnutrition has been classified as mild, moderate or severe, according to the degree of weight deficit or altered weight : height ratio [4,7]. Classification by weight deficit is useful in experimental malnutrition animal models.

It has been shown previously that malnutrition reduced *in vitro* and *in vivo* bone marrow cell proliferation and increased thymocyte apoptosis significantly in rats [8–10].

The relationship between malnutrition and immunosuppressive effect has been documented in experimental and human malnutrition. Several mechanisms by which malnutrition affects immunity and susceptibility to infection have been described in the literature [11,12]. Several studies have highlighted the fact that even children with mild to moderate malnutrition, not just those with more severe forms, have an increased risk of death [2,13].

Several authors have shown changes in peripheral lymphocyte subsets, but the results of these studies were

controversial. In malnourished rodents, a decrease in the CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets was found [14,15]. However, other authors have observed that the proportion of CD4⁺ lymphocytes was not altered, but quiescent CD4⁺ lymphocytes tended to increase [16]. In other studies, the response of lymphocytes from malnourished children to mitogens was decreased [17–19]. It is important to study the changes in cellular parameters of the immune response in animal models of malnutrition, as it is possible to control for non-nutritional confounding factors [4,10].

T lymphocytes are required for an adaptive immune response. These responses are characterized by the capacity to recognize and remember pathogen-specific antigens. When a foreign antigen is encountered lymphocytes become activated, undergo clonal proliferation and acquire functions that enable the activated cells to eliminate it [20]. Lymphocytes use a complex array of signal transduction molecules to regulate proliferation, differentiation and effector functions. The first step in antigen receptor signal transduction is the activation of cytosolic tyrosine kinases which phosphorylate an array of adaptor molecules, initiating a cascade of signaling pathways [21].

The expression of cell surface activation antigens is useful in evaluating lymphocyte response to antigens or mitogens. CD25 [interleukin (IL)-2 receptor α -chain] is expressed after T cell activation. CD71 (transferrin receptor) surface expression represents the state of metabolic activity in the cell and must be increased in order to internalize iron required for T cell DNA synthesis and proliferation [22,23]. The effects of malnutrition [19,24] and certain drugs [25–27] on CD25 expression have been investigated previously, but the results are controversial.

The aims of the present study were twofold: (i) to determine the effects of moderate and severe malnutrition during lactation on splenic lymphocyte numbers in the pups; and (ii) to investigate the effects of malnutrition on T cell activation markers (CD25 and CD71), assessed by flow cytometry.

Materials and methods

Experimental malnutrition during lactation

Wistar rats from a closed breeding colony from the Division of Biological and Health Sciences of the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), México City were used. Rats were kept under 12-h controlled light–dark cycles at 22–25°C with 45% relative humidity. Dams had undergone a second delivery and were fed a balanced diet *ad libitum* for rodents (2018S; Harlan Teklad, Madison, WI, USA). They were bred in polysulphone cages (Harlan Teklad). Experiments were performed according to the guidelines for the use of experimental animals of the Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I), which are in accordance with those approved by the National Institutes of

Health (Bethesda, MD, USA) and the Official Mexican Guidelines (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999).

One-day-old Wistar rats from different litters were assigned randomly to either the experimental or control groups. In the control group pups were fed from nursing dams, each suckling six to eight pups. In the experimental or malnourished group, each nursing dam fed 16 pups. Pups were assigned to another dam 1 day after birth and the dams accepted the young without demur. The same proportion of male to female pups per litter was assigned to each group. Pups were weighed every 2 or 3 days and we estimated mean body weight in each litter from the first day until weaning (day 21). Well-nourished rats were selected from 10 different control litters and malnourished rats were selected from 10 different experimental litters. In the experimental group, the degree of malnutrition was established according to the classification used for children described by Gómez *et al.* [7]. The number was categorized as mild or first degree when the weight deficit reached 10–25%; moderate or second degree (MN2nd) when the weight deficit reached 25–40%; and severe or third degree (MN3rd) when the weight deficit was greater than 40% of that of age-matched control rats (WN). These rats also had other physical signs of malnutrition, such as sparse hair, bone fragility and low activity levels.

Antibodies

The antibodies utilized were fluorescein isothiocyanate (FITC)–anti-CD3, phycoerythrin (PE)–anti-CD25, allophycocyanin (APC)–anti-natural killer (NK)R-P1A (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), Cy-Chrome (CyC)–anti-CD45RA, PE–anti-CD8, CyC–anti-CD4, and PE–anti-CD71 (Pharmingen-BD, San José, CA, USA).

Cell preparation

Spleen cells were obtained by sieving the tissue through a nylon screen [28] and cells were suspended in Iscove's medium. Cell viability was determined with Trypan blue (Microlab, México City, México) and more than 95% of the cells were viable.

Staining lymphocyte subpopulations

Specific staining of the respective cell surface molecules was performed with (i) anti-rat CD3-FITC, anti-rat CD45RA CyC and anti-rat NK APC or (ii) anti-rat CD8 PE and anti-rat CD4 CyC. One million cells were incubated for 30 min with the recommended amount of antibodies in the dark at room temperature. As controls, FITC- and PE-labelled non-specific mouse immunoglobulin G1 antibodies were used to establish background fluorescence. The cells were washed with 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and prepared in phosphate-buffered

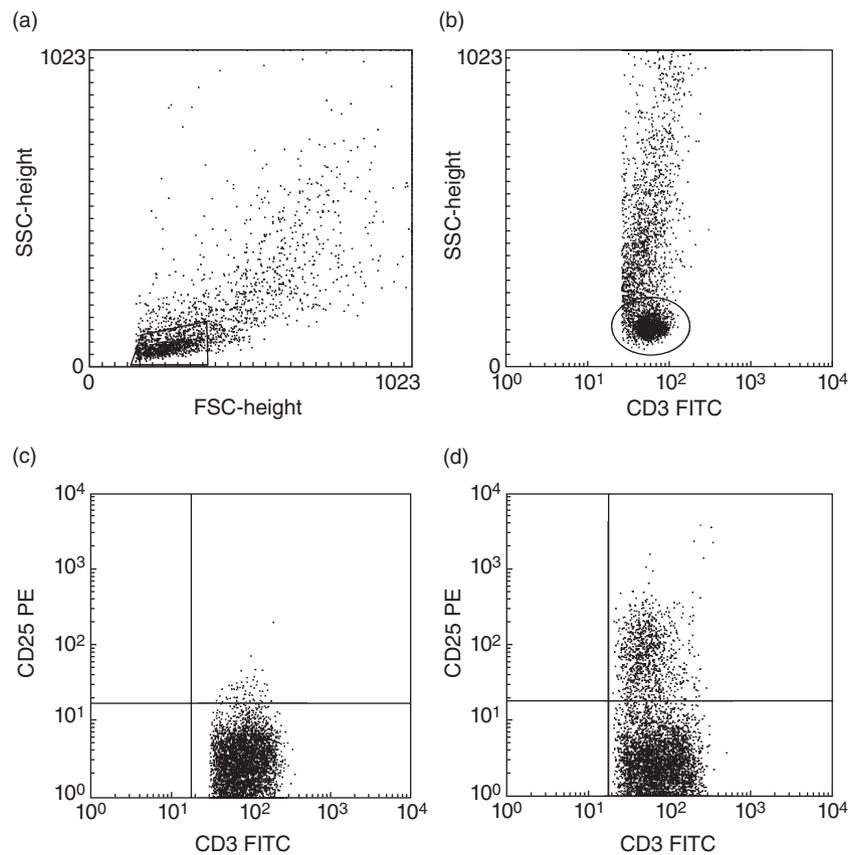


Fig. 1. (a) The lymphocytes gate set in forward-scatter–side-scatter (SSC) distribution. (b) Fluorescein isothiocyanate (FITC)-SSC distribution; this gate was set on to restrict analysis to CD3⁺ cells. For analysis of activation markers the cells were selected by windows (a) and (b). (c, d) Examples of CD25 expression in unstimulated and stimulated cultures of splenocytes respectively.

saline (PBS; Microlab). Finally, cells were fixed in 1% paraformaldehyde (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) prior to analysis.

Cell culture and staining of activation cell surface antigens

Lymphocytes were isolated from spleen using a density gradient (Linfograd; Microlab). Spleen cells were cultured (5×10^6 cells/ml) for 24 h at 37°C and 5% CO₂ in Iscove's medium without glutamine (GIBCO, Carlsbad, CA, USA) and with or without phytohaemagglutinin (PHA 25 µg/ml; Sigma Chemical Co.). Following culture, 1 million cells were incubated with (i) anti-rat CD3 FITC, CD4 CyC and anti-rat CD71 PE or (ii) anti-rat CD3 FITC, CD4 CyC and anti-rat CD25 PE for 30 min at room temperature. The cells were washed with 1% BSA in PBS and fixed with 1% paraformaldehyde prior to analysis.

Flow cytometry analysis

After fixation, four-colour flow cytometry was performed using a fluorescence activated cell sorter (FACSCalibur) flow cytometer (BD, San José, CA, USA). A minimum of 10 000 events were acquired and analysed with CellQuest software (BD). Figure 1 shows how gates were set on the forward-scatter–side-scatter (SSC) to acquire all lymphocytes FITC-

SSC distribution for gate on the basis of anti-CD3 labelling (gate on CD3). These gates were used to analyse CD71 or CD25 expression.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error. All groups were compared by the non-parametric Mann–Whitney *U*-test. Level of significance was set at values of $P < 0.05$.

Results

Experimental malnutrition during lactation

Table 1 shows the mean and standard deviation of body weight, spleen weight and number of cells per spleen for all groups of rats. At weaning age, the average weight deficit between WN and MN2nd was 33.7% and the average weight deficit between WN and MN3rd was 50.7%. The body and spleen weight and the number of spleen cells were significantly lower ($P < 0.05$) in both groups of malnourished rats compared with WN rats. However, the mean numbers of cells/100 mg of spleen were not statistically significant among the three groups.

Lymphocyte subsets

Table 2 summarizes the data of isolated splenic lymphocyte subpopulations (T, B and NK) in WN and MN rats.

Table 1. Body weight, spleen weight and spleen cell number ($\times 10^6$) of well-nourished and malnourished rats.

	WN	MN2nd	MN3rd
Body weight	54.2 \pm 2.5	35.9 \pm 1.9 [†]	26.6 \pm 3.1 ^{†‡}
Body weight deficit	–	33.7 \pm 3.5	50.7 \pm 6.0
Spleen weight (mg)	274.9 \pm 43.7	154.0 \pm 42.7 [†]	101.7 \pm 21.7 ^{†‡}
Spleen weight (mg)/body weight (g)	5.1 \pm 0.8	4.3 \pm 1.1 [†]	4.1 \pm 0.9 [†]
Deficit %		44.0 \pm 15.5	63.0 \pm 7.7
Cells number ($\times 10^6$)/spleen	200.0 \pm 55.5	115.0 \pm 35.7 [†]	76.6 \pm 21.1 ^{†‡}
Deficit %		38.3 \pm 18.8	62.4 \pm 11.7
Cells number ($\times 10^6$)/100 mg spleen	73.2 \pm 17.6	79.2 \pm 29.7	75.2 \pm 14.7

Values are means \pm standard deviation. Means or values followed by different superscript letters are statistically significant. [†]Statistical differences from well-nourished (WN) group, $P < 0.05$; [‡]statistical differences from moderately (MN2nd) and severely (MN3rd) malnourished rats, $P < 0.01$. WN, $n = 12$; MN2nd, $n = 10$; MN3rd, $n = 10$.

Significantly lower percentages of CD3⁺ lymphocytes were observed in malnourished than in well-nourished rats ($P < 0.05$). In the same manner, total lymphocytes decreased significantly ($P < 0.05$); conversely, non-lymphoid cells present in the same region were increased ($P < 0.05$).

The CD3⁺ CD4⁺ and CD3⁺ CD8⁺ subpopulation are shown in Table 3. The percentages of CD4⁺ lymphocyte subset were significantly lower ($P < 0.05$) in both groups of malnourished rats than in WN rats. However, there was no statistically significant difference between the MN groups. Although the percentage of CD8⁺ cells tended to be elevated in malnourished rats compared with well-nourished animals, the increase was not statistically significant partly because of

large standard deviations. The CD4⁺ CD8⁺ subpopulation increased in MN3rd rats in comparison with WN rats.

Figure 2 shows the percentage of T lymphocytes (CD3⁺) from cultured spleen cells. A small but significant difference was found between PHA-stimulated WN CD3⁺ lymphocytes and unstimulated lymphocytes. No significant difference was observed in PHA-stimulated and unstimulated lymphocytes between WN and MN groups. When spleen cells were incubated with PHA, the percentage of CD3⁺ cells tended to be higher in severely than in moderately malnourished rats. However, the difference between both groups was not statistically significant.

Table 2. Splenic lymphocytes from WN, MN2nd, and MN3rd rats.

	(% \pm s.e.)		
	WN	MN2nd	MN3rd
T (CD3 ⁺)	46.6 \pm 2.6	36.8 \pm 2.5 [†]	38.1 \pm 2.7 [†]
B (CD45RA ⁺)	26.6 \pm 2.8	28.2 \pm 3.0	23.0 \pm 3.0
NK (NKR-P1A ⁺)	3.9 \pm 0.6	3.4 \pm 0.5	5.1 \pm 0.9
Total lymphocytes	76.8 \pm 3.1	71.4 \pm 4.4	65.9 \pm 4.4 [†]
Non-lymphoid cells*	24.7 \pm 2.9	30.6 \pm 4.4	34.1 \pm 4.4 [†]

*Cells that appear in region of analysis. Data are based upon flow cytometric analysis of 10 000 events and are means \pm standard errors (SE). [†]Statistical differences from WN, $P < 0.05$: CD3⁺ moderately (MN2nd) and severely (MN3rd); total lymphocytes (MN3rd) malnourished rats; non-lymphoid cells (MN3rd).

Table 3. T (CD3⁺) splenic lymphocyte subpopulations of WN, MN2nd and MN3rd rats.

	(% \pm s.e.)		
	WN	MN2nd	MN3rd
CD4 ⁺	53.8 \pm 1.3	47.0 \pm 3.2*	42.2 \pm 5.5*
CD8 ⁺	36.9 \pm 1.6	42.0 \pm 4.1	44.8 \pm 5.0
CD4 ⁺ CD8 ⁺	5.3 \pm 0.5	5.2 \pm 0.8	5.8 \pm 2.1
CD4 ⁺ CD8 ⁻	3.9 \pm 1.4	5.9 \pm 2.7	7.2 \pm 2.5*

*Significantly different from WN rats, $P < 0.05$: in CD4⁺ moderately (MN2nd); in CD4⁺ and in CD4⁺ CD8⁻ severely (MN3rd) malnourished rats.

Effect of culture and malnutrition on expression of CD71⁺ cells

The percentages of activated CD3⁺ CD71⁺ cells are presented in Fig. 3a. No difference was observed between the groups for freshly isolated CD3⁺ CD71⁺ splenocytes. Malnutrition

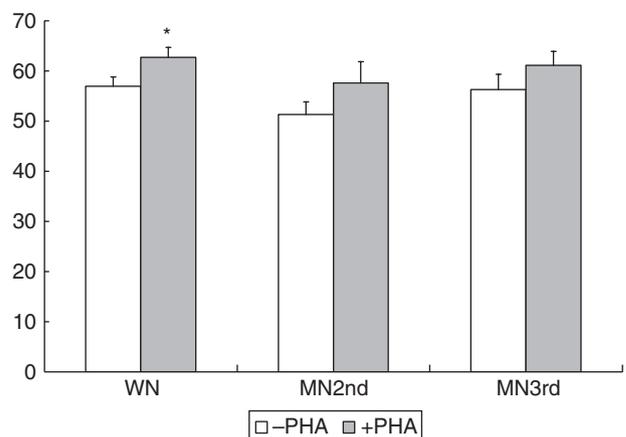


Fig. 2. Mean percentages of T lymphocytes in activated and non-activated spleen cells of well-nourished (WN), moderately (MN2nd) and severely (MN3rd) malnourished rats. Values are means \pm standard error. Statistical differences: *WN without phytohaemagglutinin (PHA) (-PHA) versus WN with PHA (+PHA), $P < 0.05$.

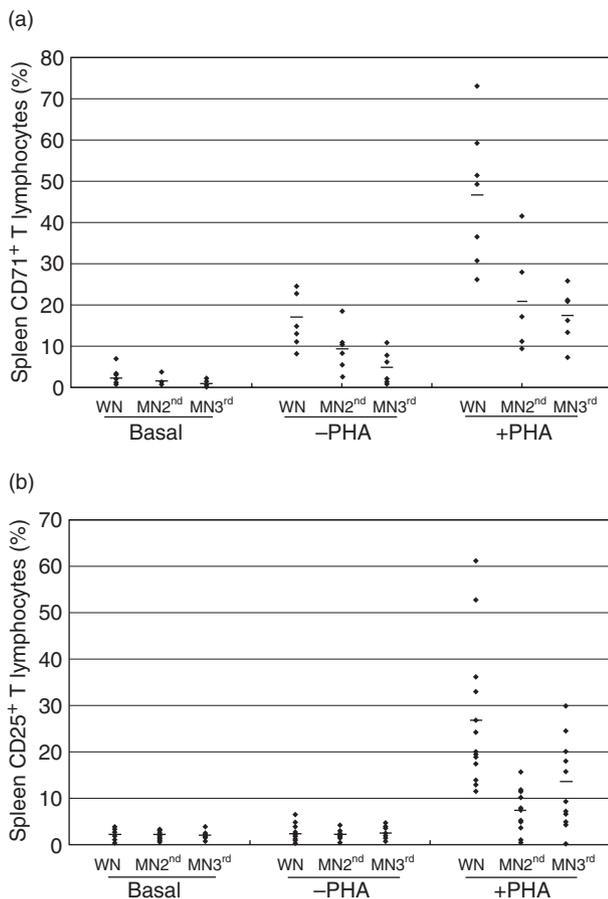


Fig. 3. Mean percentages of activated T lymphocytes of well-nourished (WN), moderately (MN2nd) and severely (MN3rd) malnourished rats. (a) CD3⁺ CD71⁺ lymphocytes. Significant difference ($P < 0.05$): basal: WN > MN3rd; -phytohaemagglutinin (PHA): WN > MN2nd; WN > MN3rd; +PHA: WN > MN2nd; WN > MN3rd. The percentages of spleen cells expressing the CD71 marker increased significantly in all three groups following *in vitro* cell activation with PHA. (b) CD3⁺ CD25⁺ lymphocytes. There was no difference between basal and -PHA groups. The percentages of CD3⁺ CD25⁺ increased significantly in WN rats following *in vitro* spleen cell activation with PHA.

affected negatively the increase of CD71⁺ expression in CD3⁺ CD71⁺ splenocytes cultured for 24 h with or without mitogen (Fig. 3a). Following cell activation, the mean percentage of CD3⁺ cells was higher in well-nourished than in malnourished rats ($P < 0.05$).

Effect of culture and malnutrition on expression of CD25⁺ on cells

CD3⁺ CD25⁺ splenocyte percentages are shown in Fig. 3b. No significant difference in CD25 expression was observed for freshly isolated cells, with 2.1% in WN rats, 2.0% for MN2nd, and 2.0% for MN3rd. Similar percentages were obtained for splenocytes cultured for 24 h without mitogen. After *in vitro* activation, the increase in CD3⁺ CD25⁺ cells

was lower in MN rats. No significant difference was observed between the MN2nd and MN3rd group, probably because of large variations within treatment groups. There was a positive correlation between spleen weight and the percentages of spleen cells expressing CD71 ($R^2 = 0.97$) receptors (Table 1 and Fig. 3).

Discussion

In this study, we evaluated the ability of splenic T lymphocytes to become activated in moderately and severely malnourished rats in order to identify possible malnutrition-degree-related effects. The effects of malnutrition were assessed during lactation. Several studies have demonstrated the importance of this period, where the effects are more severe than those observed in adults and malnutrition in early life produces adverse consequences in adulthood [29]. We used a well-established method for the induction of malnutrition in rats during the lactation period, in which malnourished rats mimicked the syndrome of malnutrition in children [4]. Flo *et al.* [14] showed that malnutrition during the suckling period decreased the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ cells in the gut-associated lymphoid tissues. It was reported that the decrease in K⁺ conductance by alteration of K(V) channels was associated with inhibition of activation of T lymphocytes in severely malnourished animals [30].

Previous studies in adult animals have reported that the number of splenic lymphocytes decreased during caloric restriction [31]. Similar results were obtained for animals on a low and free protein and micronutrients-deficient diet (zinc copper, vitamins, etc.) [32–34]. In contrast to specific deficiencies, in the present study we evaluated the reduced intake of all nutrients in the lactation period. It has been pointed out that the analogous murine model of multiple nutrient deficiencies is similar to human malnutrition in developing regions of the world [35].

The results of the present study showed a decrease in the percentage of T lymphocytes (CD3⁺ cells) in the spleens of moderately and severely malnourished rats. Because statistical analysis showed that the percentage of lymphocyte subsets was reduced significantly in both experimental groups, our results suggest that severe and moderate malnutrition are equally deleterious. The decrease in the percentage of T lymphocytes observed in malnourished rats is probably related to reduced proliferation in bone marrow cells [8,9], and/or a defect in the thymus, and/or an increase in apoptosis [10].

Phytohaemagglutinin is a lectin composed of five tetramers derived from the combination of two subunits, namely erythroagglutinin PHA and leucoagglutinin PHA, which are associated non-covalently [36]. It is used frequently as a mitogen in studies of lymphocyte activation and function. It recognizes the CD3 receptor and can influence the initiation and regulation of lymphocyte activation and proliferation

[37]. Furthermore, Kontny [38] showed that CD4⁺ and CD8⁺ are stimulated similarly by PHA. Lectin-stimulated T lymphocytes have been observed using CD71⁺ and CD25⁺ labelling [39–41].

Our data also showed a significantly reduced percentage of CD3⁺ CD71⁺ lymphocytes in moderately and severely malnourished rats after 24 h of culture. Cell surface transferrin receptor (CD71) is required for iron uptake through receptor-mediated endocytosis of diferric transferrin. This function is essential for cell proliferation, because iron must be available for the synthesis of haem- and iron-containing proteins [42]. In addition, CD71 appears to play a co-stimulatory role in T cell activation [43] and in the formation of the immunological synapse [44]. Low expression of CD71⁺ in T cells in malnourished subjects may contribute to the poor immunological response observed in malnutrition.

Expression of the α subunit of the IL-2 receptor (CD25) is induced in activated T lymphocytes, leading to an increased sensitivity to IL-2. IL-2 drives cellular proliferation and also has an important role in protecting immune cells from cell death by inducing anti-apoptotic mechanisms [45]. The percentage of CD25⁺ T lymphocytes was decreased after 24 h of culture in both malnourished groups. These data may explain the epidemiological studies that showed increased risk of death of children with moderate malnutrition because of impaired immunity [2,13].

The lower proportion of CD71⁺ and CD25⁺ cells in splenic T lymphocyte populations in both MN groups compared with the WN group indicates a decreased response to mitogen. Two previous studies have demonstrated a decrease in splenic T lymphocyte proliferative response to mitogens in diet restriction in mouse [32] and in *in vivo* responses to pulmonary tuberculosis in guinea pigs [46,47]. Studies of lymphocytes from malnourished children showed a defective expression of activation markers. Nájera *et al.* [48] observed impaired expression of CD69 in activated lymphocytes. In addition, Rodríguez *et al.* [19] demonstrated that lymphocytes had reduced expression of activation markers – both CD69, an early activation marker and CD25, which is expressed later in response to stimuli. Moreover, the capacity of CD4⁺ and CD8⁺ cells to produce cytokines in response to stimuli was impaired. The generation of protective T cell responses to infectious agents is a complex process whereby cytokines and co-stimulatory molecules provide signals that direct the development of adaptive immunity [49]. If malnutrition alters this complex process, the organism is vulnerable to infections. The results obtained in this and other studies [18,19] suggest that lymphocytes from malnourished subjects are unable to become activated fully and have defects in cytokine production.

Mild and moderate malnutrition also affects immunological status. In 1981, McMurray *et al.* provided evidence that there was a reduction in cell-mediated and humoral immune function in lymphocytes from children with mild

and moderate malnutrition [50]. Rodríguez *et al.* [19] observed lower ability of T lymphocytes to become activated in moderate and severe malnourished children, but did not observe a correlation between the degree of malnutrition. The results obtained in this study agree with this observation. It is important to study the effect of mild and moderate malnutrition because the prevalence of second degree malnutrition is higher than severe malnutrition [51,52].

An interesting finding from this study is that moderate or second degree malnutrition alters the activation of cultured splenic lymphocytes and should be investigated further. Preliminary results (data not shown) suggest that both CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes are affected. Further studies will also be necessary to confirm the alteration of CD71 and CD25 expression on both subsets of activated T lymphocytes and to evaluate the proliferative ability of activated cells.

In conclusion, the results of the current study suggest that moderate malnutrition is as bad as severe malnutrition with regard to lymphocyte function because it also reduced significantly the expression of lymphocyte activation markers. The data may explain, in part, the increased susceptibility to infection associated with malnutrition.

Acknowledgements

We thank M. V. Z Rocío González for the animal facilities and Dr Mario Altamirano for his suggestions. This work was supported in part by grants from FOMES (México), grant 98-35-28, and SEP (México), grant PIFI 2003-35-19.

References

- 1 Pena M, Bacallao J. Malnutrition and poverty. *Annu Rev Nutr* 2002; **22**:241–53.
- 2 Rice AL, Sacco L, Hyder A, Black RE. Malnutrition as an underlying cause of childhood deaths associated with infectious diseases in developing countries. *Bull World Health Organ* 2000; **78**:1207–21.
- 3 Cravioto J, Arrieta R. Nutrition, mental development, behaviour and learning, 2nd edn. México: INCYTAS-DIF, 1985.
- 4 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.
- 5 Winick M, Noble A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr* 1966; **89**:300–6.
- 6 Galler JR, Kanis KB. Animal models of malnutrition applied to brain research. *Curr Top Nutr Dis* 1987; **16**:57–73.
- 7 Gómez F. Malnutrition. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1946; **3**:543–51.
- 8 Betancourt M, Ortiz R, Gonzalez C. Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation. *Mutat Res* 1992; **283**:173–7.
- 9 Gómez JL, Campos C, Rangel P, Ortiz R. Cell cycle phase duration in bone marrow cells from malnourished rats during suckling. *Mutat Res* 1996; **352**:57–60.
- 10 Ortiz R, Cortés L, González-Marquez H, Gómez JL, González C, Cortés E. Flow cytometric analysis of spontaneous and

- dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes from severely malnourished rats. *Br J Nutr* 2001; **86**:545–8.
- 11 Keusch GT. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J Nutr* 2003; **133**:336S–40S.
 - 12 Scrimshaw NS. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. *J Nutr* 2003; **133**:316S–21S.
 - 13 Schroeder DG, Brown KH. Nutritional status as a predictor of child survival: summarizing the association and quantifying its global impact. *Bull World Health Organ* 1994; **72**:569–79.
 - 14 Flo J, Massouh EJ, Roux ME. Long term effects of malnutrition during lactation on GALT. *Reg Immunol* 1993; **5**:100–5.
 - 15 Flo J, Elias F, Massouh E, Roux ME. Impairment of B and T cell maturation in gut associated lymphoid tissues due to malnutrition during lactation. *Dev Comp Immunol* 1994; **18**:543–55.
 - 16 Woodward B, Hillyer L, Hunt K. T cells with a quiescent phenotype (CD45RA+) are overabundant in the blood and involuted lymphoid tissues in wasting protein and energy deficiencies. *Immunology* 1999; **96**:246–53.
 - 17 Chowdhury FA, Miah RA, Begum M, Rahman KM. The transformation *in vitro* of peripheral lymphocytes of malnourished children. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 1993; **19**:67–70.
 - 18 Nájera O, González C, Toledo G *et al*. Early activation of T, B and NK lymphocytes in infected malnourished and infected well-nourished children. *J Nutr Immunol* 2001; **5**:85–97.
 - 19 Rodriguez L, Gonzalez C, Flores L, Jimenez-Zamudio L, Graniel J, Ortiz R. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; **12**:502–7.
 - 20 von Andrian UH, Sallusto F. Lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 2007; **19**:247–8.
 - 21 Cantrell DA. Regulation and function of serine kinase networks in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2003; **15**:294–8.
 - 22 Pighetti GM, Eskew ML, Reddy CC, Sordillo LM. Selenium and vitamin E deficiency impair transferrin receptor internalization but not IL-2, IL-2 receptor, or transferrin receptor expression. *J Leukoc Biol* 1998; **63**:131–7.
 - 23 Neckers LM, Cossman J. Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**:3494–8.
 - 24 Campbell DI, Murch SH, Elia M *et al*. Chronic T cell-mediated enteropathy in rural west African children: relationship with nutritional status and small bowel function. *Pediatr Res* 2003; **54**:306–11.
 - 25 Si MS, Reitz BA, Borie DC. Inhibition of lymphocyte activation and function by the prenylation inhibitor L-778,123. *Invest New Drugs* 2005; **23**:21–9.
 - 26 Barten MJ, Gummert JF, van Gelder T, Shorthouse R, Morris RE. Flow cytometric quantitation of calcium-dependent and -independent mitogen-stimulation of T cell functions in whole blood: inhibition by immunosuppressive drugs *in vitro*. *J Immunol Meth* 2001; **253**:95–112.
 - 27 Laso FJ, Madruga JI, San Miguel JF *et al*. Long lasting immunological effects of ethanol after withdrawal. *Cytometry* 1996; **26**:275–80.
 - 28 Ortiz R, Cortes E, Gonzalez C, Perez L, Betancourt M. Micro-nucleus frequency in spleen lymphocytes from severely malnourished rats during lactation. *Environ Mol Mutagen* 1995; **26**:55–9.
 - 29 Boule NG, Tremblay A, Gonzalez-Barranco J *et al*. Insulin resistance and abdominal adiposity in young men with documented malnutrition during the first year of life. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; **27**:598–604.
 - 30 Godinez-Fernandez R, Leehan JA, Fierro-Pastrana R, Ortiz-Muniz R. Effect of malnutrition on K+ current in T lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; **12**:808–13.
 - 31 Cunha WD, Friedler G, Vaisberg M, Egami MI, Costa Rosa LF. Immunosuppression in undernourished rats: the effect of glutamine supplementation. *Clin Nutr* 2003; **22**:453–7.
 - 32 Bossuyt PJ, Rector ES, Taylor CG. Dietary zinc deficiency and protein–energy malnutrition decrease *in vitro* murine T lymphocytes cell cycle. *J Nutr Immunol* 2001; **5**:71–84.
 - 33 Zhao Z, Ross AC. Retinoic acid repletion restores the number of leukocytes and their subsets and stimulates natural cytotoxicity in vitamin A-deficient rats. *J Nutr* 1995; **125**:2064–73.
 - 34 Bala S, Failla ML, Lunney JK. Alterations in splenic lymphoid cell subsets and activation antigens in copper-deficient rats. *J Nutr* 1991; **121**:745–53.
 - 35 Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 2001; **69**:4709–18.
 - 36 Green ED, Baenziger JU. Oligosaccharide specificities of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating phytohemagglutinins. Interactions with N-glycanase-released oligosaccharides. *J Biol Chem* 1987; **262**:12018–29.
 - 37 Chilson OP, Kelly-Chilson AE. Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. *Eur J Immunol* 1989; **19**:389–96.
 - 38 Kontny E. Surface markers on human activated T lymphocytes. II. CD4 and CD8 differentiation antigens. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1989; **37**:569–76.
 - 39 Antonaci S, Tortorella C, Polignano A, Ottolenghi A, Jirillo E, Bonomo L. Modulating effects on CD25 and CD71 antigen expression by lectin-stimulated T lymphocytes in the elderly. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1991; **13**:87–100.
 - 40 Giordano C, De Maria R, Todaro M *et al*. Study of T-cell activation in type I diabetic patients and pre-type I diabetic subjects by cytometric analysis: antigen expression defect *in vitro*. *J Clin Immunol* 1993; **13**:68–78.
 - 41 Meier P, Dayer E, Ronco P, Blanc E. Dysregulation of IL-2/IL-2R system alters proliferation of early activated CD4+ T cell subset in patients with end-stage renal failure. *Clin Nephrol* 2005; **63**:8–21.
 - 42 Seiser C, Teixeira S, Kuhn LC. Interleukin-2-dependent transcriptional and post-transcriptional regulation of transferrin receptor mRNA. *J Biol Chem* 1993; **268**:13074–80.
 - 43 Salmeron A, Borroto A, Fresno M, Crumpton MJ, Ley SC, Alarcon B. Transferrin receptor induces tyrosine phosphorylation in T cells and is physically associated with the TCR zeta-chain. *J Immunol* 1995; **154**:1675–83.
 - 44 Batista A, Millan J, Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F, Alonso MA. Recruitment of transferrin receptor to immunological synapse in response to TCR engagement. *J Immunol* 2004; **172**:6709–14.
 - 45 Ellery JM, Nicholls PJ. Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; **13**:27–40.
 - 46 McMurray DN, Bartow RA. Immunosuppression and alteration of resistance to pulmonary tuberculosis in guinea pigs by protein undernutrition. *J Nutr* 1992; **122**:738–43.
 - 47 Dai G, McMurray DN. Altered cytokine production and impaired antimycobacterial immunity in protein-malnourished guinea pigs. *Infect Immun* 1998; **66**:3562–8.
 - 48 Najera O, Gonzalez C, Toledo G *et al*. Early activation of T, B and

- NK lymphocytes in infected malnourished and infected well-nourished children. *J Nutr Immunol* 2001; **5**:85–97.
- 49 Hunter CA, Reiner SL. Cytokines and T cells in host defense. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**:413–18.
- 50 McMurray DN, Loomis SA, Casazza LJ, Rey H, Miranda R. Development of impaired cell-mediated immunity in mild and moderate malnutrition. *Am J Clin Nutr* 1981; **34**:68–77.
- 51 Pelletier DL, Frongillo EA Jr, Schroeder DG, Habicht JP. A methodology for estimating the contribution of malnutrition to child mortality in developing countries. *J Nutr* 1994; **124**:S2106–22.
- 52 Nájera O, González C, Betancourt M, Ortiz R. Malnutrition in Mexico: revision of government programme and the diagnostic studies of national reach. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2001; **58**:120–33.

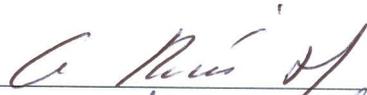
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

EDITH CORTÉS BARBERENA

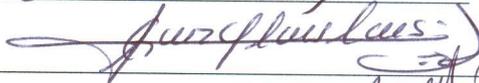
El día 14 de diciembre del año 2009

Sinodales

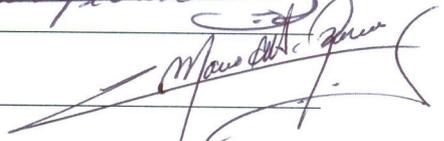
Co-Directora: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz



Co-Director: Dr. José Luis Gómez Olivares



Asesor: Dr. Mario Altamirano Lozano



Sinodal: Dra. Patricia Pérez Vera



Sinodal: Dr. Humberto González Márquez

