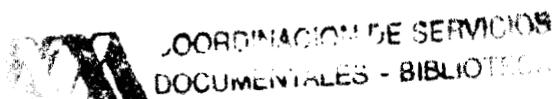


**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**



227413

**Casa abierta al tiempo**

C B S

**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA  
POR CÉLULAS EN NIÑOS DESNUTRIDOS”**

**T E S I S**

Que para optar el grado de

**Doctor en Ciencias Biológicas**

P R E S E N T A

**ORALIA NÁJERA MEDINA**

México, D. F. diciembre de 2001.

“El doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el 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

**ORALIA NÁJERA MEDINA**

El día 12 de diciembre del año 2001

Comité Tutorial:

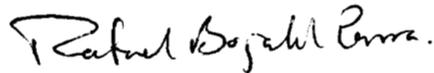
Tutor: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz



Asesor: Dr. José Miguel Betancourt Rule



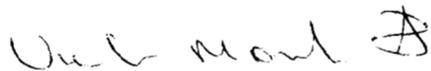
Asesor: Dr. Rafael Bojalil Parra



Sinodal: Dr. Rubén Darío Martínez



Sinodal: Víctor Monteón Padilla



Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo del Departamento de Ciencias de la Salud de la UAM-Iztapalapa.

Comité Tutorial:

Tutora: Dra. Rocío Ortiz Muñiz.

Asesor: Dr. Miguel Betancourt Rule

Asesor: Dr. Rafael Bojalil Parra.

## DEDICATORIAS

Para Elia y Zefe mis padres, que siempre estarán en mi corazón.

Para mis amores quienes le dan sentido a mi vida:

Fernando, mi compañero inseparable, un gran pilar de mi vida.  
Andrea, Miguel y Javier, mis grandes tesoros.

Para mis familiares (Yolanda, Elia, Ana, Jovita, Blanca y Sergio), porque su cariño ha sido muy importante.

A mis comadres (Alenka, Guadalupe, Elena y Valerie), y compadres (Fernando, Jaime, Óscar, Sergio) que han sido los amigos de siempre.

A Inés mi brazo derecho.

A los compañeros del Laboratorio de Biología Celular (Rocío, Miguel, Cristina, Edith, Lety, Eduardo, Humberto y Edmundo) por su apoyo y por la amistad que me han brindado.

## AGRADECIMIENTOS

Un especial y cariñoso agradecimiento a la Dra. Rocío Ortiz Muñiz por su apoyo entusiasta y dirección de esta tesis.

Al Dr. Miguel Betancourt Rule por su paciencia e indispensable guía.

A Cristina González Torres por haber compartido conmigo todos los momentos.

A la Dr. Guadalupe Toledo y Dr. Laura López de los Hospitales Pediátricos del DDF Xochimilco e Iztapalapa, por su ayuda en la obtención de las muestras que hicieron posible este trabajo.

A los Doctores:

Rafael Bojalil Parra  
Rubén Darío Martínez  
Víctor Monteón Padilla

Por su amable ayuda en la revisión de la tesis y sus valiosas sugerencias.

Al M en C. Arturo Preciado López por su ayuda en la obtención de muestras en niños sanos.

A la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA que a través de sus instancias me ha apoyado y ha permitido mi formación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)  
3005P-M9606, F282-M-9208 y 114128/114816.  
A FOMES 98-35-28.

## ÍNDICE

	PAGINAS
RESUMEN	1
ABSTRACT	8
ANTECEDENTES	
I. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA DESNUTRICIÓN	13
II. CAUSAS DE LA DESNUTRICIÓN	15
III. EFECTOS DE LA DESNUTRICIÓN EN EL METABOLISMO DE LOS NIÑOS	19
IV. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA DESNUTRICIÓN SEVERA	
A. Marasmo	22
B. Kwashiorkor	23
C. Desnutrición Mixta (Kwashiorkor Marasmáticos)	24
V. ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS DE LA DESNUTRICIÓN	25
A. Inmunidad Natural	25
B. Inmunidad Adquirida	26
JUSTIFICACIÓN	31
OBJETIVO GENERAL	31

<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	32
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	33
<b>METODOLOGÍA</b>	
I. DATOS GENERALES DE LAS MUESTRAS DE LOS PACIENTES	34
II. MÉTODO Y TÉCNICAS EMPLEADAS	37
A. Detección de los Diferentes Tipos de Leucocitos y Sub-poblaciones de Linfocitos	38
B. Análisis de la Activación/Funcionalidad de las Sub-poblaciones de Linfocitos	41
C. Análisis de las Muestras para Ambas Metodologías	43
D. Análisis Estadístico	43
III. CITÓMETRO DE FLUJO	45
A. Programa de AutoCOMP	47
B. Programa Lysys II	47
<b>RESULTADOS</b>	
I. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	54
II. INTERVALOS DE REFERENCIA DE LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN NIÑOS PREESCOLARES SANOS	55
A. Leucocitos en Preescolares Sanos	56
B. Sub-poblaciones de Linfocitos en Preescolares Sanos	57
C. Células Nativas, de Memoria y Dobles Positivas en Preescolares Sanos	59

III. ACTIVACIÓN DE LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN NIÑOS PREESCOLARES SANOS	62
A. Activación de Sub-poblaciones de Linfocitos T (CD3 <sup>+</sup> ) en Preescolares Sanos	63
B. Activación de Sub-poblaciones de Linfocitos B (CD19 <sup>+</sup> ) y NK (CD56 <sup>+</sup> ) en Preescolares Sanos	65
IV. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO (BNI Y DES) CON LOS VALORES DE REFERENCIA OBTENIDOS DE LOS NIÑOS PREESCOLARES SANOS EN LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS	67
A. Leucocitos en los Grupos de Estudio	67
Leucocitos por tipo de infección y tipo y grado de desnutrición	68
B. Sub-poblaciones de Linfocitos en los Grupos de Estudio	69
Sub-poblaciones de linfocitos por tipo de infección y tipo y grado de desnutrición	70
C. Células Nativas, de Memoria y Dobles Positivas en los Grupos de Estudio	71
Células nativas, de memoria y dobles positivas por tipo de infección y tipo y grado de desnutrición	73
V. ACTIVACIÓN DE SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO	75
A. Linfocitos T(CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> ), B (CD19 <sup>+</sup> ) y NK (CD56 <sup>+</sup> )	75
B. Expresión del Antígeno CD69 en los Grupos de Estudio	76

Sub-poblaciones de linfocitos y expresión del antígeno CD69 por tipo de infección	78
Sub-poblaciones de linfocitos y expresión del antígeno CD69 por tipo y grado de desnutrición	79
<b>DISCUSIÓN</b>	81
<b>I. INTERVALOS DE REFERENCIA DE LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN NIÑOS PREESCOLARES SANOS</b>	82
A. Leucocitos en Preescolares Sanos	82
B. Sub-poblaciones de Linfocitos en Preescolares Sanos	83
C. Células Nativas, de Memoria y Dobles Positivas en Preescolares Sanos	85
D. Activación de las sub-poblaciones de linfocitos en Preescolares Sanos	86
<b>II. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO (BNI Y DES) CON LOS VALORES DE REFERENCIA OBTENIDOS DE LOS NIÑOS PREESCOLARES SANOS EN LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS</b>	87
A. Sub-población de Linfocitos en los Grupos de Estudio	87
B. Células Nativas, de Memoria y Dobles Positivas en los Grupos de Estudio	91
<b>III. ACTIVACIÓN DE LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO</b>	94

<b>CONCLUSIONES</b>	98
I. EN EL GRUPO TESTIGO (NIÑOS BIEN NUTRIDOS)	98
II. EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO	
A. Niños Bien Nutridos Inyectados	99
B. Niños Desnutridos Inyectados	99
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	101

## **GLOSARIO**

### **ANEXO I**

CUADROS DE LOS DATOS INDIVIDUALES DE LOS  
DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO

### **ANEXO II**

ARTÍCULOS COMO PRODUCTOS DIRECTOS DE LA TESIS

## RESUMEN

La desnutrición calórico-proteínica es un problema de salud pública que aunada a los procesos infecciosos se coloca en las primeras causas de morbilidad y mortalidad infantil. La susceptibilidad de los individuos desnutridos a padecer infecciones, se ha asociado al efecto de la desnutrición sobre los mecanismos de defensa inmunológica, por lo que se les ha considerado como pacientes inmunodeficientes, en especial a niños y personas de edad avanzada.

Actualmente existen numerosos reportes de investigación sobre el daño encontrado en el sistema inmune de niños con desnutrición severa, tanto en órganos primarios, como en órganos secundarios. Con relación a la inmunidad natural y la inmunidad adquirida, también se han realizado diversos estudios sobre el daño que se observa, aunque en algunos de ellos existen controversias.

Con relación a la inmunidad mediada por células, que es el objeto de estudio de este trabajo, se ha encontrado una gran variedad de resultados. Algunos autores reportan número normal de linfocitos T en sangre periférica, otros una disminución cuantitativa de ellos; para otros autores son los linfocitos T CD4<sup>+</sup> los que se encuentran disminuidos y los T CD8<sup>+</sup> aumentados. En el caso de activación/funcionalidad, algunos autores consideran que la respuesta de los linfocitos a la acción de los mitógenos se encuentra disminuida, en cambio otros consideran que es normal y un tercer grupo considera que su respuesta se encuentra aumentada.

A partir de la diversidad de resultados, tanto en sub-poblaciones de linfocitos como en su funcionalidad, se consideró importante continuar con las investigaciones que permitieran contribuir al conocimiento del efecto de la desnutrición sobre las diferentes sub-poblaciones y funcionalidad de los linfocitos en sangre periférica.

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar la respuesta inmune mediada por células en niños bien nutridos con infección y niños con desnutrición moderada y severa, ambos con infección. La evaluación consistió en medir en sangre periférica el porcentaje de las sub-poblaciones de linfocitos: T (CD3<sup>+</sup>) y dentro de ellos los T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, B (CD20<sup>+</sup>) y NK (CD56<sup>+</sup>).

Además, se determinaron las células CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>-</sup> (nativas), CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> (dobles positivas) y CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> (de memoria) en el total de los linfocitos y dentro de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

También se evaluó la funcionalidad de los linfocitos a través del empleo de mitógenos (PHA, PWM e IL-2) *in vitro* y por medio de la expresión del antígeno de activación temprana CD69.

Para lograr estos objetivos se utilizaron dos ensayos metodológicos, ambos empleando la citometría de flujo:

1. A través de la técnica de citometría de flujo se identificaron, las diferentes poblaciones de células en sangre de los niños empleando una mezcla de dos o tres anticuerpos monoclonales de diferente especificidad, conjugados con diversos fluorocromos. Con esta metodología de lisis con lavado se identificaron y enumeraron simultáneamente los diferentes tipos celulares de sangre periférica. Se determinó primeramente el porcentaje de linfocitos, granulocitos y monocitos. Posteriormente en la región de linfocitos se determinaron los porcentajes de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), B (CD20<sup>+</sup>), NK (CD56+CD16) y T Activos (HLA-DR<sup>+</sup>).

También se identificaron las células nativas (CD45RA<sup>+</sup>) dobles positivas (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) y de memoria (CD45RO<sup>+</sup>) en el total de los linfocitos y dentro de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

2. Se midió la funcionalidad de los diferentes linfocitos T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), B (CD19<sup>+</sup>) y NK (CD56<sup>+</sup>), en ensayos de sangre completa, se indujo la activación de linfocitos *in vitro* con mitógenos: la fitohemaglutinina (PHA) y el CD2-CD2R (control positivo) para linfocitos T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>); el mitógeno de fitolaca, pokeweed (PWM) para linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) y la interleucina 2 (IL-2) para linfocitos NK (CD56<sup>+</sup>). Para determinar la intensidad de la activación se emplearon una mezcla de anticuerpos de tres colores de diferente especificidad conjugados con diversos fluorocromos. Con ésta metodología de lisis sin lavado se evaluó la activación/funcionalidad, detectando la expresión del antígeno de activación temprana CD69.

Estas dos modalidades metodológicas fueron aplicadas en tres grupos de estudio: en niños bien nutridos sanos, en niños bien nutridos con infección y en niños desnutridos infectados. Para lograr los objetivos planteados se determinaron en un primer momento los valores en el grupo testigo, formado por los niños bien nutridos sanos, tanto en las sub-poblaciones de linfocitos como en la activación de linfocitos. Estos datos sirvieron de base para detectar los cambios que pudieran presentar los niños bien nutridos infectados que reflejan las alteraciones relacionadas con la infección. Posteriormente al establecer las comparaciones entre los niños bien nutridos infectados y los desnutridos con infección se lograron detectar las alteraciones provocadas por la desnutrición.

Los datos se presentan en medidas de tendencia central, promedio  $\pm$  el error estándar. Se realizó un análisis multivariado, utilizando el programa de JMP, y las diferencias estadísticas se definieron con la prueba no paramétrica de Wilcoxon y Kruskal-Wallis. La significancia fue establecida con una  $p < 0.05$ .

Las aportaciones principales del presente trabajo son:

A. Se definieron los valores del grupo control en niños bien nutridos preescolares sanos, para las sub-poblaciones de linfocitos y su respuesta *in vitro* incubados con mitógenos, para el Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la UAM-I; estableciéndose que en estos niños los ajustes y desplazamientos de las células linfoides se realiza entre los primeros dos años de la vida, dado que después de esta edad sus porcentajes de linfocitos a nivel de sangre periférica se asemejan a la de los adultos jóvenes.

En las células nativas, de memoria y dobles positivas se encontró que tanto en el total de los linfocitos como dentro de las células CD4<sup>+</sup>, las células nativas disminuyeron y las células de memoria aumentaron con la edad. El aumento de la fracción de células de memoria con la edad se puede relacionar con la exposición a antígenos en los primeros años de la vida y al proceso de maduración del sistema inmune.

B. Sobre la activación de los linfocitos en los niños bien nutridos sanos se observó que además del ajuste y movilización de los linfocitos en los primeros años de la vida, también presentan diferencias con la edad para responder ante un mitógeno *in vitro*, mostrando los niños menores de tres años porcentajes menores de activación, a los que mostraron los niños mayores de tres años. Esto podría relacionarse con la inmadurez del sistema inmune que puede coincidir con la susceptibilidad de los niños menores de tres años a contraer un mayor número de enfermedades.

C. La comparación de los datos observados en las sub-poblaciones de linfocitos T con relación a los niños bien nutridos infectados y los niños desnutridos indican que los cambios encontrados están vinculados a las infecciones que padecen estos niños. Los niños desnutridos mostraron tendencias similares en las sub-poblaciones de linfocitos T a las de los niños bien nutridos infectados. Lo anterior indica que no

hay alteraciones asociadas con la desnutrición en las sub-poblaciones de linfocitos T. En cambio se observó que en los linfocitos B, los niños bien nutridos con infección tienden a aumentar significativamente esta subpoblación, en comparación con el grupo testigo, situación que no se vio reflejada en los niños desnutridos. El porcentaje de linfocitos B (CD20<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>) se encontró significativamente disminuido en los niños desnutridos con relación a los niños bien nutridos con infección, situación que señala que esta alteración está asociada con la desnutrición. En los linfocitos NK no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio.

En las células nativas, de memoria y dobles positivas en el total de los linfocitos no se encontró diferencia significativa en los grupos de estudio. En la expresión de la isoformas CD45RA y CD45RO en los linfocitos CD4<sup>+</sup> los niños bien nutridos infectados exhibieron un porcentaje aumentado de células de memoria como respuesta a la infección. Los niños desnutridos mostraron un mayor porcentaje de la fracción de células dobles positivas y un porcentaje menor de las células de memoria a las que presentaron los niños bien nutridos infectados. Por lo anterior se podría considerar que los niños desnutridos mantienen una acumulación de células dobles positivas, por la incapacidad de concretar el cambio en la transición de dobles positivas a células de memoria de las isoformas CD45.

D. En la activación de las sub-poblaciones de linfocitos T con mitógenos se observó que los niños bien nutridos infectados ante la presencia de un estímulo tienen la capacidad de responder y activar un mayor número de células en comparación con el grupo testigo (sin infección). En las muestras de los niños desnutridos se manifestó una alteración en la activación de los linfocitos T CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> para reaccionar ante la presencia de mitógenos *in vitro*, y con relación a lo mostrado por los niños bien nutridos infectados. La activación de los linfocitos B (CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) y NK (CD56<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) fue similar en los tres grupos de estudio.

Los resultados indican que la desnutrición afecta principalmente la funcionalidad de las sub-poblaciones de linfocitos T y no la presencia de estas sub-poblaciones en sangre periférica. Esta afirmación se sustenta en lo que se observó en la activación y en las sub-poblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup> dobles positivos y de memoria. Los bajos porcentajes mostrados en las células CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (de activación temprana) y la mayor proporción de células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> (dobles positivas) y menor proporción de células CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (memoria, activación tardía) sugieren que los niños desnutridos muestran trastornos en el proceso de activación y de diferenciación de los linfocitos T para hacer frente a la agresión de antígenos extraños y desencadenar los mecanismos efectores necesarios para eliminar los agentes patógenos. Es probable que esta deficiencia para desencadenar mecanismos efectores eficientes se relacione con el bajo promedio de células B, traducándose en una imposibilidad de movilizar estas células a través del organismo. Estas alteraciones podrían explicar el gran número de infecciones (inmunodeficiencia) de las que son presas estos niños.

Se propone que las alteraciones en la funcionalidad de los linfocitos T observadas en los niños con desnutrición, podrían estar relacionadas con diferentes mecanismos: 1) Alteraciones en el proceso de activación de los linfocitos T a nivel del receptor TCRCD3 y/o de las moléculas accesorias; 2) Falta de nutrientes que disminuyan la síntesis de proteínas, que permitan crear las moléculas de superficie que actúan como receptores de las señales bioquímicas para desencadenar la diferenciación de las células; 3) Otra posibilidad es la combinación de ambas. 4) Además también se ha señalado que se podría relacionar con la alteración en la producción de citocinas las cuales median y regulan la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos.

Se encontraron anomalías en los niños con desnutrición moderada, tanto en sub-poblaciones de linfocitos como en la activación de estos, ya que hasta ahora han

sido reportados como pacientes que no se presentan daño en el sistema inmune. Algunos casos incluso presentaron mayor deterioro al mostrado en los niños marasmáticos. Sin embargo es importante aumentar el número de pacientes con desnutrición moderada para poder valorar claramente las diferencias exhibidas por cada tipo y grado de desnutrición.

Por último, se considera que las pruebas de activación temprana (CD69) de linfocitos y los isotipos CD45RO (memoria) y CD45RA/CD45RO (dobles positivas) mostraron ser una importante prueba de inmunodepresión.

## ABSTRACT

Protein-energy malnutrition (PEM) associated infections have been considered as the major causes of children morbidity and mortality. Malnourished individuals are more susceptible to infection, and thus, they are considered as immunodeficient.

Several reports exist concerning the damage found in primary and secondary organs of the immune system in children with severe malnutrition. In relation to the natural and acquired immunities, some controversies have been reported. For example, concerning the cell-mediated immune response, controversial results in peripheral lymphocyte subpopulation have been found as some authors report an adequate number of T lymphocytes; while others found significantly lower numbers in malnourished than in well-nourished children. Furthermore, increased amount of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes over CD4<sup>+</sup> have been described.

Some authors found that lymphocytes of malnourished children show an impaired activation capability, while an increased response to mitogens are reported elsewhere. A third research group found a similar responses in malnourished and well-nourished children.

Taking into account the diversity of the reports, and in order to assess the effects of infection and malnutrition it has been considered important to study the proportion of peripheral lymphocyte subsets and their activation capability.

The aim of this study was to evaluate the cell-mediated immune response in malnourished infected (second and third malnutrition degree), well-nourished infected and non-infected children.

The evaluation consisted in determination in peripheral blood of:

a) the lymphocyte subsets: T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>), B (CD20<sup>+</sup>) and NK (CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>).

b) CD45RA and CD45RO antigen isoforms: CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>-</sup> (Naive cells), CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> (Ddull positive cells) and CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> (memory cells). The distribution was analyzed in total lymphocytes, and in T CD4<sup>+</sup> lymphocytes cell subsets.

c) Early activation of lymphocytes T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>), B (CD19<sup>+</sup>) and NK (CD56<sup>+</sup>) with the mitogens PHA, PWM and IL-2 respectively. This response was measured by analyzing the expression of the early activation antigen CD69.

Analyses were carried out using flow cytometry assays. Peripheral lymphocyte subsets were determined using techniques for simultaneous, direct, two or three-colour immunofluorescence staining. Commercially conjugated monoclonal antibodies were fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) and peridin-chlorophyll protein (PerCP) dyes. First, the percentages of leukocytes (lymphocytes, monocytes and granulocytes) were determined. Then a gate was set on the FSC-SSC to obtain lymphocytes region. The fraction of lymphocytes T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>), B (CD20<sup>+</sup>), NK (CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) and T (HLA-DR<sup>+</sup>) was detected. In addition, the distribution of naïve (CD45RA<sup>+</sup>) Ddull (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) and memory (CD45RO<sup>+</sup>) cells was analyzed for all lymphocytes and within gate of T CD4<sup>+</sup> cells. Monoclonal reagents included: (1) isotype control; (2) CD45 FITC/CD14 PE; (3) CD45RA FITC; (4) CD45RO PE; and (5) CD4 PerCP.

Early activation of T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), B (CD19<sup>+</sup>) and NK lymphocytes (CD56<sup>+</sup>) were evaluated. Three mitogens were used to activate different lymphocyte subsets: phytohemagglutinin (PHA) for T lymphocytes. Pokeweed (PWM) for B

lymphocytes and interleukin 2 (IL-2) for NK lymphocytes. CD69 expression was used to obtain subset-specific information about lymphocyte activation.

All these analyses were done in three groups of children: 1) malnourished infected (with second and third degree of malnutrition), 2) well-nourished infected and 3) non-infected well-nourished children.

Well-nourished children had normal weight and height. Infected children showed severe bacterial infection either respiratory or gastrointestinal.

First of all, the age relationships were evaluated, the range for each lymphocyte and their activation capability were determined in a control group (well-nourished uninfected children). Analyze of these three groups were performed in order to identify possible infection-related and malnutrition-related alterations. In general, malnourished children had severe infections; therefore the inclusion of a group of well-nourished infected children hospitalized by severe infections, was considered important. This group might indicate infection related changes. The analysis was carried out in whole blood samples collected the day of hospital admission and prior to treatment.

Results were expressed as mean  $\pm$  standard error, and compared using the ANOVA and nonparametric Wilcoxon/Kruskal-Wallis tests, with the JMP statistics program. Statistical significance was considered when  $p < 0.05$ .

The most relevant findings of this work were,

**A.** Lymphocyte subsets and their response to mitogens for well-nourished uninfected children were established. The results obtained indicate: (i) That changes in lymphocytes subsets are present during the first two years of age. After this period the percentages of peripheral blood lymphocytes are similar to those observed in

young individuals. (ii) A decrease of naive cells and increase in memory cells are age related. This was observed for all lymphocytes and for T CD4<sup>+</sup> cells. The increase in the fraction of memory cells may be related with the recall antigenic stimulation and the maturation of the immune system in the first years of life. (iii) Activation capability is also age related. Lymphocytes from children of three years or more, showed an increased response to mitogens as compared to those observed in smaller children. This may be related with immaturity of the immune system.

**B. Infection related changes.** (i) Concerning the subpopulation, the B lymphocyte percentages (CD19<sup>+</sup>) were increased in well-nourished infected children. T (CD3<sup>+</sup>) lymphocyte content in well-nourished children was significantly lower in infected compared to non infected children. (ii) In CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> isoforms, well-nourished infected children showed increased percentages of memory cells, an expected response to infection. (iii) In well nourished infected children a higher capability to activate lymphocytes CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> cells was found.

**C. Malnutrition related changes.** (i) A decreased proportion of lymphocytes B was found. (ii) An increased proportion of CD4<sup>+</sup> Ddull cells and the decrease of CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells in malnourished children may be due to an alteration when switching from the Ddull to memory cells. The CD45RO<sup>+</sup> cells may reexpress a Ddull phenotype. (iii) An impaired activation capability in lymphocytes T (CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) of malnourished than those observed in well-nourished infected children was found.

There are several factors that may contribute to immune system alteration processes in malnourished children: the activation incapability of the T cell receptor (TCR/CD3) or the accessory molecules; lack of nutrients which would alter the production of new proteins needed to synthesize surface receptors to trigger cell differentiation; a combination of both mechanisms.

In conclusion:

The immune system impairment in severe malnourished children may be related mainly to the altered physiology of lymphocytes T CD3<sup>+</sup>, rather than to a fall in the number of peripheral blood lymphocyte T subpopulations. The data obtained in this work indicate that the analysis of CD45RO<sup>+</sup> and CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> expression on CD4<sup>+</sup> lymphocytes and early activation (CD69) were a valuable immunosuppression test in malnutrition. This sort of analysis in malnourished infected children may help to understand the mechanisms of immunodeficiency in malnutrition. Further studies using in vitro activation and other surface antigens may be necessary to support this finding.

## ANTECEDENTES

### I. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA DESNUTRICIÓN

La desnutrición calórico-proteínica asociada con procesos infecciosos es la principal causa de morbilidad y mortalidad infantil en países subdesarrollados. El estado nutricional de un individuo tiene un efecto importante sobre la evolución de las enfermedades infecciosas como las diarreas, las neumopatías e infecciones vírales como el sarampión, las que en individuos eutróficos son controlables, pero que pueden ser letales en niños desnutridos, ya que existen limitaciones importantes en las reservas energéticas y de otros nutrimentos para mantener el estado de homeostasis y responder a los cambios bioquímicos, hormonales y metabólicos desencadenados durante la infección, la cual por sí misma agrava el ya precario estado nutricional (Kumate y col, 1994).

En un estudio que abarcó a 53 países en vías de desarrollo, las defunciones infantiles se atribuyeron a los efectos de la desnutrición en 56% de los casos, sin embargo, los autores concluyeron que más de la mitad de la mortalidad infantil atribuible al sinergismo desnutrición-infección, está relacionada más con la desnutrición moderada que con la desnutrición severa (Pelletier y col, 1996). En un estudio realizado por la OMS (Onís y col, 1993) se encontró que los continentes más afectados son Asia y África, en América Latina se encuentran los casos menos graves; sin embargo, la desnutrición es considerada como la responsable directa o indirecta de un tercio de la mortalidad infantil de niños menores de 6 años, asociada con procesos infecciosos en Latinoamérica (Cravioto y col, 1990).

En el caso de México se sabe que la desnutrición no se presenta de manera homogénea en todo el país, de acuerdo a las encuestas realizadas por el Instituto

Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición de 1974 a 1989 la comparación histórica de los niveles de desnutrición fue de poca variación observada durante esa época, en el periodo de 15 años cubierto por estas investigaciones. La encuesta de 1989 reforzó información cuyas tendencias ya habían sido reveladas por las encuestas anteriores, por ejemplo, la zona norte fue la que mostró los niveles de desnutrición más bajos. Un dato nuevo fue que también la zona norte exhibió la mayor mejoría en la prevalencia de la desnutrición; de presentar un 12% de desnutrición moderada pasó a un 5%. La zona del centro del país también presentó cierta mejoría pero con alto porcentaje de desnutrición moderada (14%). Los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas que han manifestado siempre niveles de desnutrición alta, presentaron un mayor deterioro de 1974 a 1989, al pasar de un 28% en desnutrición moderada y severa a un 34%. Un resultado de gran relevancia fue la estimación de la mortalidad infantil en el medio rural, la cual era de 90 de cada mil niños nacidos vivos en las comunidades menores de 2 500 habitantes. Estas cifras se ubican 50 puntos por arriba del promedio nacional, y más de 70 con relación al DF (Ávila y col, 1993). La Península de Yucatán que en 1979 había mejorado con relación a las encuestas de 1974, ahora presentaba un retroceso junto con todas las regiones indígenas tropicales de la vertiente del golfo de la Sierra Madre Oriental (sobre todo la Huasteca y la Sierra de Puebla) y las áreas indígenas centrales como la zona Mazahua, el Mezquital y parte de Tlaxcala y Puebla (Chávez y col, 1990).

En la Cuarta Encuesta Nacional de Alimentación en el Medio Rural Mexicano (ENAL 96) se encontró que la prevalencia de desnutrición en el medio rural fue del 43% de acuerdo con el indicador peso/edad: 26% para desnutrición leve, de 13% para la forma moderada y 4% para la forma severa, sin embargo los estados de Guerrero, Yucatán, Puebla, Oaxaca y Chiapas presentan una prevalencia de desnutrición moderada y severa superior a 20%, mientras que en Tamaulipas, Sinaloa, Jalisco, Durango, Coahuila, Baja California y Sonora la prevalencia de la

desnutrición moderada y severa fue inferior al 8%. En poblaciones indígenas el porcentaje del indicador peso/edad de desnutrición severa se elevó hasta un 8%; además en algunas zonas como Guerrero, Michoacán, Tlaxcala y sur de Puebla se detectó un deterioro entre 1989 y 1996, pues la desnutrición fue superior al 55% y las formas moderada y severa se incrementaron de 16 a 25% (Ávila y col, 1998).

## **II. CAUSAS DE LA DESNUTRICIÓN**

La desnutrición es un problema importante de salud en pediatría; sobre todo para países en desarrollo como México, pero también para países desarrollados. Las causas de la desnutrición (Kumate y col, 1994) son similares para ambos tipos de países, cambiando en algunas ocasiones la importancia relativa de las siguientes causas:

1. Aporte de nutrimentos inadecuado por ingesta insuficiente, malos hábitos de alimentación o restricción de la misma por costumbres culturales o religiosas.
2. Inadecuada utilización de los nutrimentos por problemas de absorción deficiente (enfermedades inflamatorias gastrointestinales, deficiencias enzimáticas).
3. Incremento de la demanda de nutrimentos, que puede ser por efecto directo, como el caso de neoplasias, hipertiroidismo, infecciones agudas o crónicas y situaciones de estrés como traumatismo y cirugía. El incremento de la demanda en forma indirecta se debe a enfermedades crónicas que condicionan por sí mismas o por efecto del tratamiento, a la anorexia la cual disminuye la ingesta, o bien, a consecuencia de infecciones de repetición o crónicas de difícil control, neoplasia, enfermedades degenerativas de la colágena, cardiopatías congénitas, insuficiencia renal crónica, inmunodeficiencias primarias o adquiridas. Otra circunstancia que se puede considerar multifactorial es el bajo peso al nacer como causante de desnutrición.

El problema de morbilidad y mortalidad infantil por desnutrición en la gran mayoría de los casos se debe al primer punto, es decir, por un aporte de nutrimentos inadecuado por ingesta insuficiente. Desde 1946 Federico Gómez definió las causas de la desnutrición, señalando que en el 90% de los casos se debe a subalimentación del sujeto, bien sea por la calidad o por la cantidad de los alimentos consumidos, donde la pobreza, la ignorancia y el hambre juegan un papel importante y se disputan la primacía de la causalidad. También señaló que “la infección prolongada conduce a la desnutrición y la desnutrición prolongada, por su parte expone al organismo a la invasión fácil de las infecciones”.

La desnutrición inevitablemente se asocia con la pobreza, lo cual implica condiciones vinculadas a la salud con necesidad no sólo de alimentación, sino de estímulos, educación, recursos, etc. (Paget, 1993). La desnutrición se presenta fundamentalmente en niños lactantes y preescolares, principalmente en los lactantes destetados tempranamente, que reciben dietas deficientes en proteínas de origen animal, acompañada de ingestión variable de alimentos ricos en carbohidratos y sufren infección gastrointestinal intercurrente o de algún padecimiento acompañado de fiebre elevada (Arrieta & Cravioto, 1982). El marasmo es sobre todo una enfermedad de la lactancia (los primeros 12 meses) en tanto que el kwashiorkor es más común durante el segundo y tercer año de vida. Las formas subclínicas se caracterizan por el retraso del crecimiento y desarrollo, y se les llama formas leves o moderadas. El organismo sometido a un menor suministro de alimentos tiene una capacidad considerable de adaptación. Los requerimientos decrecen como resultado de una menor actividad y en el caso de una persona joven disminuye el crecimiento. Las necesidades de energía basal se satisfacen al principio extrayendo un pequeño depósito de glucógeno, pero durante el ayuno de varios días o semanas se cataboliza el tejido adiposo y en forma creciente las proteínas tisulares (McLaren & Meguid, 1993).

En la desnutrición calórico-proteínica también se reduce la ingestión de otros nutrientes esenciales como vitaminas y minerales. La deficiencia de estos micronutrientes con los que suele acompañarse la desnutrición afecta significativamente el sistema inmunitario, pero su contribución e importancia en la rehabilitación dietética aún no son claras. Existe controversia si los trastornos del sistema inmune son resultado de la privación proteínica o por la reducción de factores específicos como hierro o zinc (Feldman, 1990).

Los casos extremos de desnutrición se conocen con el nombre de desnutrición calórico-proteínica (DCP), su presencia está determinada por una serie de factores que incluyen: edad del niño, edad del destete, edad de introducción de alimentación suplementaria, cantidad de calórica y concentración proteínica de los suplementos que ingiere el niño, así como a la frecuencia y gravedad de procesos infecciosos. El conjunto de síntomas, de signos clínicos y valores bioquímicos que se observan se desarrollan cuando las células del organismo no cuentan con las cantidades de nutrientes esenciales para las funciones metabólicas normales (Arrieta & Cravioto, 1982). Distintos órganos y tejidos sufren las consecuencias de la desnutrición a diferentes tiempos y velocidades, al parecer relacionadas con la cinética de proliferación celular, la cantidad y la tasa de síntesis de proteínas y con el papel de los nutrientes específicos en las vías metabólicas (Chandra, 1991).

El marasmo y el kwashiorkor son las dos manifestaciones clínicas extremas de DCP. Sin embargo, los factores que determinan que el kwashiorkor o el marasmo se desarrollen permanecen desconocidos. Marasmo ha sido descrito como una adaptación a la ingesta calórico-proteínica inadecuada y el kwashiorkor como una inadaptación (Roa, 1974). En otros casos al marasmo se le asocia con una falta de alimentación severa, una prolongada inanición, con destete temprano o ayuno frecuente del infante y el kwashiorkor con destete tardío y una ingesta pobre en

proteínas. Diarrea crónica o recurrente e infecciones son una característica común en ambos casos (Torún & Chew, 1994). En el marasmo se habla de una deficiencia de energía y de todos los nutrientes, pero en el kwashiorkor resulta de la deficiencia de proteínas y en menor grado, de otros nutrientes en presencia de un aporte energético adecuado o aun excesivo (Luengas & Valenzuela, 1993)

En el caso del kwashiorkor se ha propuesto otra teoría la cual postula que las formas clínicas que adquieren estos pacientes se deben a un desbalance entre la producción de radicales libres (en la cadena respiratoria mitocondrial y en el catabolismo de grasas) en los pacientes y su disposición. Lo cual supondría dos causales primarias, las determinadas por la dieta y las nocivas que inhabilitan la respuesta al estrés para renovar y liberar los metabolitos y tóxicos intermedios (Golden, 1988).

En general, para el caso de México se considera que el marasmo predomina en las áreas urbanas, en tanto que el kwashiorkor prevalece en áreas rurales, con tendencia a ser desplazado por el marasmo a medida que disminuye la alimentación al seno materno y las condiciones ambientales se modifican (Arrieta & Cravioto, 1982) como la urbanización.

Una característica común de los pacientes con DCP es la gran facilidad en que tienden a contraer enfermedades infecciosas como: tuberculosis, parasitismos graves, sarampión, tos ferina, episodios diarreicos agudos repetidos, paludismo, herpes simple, septicemia gramnegativa y otras enfermedades crónicas. La interacción entre la desnutrición e infecciones es fundamental en la patogénesis de la DCP, y es un factor precipitante y agravante de la morbilidad y mortalidad de estos niños. Desde 1958 Gómez y col, llegaron a la conclusión de que, la desnutrición propiciaba la muerte, pero son las infecciones y el desequilibrio hidroelectrolítico lo que realmente mataba a los niños.

Para definir el grado de desnutrición internacionalmente, se ha utilizado la clasificación propuesta por Federico Gómez en 1946, en la cual se valora el índice peso/edad, que resulta útil para niños menores de cinco años. La severidad de la desnutrición se reconoce clínicamente y se clasifica según el déficit de peso que tengan los niños en relación con el peso del percentil 50 de los niños de su misma edad. La desnutrición se clasifica en:

**Primer Grado de Desnutrición.** A la pérdida del 10 al 24% del peso del paciente con respecto a su edad

**Segundo Grado de Desnutrición.** Pérdida del 25 al 40% del peso corporal.

**Tercer Grado de Desnutrición.** Pérdida de peso del organismo mayor del 40%.

Los niños con edema siempre deberán clasificarse como desnutridos de tercer grado.

### **III. EFECTOS DE LA DESNUTRICIÓN EN EL METABOLISMO DE LOS NIÑOS**

La desnutrición se caracteriza por una disminución en el crecimiento y pérdida de peso, esta es la manifestación clínica más obvia y la forma básica de varias clasificaciones antropométricas de la desnutrición. En el marasmo como el peso y los requerimientos nutricionales están disminuidos, el metabolismo se reduce simplemente sobre la base de la disminución de la masa, dado de que cada gramo del tejido del cuerpo requiere menos energía. Esto se puede hacer por dos vías: a) Primera, se ha observado en medidas dinámicas como una alta proporción de aminoácidos liberados de proteínas que durante el rompimiento de tejidos son utilizados para resintetizar tejido en lugar de ser oxidado. b) Segunda y la más

importante, hay una reducción en el trabajo real desarrollado por el cuerpo, a varios niveles de organización (en órganos, tejidos, células, organelos y mecanismos enzimáticos). Todos los procesos del cuerpo muestran una adaptación reductible. Una de las adaptaciones reductibles fundamentales es la disminución de la actividad de la bomba de sodio (la cual en condiciones basales requiere de un tercio de la energía); otra adaptación es la concentración máxima y la habilidad de dilución a la que el riñón es severamente restringido, para evitar excreciones de ion hidrógeno libre, amonio y sodio; un considerable ahorro es alcanzado por una reducción en la intensidad de la transformación de proteínas (Golden y col, 1977).

Hay reducción en la producción de ácido gástrico, el intestino se encuentra atrófico con disminución importante en la producción de enzimas pancreáticas, enzimas celulares y del sistema de transporte de la absorción de nutrientes (James, 1970). La necesidad de mantener la homeostasis de energía, promueve la glucogénesis y la movilización de ácidos grasos, en consecuencia, aumenta la concentración plasmática de cortisol y de la hormona adrenocorticotrófica; así mismo, disminución de la hormona tiroidea  $T_3$ , lo que puede hacer considerar a los niños desnutridos con cierto grado de hipotiroidismo (Casanueva y col, 1995). Hay una reducción en la concentración de magnesio, zinc, cobre, manganeso y probablemente selenio en los tejidos; el fierro es la única excepción (Golden & Golden, 1981).

Una característica del kwashiorkor es la presencia de hígado graso, que mediante biopsia se ha documentado que existe una disminución en el contenido de glucógeno e infiltración grasa en los hepatocitos, lo cual se considera como un resultado de un ataque multifactorial producido, entre otros, por micotoxinas, contaminantes ambientales, radicales libres, tóxicos producidos por la peroxidación de los lípidos como resultado de la deficiencia de los sistemas antioxidativos, toxinas derivadas de la contaminación del intestino delgado y aumento en las endotoxinas

en la vena porta (Casanueva y col, 1995). En estos niños se ha encontrado disminución de vitamina A, E, C y carotenos, de las enzimas dismutasa superoxidasa y superoxidasa glutatión, así como, aumento en la concentración de fierro en los tejidos (Golden, 1988).

La concentración de la proteína fijadora del retinol y pre-albúmina disminuye en los niños desnutridos. Se cree que se produce por falta de adaptación a la deficiencia proteínica en la cual se protege al hígado a expensas del músculo. También se encuentra en estos niños disminución en la relación del nitrógeno de urea/creatinina y en la hidroxiprolina/creatinina en orina (Feldman, 1990).

Se ha observado que los niños con kwashiorkor presentan disminución en síntesis y desdoblamiento de proteínas, que se agudiza con la presencia de infecciones (Manary y col, 1997). Al comparar esta reacción en niños marasmáticos con infección aguda, se ha observado que estos presentan aumento en la transformación de proteínas de fase aguda, y los niños con kwashiorkor no, lo cual se ha relacionado con cierta capacidad de los marasmáticos para responder a la fase aguda de infecciones, lo que a su vez explicaría por que hay menos mortalidad en ellos (Manary y col, 1998).

Una pregunta que inquietó durante mucho tiempo a la comunidad de especialistas era saber si los niños con desnutrición severa podrían presentar retraso en la evolución de la conducta cognoscitiva, motora, del lenguaje o incluso adaptativas y de tipo personal-social, esto dio origen a una serie de estudios, en nuestro país para detectar las posibles alteraciones a nivel del sistema nervioso (Robles y col, 1959; Cravioto, 1981; Cravioto & Arrieta, 1981). Los hallazgos obtenidos de estos trabajos mostraron que los niños después de recuperarse de un episodio de desnutrición severa, presentaron valores inferiores en casi todas sus habilidades motoras, sin embargo se demostró que agregar "factores no nutricionales pueden ayudar a

proteger la capacidad intelectual de los niños en condiciones de privación” (Cravioto & Arrieta, 1979; Cravioto & Cravioto, 1990). El incorporar la estimulación sistemática materna, dentro del contexto de una adecuada interacción madre-hijo, junto a la recuperación nutricional, permitió que estos niños recuperaran su capacidad intelectual de acuerdo a lo esperado para su edad cronológica; de cada diez niños en recuperación nutricional incluida la estimulación materna sistemática, al ser evaluados, entre siete y nueve presentaron la capacidad intelectual esperada para su edad cronológica (Cravioto & Arrieta, 1979).

#### **IV. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA DESNUTRICIÓN SEVERA**

##### **A. MARASMO**

El marasmo es caracterizado por retraso en el crecimiento y la eliminación de la grasa subcutánea y de los músculos; la atrofia muscular causa protusión abdominal. La actividad física y su estado mental de estos niños se encuentran disminuidos, pero su respuesta a la estimulación y el apetito son relativamente normales. El peso está más afectado que las medidas esqueléticas, como talla, circunferencia cefálica y circunferencia torácica (McLaren & Meguid, 1993).

Los niños están demacrados, con cabeza grande, piel redundante, ojos brillosos, están alerta y hambrientos, irritables y malhumorados; hay hipotermia, retraso motor y debilidad. El déficit de la grasa puede cuantificarse al medir la circunferencia del brazo y los pliegues cutáneos en bíceps, tríceps y en las áreas de la escápula y umbilical. Las alteraciones en pelo y piel se presentan menos que en el kwashiorkor, pero la piel puede encontrarse reseca, hipopigmentada y escamosa, con pelo ralo y de color claro. En ocasiones también puede presentarse hepatomegalia (Arrieta & Cravioto, 1977).

Las infecciones más comunes y de acuerdo a las estaciones del año son: las enfermedades respiratorias durante las épocas de invierno y las enfermedades

diarreicas durante el verano; estas últimas además producen alteraciones de electrolitos y líquidos que conllevan a la deshidratación, aumentando la mortalidad infantil (McLaren & Meguid, 1993).

## **B. KWASHIORKOR**

Son niños con crecimiento insuficiente, conservación de grasa subcutánea con atrofia de los músculos, edema masivo en manos y pies, profunda irritabilidad, anorexia, descamación en piel e hígado graso y cambios psicomotores. El peso está más afectado que el crecimiento esquelético, pero no se presentan casos extremos de déficit de peso como en el marasmo, por la presencia del edema. Se atribuye el edema a la disminución en la presión oncótica plasmática como consecuencia de hipoalbuminemia. Existe conservación de las almohadillas adiposas bucales, lo que da el aspecto frecuente de "cara de luna". Son niños apáticos, tristes e irritables, débiles, inactivos y anoréxicos; la temperatura corporal puede ser subnormal, y presentar diarrea y vómitos intermitentes después de la comida. El desarrollo motor está retardado y es muy frecuente que presenten infecciones asociadas (Arrieta & Cravioto, 1977).

Signos clínicos de deficiencia de proteínas.- Además del edema, cerca del 30% de los pacientes tiene hígado graso, el edema subcutáneo oculta el desgaste muscular; hay hepatomegalia y edema, con ojos, manos y pies hinchados y finalmente edema generalizado. Hay cambios variables en la relación de tórax a cabeza, la circunferencia muscular a la mitad del brazo, y del peso para la talla. La albúmina del suero varía de 0.7 a 2g/dl (Feldman, 1990).

Entre otros factores afectados por los signos clínicos de deficiencia de proteínas se encuentran el pelo, la facies y la piel. El pelo se describe de color claro, lacio y despigmentado; el cabello oscuro se vuelve pardo luego rojo, rubio y gris; es reseco, delgado, sedoso, quebradizo y fácilmente desprendible, se cae mucho y deja placas

de calvicie. Los cambios de color se inician en la línea media del pelo de la frente (signo de bandera) con bandas alternantes claras y oscuras que registran los períodos de buena y mala nutrición y refleja la duración del estado de deficiencia (McLaren & Meguid, 1993).

Los cambios en la piel son de hiper o hipopigmentación, con descamación, más frecuente y grave en las razas de piel oscura; en los casos graves la dermatosis puede progresar hasta la formación de ulceraciones y fisuras cutáneas, que afectan miembros inferiores, glúteos y regiones perineales (McLaren & Meguid, 1993). En los niños de piel blanca la descamación es fina y con hiperpigmentación, "piel marmórea o quebradiza", que tiene la tendencia a afectar en especial a la frente.

Otras manifestaciones son el retraso en la cicatrización de heridas, con disminución de leucocitos polimorfonucleares, aumento de necrosis, pérdida de masa ósea y proteína no colágena. En autopsias practicadas en pacientes con este tipo de desnutrición se ha encontrado atrofia del intestino delgado, lo que reduce la absorción de nutrientes. También se ha observado atrofia del páncreas exocrino e hígado graso, así como disminución del tamaño del timo, de una tercera a una décima parte de lo normal (Feldman, 1990).

### **C. DESNUTRICIÓN MIXTA (KWASHIORKOR MARASMÁTICOS)**

Esta forma edematosa de DCP combina características clínicas del marasmo y del kwashiorkor. La modalidad clínica promedio de estos niños es el edema del kwashiorkor, con o sin lesiones de la piel, desgaste del músculo y disminución de la grasa subcutánea como en el marasmo. Cuando el edema desaparece durante el tratamiento temprano, los pacientes adquieren las peculiaridades del marasmo. Las alteraciones bioquímicas son las mismas que se encuentran en el marasmo y kwashiorkor, pero las alteraciones de la deficiencia proteínica severa es la que usualmente predomina (Torún & Chew, 1994).

## **V. ALTERACIONES INMUNOLOGICAS DE LA DESNUTRICIÓN**

Aunque se ha observado que el organismo tiene una capacidad considerable de reservas, que se manifiesta por la estabilidad de la respuesta inmunitaria en los grados leves y moderados de desnutrición, se debe considerar a los desnutridos como pacientes inmunodeficientes (Chevalier y col, 1996; Bhaskaram, 1992; Chandra 1991), ya sea en niños o personas de edad avanzada.

Actualmente existe una gran cantidad de reportes de investigación sobre los daños encontrados en el sistema inmune de niños con desnutrición severa, tanto en órganos primarios, como en órganos secundarios. Desde 1937 Vint, describió la atrofia severa del timo en niños con desnutrición de tercer grado, tipo kwashiorkor. También se ha encontrado atrofia de elementos celulares de los ganglios linfáticos, del bazo y de las amígdalas (Faulk y col, 1976; Mugerwa y col, 1971).

### **A. INMUNIDAD NATURAL**

La primera barrera de defensa de un individuo contra un microorganismo es la integridad física de la piel y las mucosas; las deficiencias nutricionales producen alteraciones funcionales y estructurales en los epitelios de la piel, el recubrimiento respiratorio y gastrointestinal lo que disminuyen la resistencia a infecciones (Kumate y col, 1994).

La actividad metabólica de la fagocitosis, y la habilidad asesina de los neutrófilos en niños con kwashiorkor está disminuida. Se encontró disminución en la actividad de la NADPH (limitando la velocidad de enlace de la membrana plasmática en la ruta de la enzima hexosa monofosfato) y una disminución en la producción del peróxido

de hidrógeno, siendo los mecanismos subyacentes de la disfunción de los neutrófilos en estos niños (Selvaraj & Bhat, 1972; Chandra, 1975).

Estudios realizados sobre los niveles en sangre del complemento han reportado una disminución del C3, C5, factor B en niños con desnutrición severa, y esto es más significativo en presencia de infección, alterando la opsonización y la quimiotaxis (Chandra, 1991). La concentración de factores solubles como la lisozima intracelular y extracelular se encuentra reducida (Mohan Ram, y col 1974).

En deficiencias nutricionales específicas de vitamina C, A, B6, hierro y zinc se han mostrado afecciones de la inmunidad natural así como de la inmunidad celular y humoral. La deficiencia severa de vitamina C y de zinc se asocia con retardo de la movilidad y disminución de la capacidad bactericida de los neutrófilos y macrófagos (Anderson y col, 1990; Chandra, 1999). En la deficiencia del zinc también se observa reducción de la respuesta proliferativa de los linfocitos, disminución en la producción de anticuerpos después de haber sido estimulados con antígenos T-dependientes; disminución de la actividad de los linfocitos NK y reducción de la actividad de la timulina (Chandra, 1999).

## **B. INMUNIDAD ADQUIRIDA**

La inmunidad adquirida puede ser de dos tipos de acuerdo a los componentes del sistema inmune que participen en la respuesta (Abbas y col, 1999):

A. La inmunidad humoral, es mediada por moléculas de la sangre que son responsables de reconocer al antígeno específico y de eliminarlo; son las llamadas inmunoglobulinas.

B. Inmunidad mediada por células, también llamada, inmunidad celular, por los linfocitos T. En el Cuadro 1, se señalan las principales características de las células que intervienen en la inmunidad adquirida.

### **Cuadro 1. Células Linfoides y Principales Funciones.**

<b>Células</b>	<b>Funciones</b>	<b>Marcadores Fenotípicos</b>
Linfocitos B	Producción de anticuerpos (inmunidad humoral)	Receptores para Fc, antígenos clase II MHC, CD19, CD20 y CD21
Linfocitos T Colaboradores	Activación (proliferación y diferenciación) de células B (inmunidad humoral) y T (inmunidad celular). Activación de macrófagos (inmunidad celular) Inflamación	CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>-</sup>
Linfocitos T Citolíticos	Lisis de células infectadas por virus, células tumorales y aloinjertos Activación de macrófagos (inmunidad celular)	CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>-</sup> , CD8 <sup>+</sup>
Linfocitos, Naturales Asesinas	NK Lisis de células infectadas por virus, células tumorales; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	Receptor para Fc de IgG, CD16 y CD56

En niños con DCP se han realizado estudios para valorar los mecanismos de la respuesta humoral: ya sea midiendo las células B circulantes, los niveles de inmunoglobulinas y la respuesta a antígenos seleccionados para la producción de anticuerpos específicos. Sin embargo, los resultados han sido variados y lo más aceptado es la disminución de la IgA secretora, en las secreciones nasofaríngeas y gastrointestinales (Reddy y col, 1976).

Con relación a la inmunidad mediada por células, que es el objeto de este estudio, se ha encontrado una gran variedad de resultados. Algunos autores reportan una disminución cuantitativa y un deterioro funcional de las células T periféricas, con una disminución en células T CD4<sup>+</sup> (ayudadoras) y un aumento en células T CD8<sup>+</sup> (citotóxicas) (Lal y col, 1980; Chandra y col, 1982). Resultados

similares han sido reportados por Betancourt y col (1995a), al identificar el porcentaje de sub-poblaciones de linfocitos encontraron, una disminución en las células T CD4<sup>+</sup>, y en dos de los 10 niños desnutridos estudiados se observó un incremento en los porcentajes de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Otros autores reportan altos porcentajes de linfocitos T inmaduros (CD1a), disminución del porcentaje de linfocitos T CD3<sup>+</sup> (maduros), así como de la relación CD4/CD8 y un ligero aumento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> con relación a niños sanos (Parent y col, 1994).

Las células de memoria (CD45RO, células que han entrado en contacto con un antígeno), sólo han sido estudiadas en ratones y ancianos desnutridos; reportándose en los ancianos severamente desnutridos disminución de células T de memoria y aumento de las células T nativas (CD45RA), comparadas con las células de ancianos sanos (Lesourd & Mazari, 1997). En el bazo de ratones desnutridos se ha encontrado aumento de células T nativas y disminución de células de memoria de acuerdo a ratones sanos (Woodward y col, 1995).

En la evaluación de la capacidad funcional de la respuesta inmune mediada por células, se utilizan diversos activadores (mitógenos) que inducen la proliferación y la diferenciación de las células del sistema inmune *in vitro*. Algunos autores (Chandra, 1991; Chowdhury y col, 1993) han encontrado en niños desnutridos una disminución de la respuesta de los linfocitos bajo la acción de estos agentes. En otros estudios se señala la existencia de una respuesta normal de la subpoblación de linfocitos a los mitógenos en niños desnutridos con relación a los niños bien nutridos (Betancourt y col 1995a).

En otros casos se propone una respuesta más rápida de los linfocitos a la acción del activador. Trabajos realizados sobre la proliferación celular de linfocitos en niños desnutridos, González y col (1990), González (1993) y Ortiz y col (1994), observaron un índice de duplicación mayor a las 48 horas de cultivo, lo cual interpretaron como

una respuesta más rápida al mitógeno o a una duración menor del ciclo celular. Posteriormente determinaron que esta observación sólo puede relacionarse con una respuesta más rápida y que la duración del ciclo celular se encuentra alterada, observándose un tiempo de generación mayor. Además, se encontró que la fracción de células que responden al mitógeno y proliferan activamente es menor en los cultivos de linfocitos en los niños desnutridos, lo que refleja que solamente una fracción de los linfocitos T de estos niños, tienen un período de latencia más corto para entrar al ciclo celular (transición G0-G1) (Ortiz y col, 1994). Se propone que estas alteraciones pueden estar asociadas con una deficiente respuesta inmune celular.

En niños en recuperación nutricional se observó que la fracción de linfocitos que responden al mitógeno se incrementa pero no alcanza los valores mostrados por los niños sanos, lo que refleja una recuperación parcial de los linfocitos. Así se determinó que en los niños en recuperación nutricional persiste el daño que causa el retraso en el ciclo celular. También se ha propuesto que algunas alteraciones en la respuesta a mitógenos y en la proliferación celular de linfocitos de niños desnutridos, pueden estar relacionadas con la administración de medicamentos (Ortiz y col, 1995).

Otros estudios que se han realizado para valorar el sistema inmune de niños desnutridos, son: identificación de daños genéticos en los linfocitos; intercambio de cromátidas hermanas (Ortiz y col, 1994); daños al ADN y el ARN (Gorodezky y col, 1986; Betancourt y col, 1995b), así como el de reconocer la acción de la desnutrición y la tuberculosis en la producción de aberraciones cromosómicas (Roa y col, 1990).

A partir de esta diversidad de resultados, tanto en sub-poblaciones de linfocitos como en su funcionalidad, y al no encontrar datos sobre células nativas y de

memoria en niños desnutridos se consideró importante continuar con las investigaciones que nos permitieran contribuir al conocimiento de algunos de los mecanismos inmunes que se asocian a la desnutrición y puedan explicar el porque estos niños son presas fáciles de las infecciones. Para poder llevar a cabo este trabajo se estudiaron principalmente niños con desnutrición severa y moderada. Los casos leves de desnutrición no se incluyeron.

Este estudio se realizó utilizando como herramienta de análisis a la citometría de flujo por ser una metodología fundamental, eficaz y con un gran potencial. A continuación se mencionan algunas de las ventajas de esta tecnología:

1. Su gran sensibilidad, es decir pueden realizar mediciones objetivas y cuantitativas muy precisas (resolución).
2. Es factible la medición simultáneamente de diversos aspectos celulares (estructura y función).
3. Es muy rápida, las células pueden ser medidas a una velocidad de 500 a 4000 células por segundo.

## **JUSTIFICACIÓN**

La desnutrición es un problema de salud pública que afecta a nuestro país desde hace muchas décadas. Su relación con procesos infecciosos es la primera causa de morbilidad y mortalidad infantil en los países en desarrollo como el nuestro. Se ha observado una mayor incidencia de enfermedades infecciosas en niños desnutridos que en niños bien nutridos. Enfermedades como la diarrea, infecciones respiratorias agudas y las enfermedades de tipo sistémico como el sarampión, en niños eutróficos, son controlables, pero en niños desnutridos pueden ser letales, ya que en estos niños existen limitaciones importantes en las reservas energéticas y de otros nutrientes para mantener el estado de alerta, y responder a los cambios bioquímicos y hormonales desencadenados durante la infección

La alta prevalencia de la desnutrición y la infección, y las alteraciones a nivel del sistema inmune que se producen, hace relevante el estudio de sus efectos así como el análisis de la interacción entre ambos. Así, se plantea el trabajo con los siguientes objetivos:

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la respuesta inmune mediada por células en niños bien nutridos con infección, y niños con desnutrición moderada y severa, ambos con infección. La evaluación consistió en medir el porcentaje de las sub-poblaciones de linfocitos en sangre periférica. También se midió su funcionalidad a través del empleo de mitógenos y de la citometría de flujo, antes del tratamiento médico.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el porcentaje de linfocitos: T (CD3, CD4 y CD8), B (CD20), NK (CD56+CD16) en sangre periférica, empleando la citometría de flujo.
2. Determinar el porcentaje de linfocitos CD45RA (nativos), CD45RO (memoria) y CD45RA/CD45RO (dobles positivos) a nivel del total de linfocitos y de las células CD4<sup>+</sup>.
3. Caracterizar el efecto de algunos mitógenos como la fitohemaglutinina (PHA) y el anticuerpo CD2-CD2R para linfocitos T (CD3, CD4 y CD8); la fitolaca (PWM) para linfocitos B (CD19), y la interleucina 2 (IL-2) en linfocitos NK (CD56). Para medir la activación de las células se utilizó la expresión del antígeno de activación temprana CD69, para los linfocitos activos (CD69<sup>+</sup>) y los inactivos (CD69<sup>-</sup>).
4. Establecer las diferencias de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos, así como de su funcionalidad entre los niños desnutridos y los bien nutridos ambos con infección.

Dado que no existían datos sobre sub-poblaciones y activación de linfocitos en el laboratorio, fue necesario:

5. Establecer los valores de referencia para las sub-poblaciones de linfocitos en sangre periférica en niños preescolares sanos, por medio de citometría de flujo.
6. Establecer los valores de referencia de la funcionalidad de las sub-poblaciones de linfocitos de sangre periférica, ante la presencia de mitógenos, en niños preescolares sanos por medio de citometría de flujo.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Si la desnutrición es capaz de afectar la respuesta inmune mediada por células, entonces se observarán diferencias en los porcentajes de las sub-poblaciones de linfocitos con las observadas en niños bien nutridos infectados.

Si la desnutrición es capaz de alterar la funcionalidad de los linfocitos, entonces se detectarán diferencias de la respuesta a diferentes mitógenos entre las células provenientes de los niños desnutridos y los niños bien nutridos, ambos infectados.

## METODOLOGÍA

### I. DATOS GENERALES DE LAS MUESTRAS DE LOS PACIENTES

Se obtuvieron 35 muestras de sangre periférica, de niños menores de tres años que acudieron a los Hospitales Pediátricos de Xochimilco e Iztapalapa del DDF, los cuales por sus características clínicas requirieron ser hospitalizados. Las muestras se tomaron el día de la admisión de los pacientes al hospital, previo al inicio del tratamiento. De estas muestras 16 fueron de niños bien nutridos con infección y 19 de niños desnutridos infectados. Asimismo se analizaron 42 muestras de niños bien nutridos de la consulta de rutina. Con todas las muestras se conformaron tres grupos de estudio cuyas características se señalan a continuación:

- A. Niños bien nutridos sin infección (BN): Veintiuno fueron menores de tres años (de 8 a 36 meses) y veintiuno mayores de tres años (de 38 a 60 meses); dieciocho del sexo femenino y veinticuatro del masculino. Fueron considerados bien nutridos, ya que presentaron el peso y la talla esperados para su edad cronológica. Además, al momento de la toma de la muestra ninguno presentaba infecciones evidentes, ni se encontraba tomando medicamentos.
  
- B. Niños bien nutridos con infección (BNI). Los 16 niños de este grupo fueron menores de tres años, sus edades fluctuaron entre 7 y 35 meses; once fueron del sexo masculino y cinco del femenino. Todos presentaron el peso y la talla esperados para su edad cronológica, y algún tipo de infección grave que ameritó su hospitalización. El diagnóstico de la infección se basó en la sintomatología como en los exámenes de laboratorio de rutina, encontrándose infecciones gastrointestinales, respiratorias y mixtas (cuando un niño presentaba ambos tipos de infección). Así este grupo se conformó con siete niños con infección mixta, cuatro con infección gastrointestinal, cinco con infección respiratoria. Al momento

de la toma de la muestra no se encontraban tomando medicamentos. Las características de los niños de este grupo se muestran en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. Características de los niños bien nutridos infectados.**

<b>Muestra</b>	<b>Edad (meses)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Talla (cm)</b>	<b>Tipo de Infec.</b>
BNI-1	7	M	8.5	70	Gastroint
BNI-2	7	M	7.0	Nd	Resp-Gast
BNI-3	7	M	6.5	70	Resp-Gast
BNI-4	9	M	7.2	70	Gastroint
BNI-5	9	M	9.0	71	Respirato
BNI-6	10	F	7.5	71	Respirato
BNI-7	11	F	8.2	70	Respirato
BNI-8	11	F	8.0	72	Respirato
BNI-9	13	M	9.2	90	Gastroint
BNI-10	16	M	10.0	74	Resp-Gast
BNI-11	16	F	10.1	85	Gastroint
BNI-12	18	M	9.9	78	Resp-Gast
BNI-13	22	M	10.0	88	Resp-Gast
BNI-14	31	M	11.6	91	Resp-Gast
BNI-15	34	M	13.0	93	Resp-Gast
BNI-16	36	F	12.0	95	Respirato

C. Niños desnutridos infectados (DES). Este grupo se conformó con 19 niños, de ellos diez fueron del sexo masculino y nueve del femenino, todos los niños fueron menores de tres años, sus edades oscilaron entre 6 y 29 meses. El diagnóstico de la infección se basó igual que en el grupo anterior en la sintomatología y los exámenes de laboratorio. De igual forma por su condición todos ameritaron hospitalización. Con relación a la infección este grupo estuvo integrado por ocho niños que presentaron infección gastrointestinal, cuatro infección respiratoria y siete infección mixta (respiratoria y gastrointestinal). El déficit de peso y de

peso/talla se determinó de acuerdo a las tablas para niños mexicanos de Ramos-Galván (1976), los pacientes fueron clasificados en los diferentes grados de desnutrición tomando en cuenta tanto el déficit de peso/talla como las características clínicas que presentaban. De acuerdo a estos parámetros seis niños mostraron desnutrición de segundo grado, trece niños desnutridos de tercer grado; de los cuales diez fueron marasmáticos y tres kwashiorkor. Las características de cada uno de los niños de este grupo se indican en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Características de los niños desnutridos infectados.**

Muestra	Edad (meses)	Sexo	Peso (Kg)	Talla (cm)	Grado Desn.	Tipo de Infec.	Peso/talla % Déficit
DES-1	6	M	4.0	54	2o.	Resp-Gast	29.3
DES-2	6	M	5.4	67	2o.	Respirato	29.4
DES-3	12	F	7.0	72	2o.	Gastroint	25.0
DES-4	12	F	6.8	73	2o.	Gastroint	28.4
DES-5	14	F	7.2	78	2o.	Gastroint	29.1
DES-6	15	M	8.1	77	2o.	Respirato	25.0
DES-7	6	F	2.5	49	Marasmo	Gastroint	54.0
DES-8	5	M	3.0	56	Marasmo	Resp-Gast	32.4
DES-9	6	M	4.1	61	Marasmo	Respirato	41.1
DES-10	10	F	4.6	72	Marasmo	Gastroint.	48.6
DES-11	14	F	3.4	58	Marasmo	Resp-Gast	54.8
DES-12	15	F	5.7	74	Marasmo	Resp-Gast	40.7
DES-13	17	F	7.2	79	Marasmo	Resp-Gast	42.0
DES-14	17	M	7.5	75	Marasmo	Gastroint	40.0
DES-15	18	M	6.3	79	Marasmo	Gastroint	43.0
DES-16	29	F	7.2	Nd	Marasmo	Respirato	47.7*
DES-17	10	M	6.0	70	Kwashior	Gastroint	36.3
DES-18	12	M	6.8	69	Kwashior	Resp-Gast	25.1
DES-19	24	M	11.4	81	Kwashior	Resp-Gast	3.0

\* Déficit peso/edad. Nd= no se determinó.

## II. MÉTODO Y TÉCNICAS EMPLEADAS

Para valorar la respuesta inmune mediada por células en los diferentes grupos de estudio se realizaron dos modalidades metodológicas, con citometría de flujo:

A. Se identificaron los diferentes tipos celulares en sangre periférica empleando una mezcla de dos anticuerpos monoclonales de diferente especificidad, conjugados con distintos fluorocromos. Se determinó el porcentaje de linfocitos, granulocitos y monocitos. Posteriormente dentro de la región de linfocitos se obtuvieron los porcentajes de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), B (CD20<sup>+</sup>), NK (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) y dentro de los linfocitos T las sub-poblaciones CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>.

Además, en el total de linfocitos y dentro de las células CD4<sup>+</sup> la fracción de células nativas (CD45RA<sup>+</sup>), de memoria (CD45RO<sup>+</sup>) y dobles positivas (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>). También se identificó número de linfocitos T activos (HLA-DR<sup>+</sup>).

B. Se evaluó la activación/funcionalidad de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos T (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), B (CD19<sup>+</sup>) y NK (CD56<sup>+</sup>). Para esto se realizaron cultivos de sangre completa en las que se indujo la activación de linfocitos T con dos mitógenos específicos: la fitohemaglutinina (PHA) y el CD2-CD2R (control positivo) en ensayos independientes. Para el caso de los linfocitos B y NK se emplearon los mitógenos de fitolaca (PWM) e interleucina 2 (IL-2) respectivamente. Para determinar la intensidad de la activación se emplearon una mezcla de tres anticuerpos de diferente especificidad conjugados con diversos fluorocromos. Con ésta metodología de tres colores se pudo evaluar la activación y la funcionalidad, detectando la expresión del antígeno de activación temprana CD69<sup>+</sup> en los subtipos de linfocitos T (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), B y NK.

La sangre fue colectada en tubos con anticoagulante de heparina sódica Vacutainer™ (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ) y procesados en el mismo día de su obtención. La viabilidad celular se determinó usando una doble tinción con diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio [Strauss, 1991]. Más del 95% de las células siempre fueron viables.

#### **A. DETECCIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE LEUCOCITOS Y SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS**

Para determinar los porcentajes de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos se emplearon anticuerpos comerciales conjugados con isotiacinato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) y proteína cloridina peridina (PerCP) de Becton Dickinson (Immunocytometry System, San Jose, CA). Por cada muestra de sangre se utilizaron seis combinaciones de anticuerpos conjugados con los diferentes fluorocromos. Las combinaciones de anticuerpos utilizados se muestran en el Cuadro 4. Además, en el Figura 1 se representa los principales fenotipos de linfocitos determinados en los grupos de estudio en sangre periférica.

La metodología para la detección de las diferentes sub-poblaciones (Landay & Muirhead, 1989; Nicholson y col, 1994) se menciona a continuación.

- a) Se colocaron en seis tubos de polipropileno de 12 x 75 mm. (Falcon, Becton Dickinson) 100  $\mu$ l de sangre completa, a cada uno de ellos se les añadió una combinación diferente de anticuerpos (10  $\mu$ l) posteriormente cada tubo se agito 3 segundos en un vortex a baja velocidad.
- b) Se incubó la sangre con los anticuerpos marcados durante 20 min., a temperatura ambiente y sin exponer los tubos a la luz directa.
- c) Se trató la muestra con solución de lisis para eliminar los eritrocitos. Después de la incubación se agregaron 2 ml de solución de lisis (Lysis solution, Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA.) 1X a cada tubo, se mezcló por 3

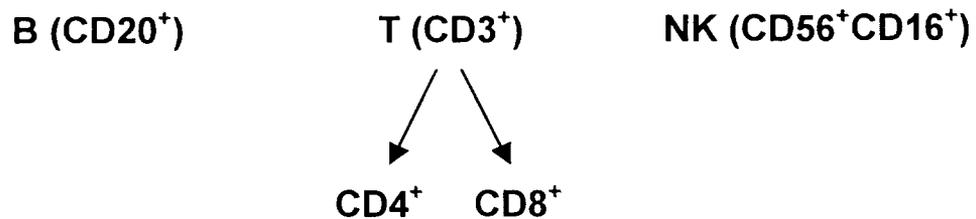
segundos en el vortex y se incubó por 10 min. a temperatura ambiente, sin exponer a la luz directa. Se centrifugó a 300 xg durante 5 min. a temperatura ambiente.

**Cuadro 4. Combinación de anticuerpos empleados para la detección de los diferentes tipos de leucocitos y de las sub-poblaciones de linfocitos.**

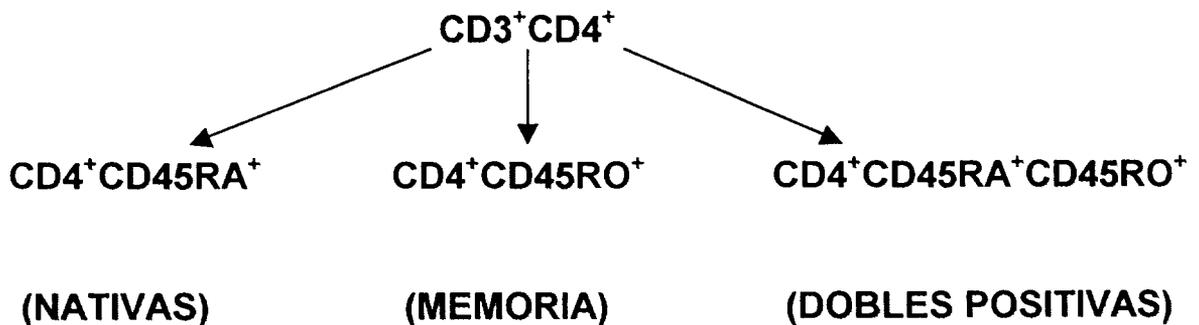
<b>Combinación de anticuerpos utilizados</b>	<b>Tipos celulares identificados</b>
<b>CD45 FITC/CD14 PE</b>	Linfocitos, monocitos y granulocitos, pureza de la región y % de recuperación de linfocitos
<b>IgG1 FITC/IgG2 PE</b>	Control de isotipo (negativo) para LT, define las coordenadas de las gráficas de puntos
<b>CD3 FITC/(CD16+CD56) PE/CD20 PerCP</b>	Linfocitos T, NK y B.
<b>CD4 FITC/CD8 PE</b>	Linfocitos ayudadores (CD4 <sup>+</sup> ) y citotóxicos (CD8 <sup>+</sup> )
<b>CD3 FITC/(CD3/HLA-DR) PE</b>	Linfocitos T y T de activación tardía
<b>CD45RA FITC/CD45RO PE/ CD4 PerCP</b>	Linfocitos nativos, de memoria y dobles positivos en el total de linfocitos y dentro de los CD4 <sup>+</sup> .

- d) Después de centrifugar se aspiró el sobrenadante y se añadieron 2 ml de Haemaline (FACS Flow) a cada tubo, se agitaron en el vortex 3 seg. y se centrifugaron a 200 xg durante 5 min. a temperatura ambiente.
- e) Al finalizar la centrifugación se aspiró el sobrenadante y se añadieron 0.5 ml de paraformaldehído al 1% con NaN<sub>3</sub> al 0.1%. Las muestras fueron adquiridas inmediatamente o durante las siguientes 24 h, guardándolas en refrigeración y oscuridad.

## ESTUDIO DEL INMUNOFENOTIPO EN LINFOCITOS



## ANÁLISIS DE SUB-POBLACIONES NATIVAS, DE MEMORIA Y DOBLES POSITIVAS



**Figura 1.** Principales fenotipos de linfocitos determinados en los grupos de estudio en sangre periférica.

## B. ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN/FUNCIONALIDAD DE LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS

Como ya se señaló anteriormente para esta parte del estudio con sangre completa se activaron los linfocitos T con mitógenos específicos: PHA y el CD2/CD2R; este último fue empleado como control de activación. Para los linfocitos B y NK se utilizaron el PWN y la IL-2 respectivamente. La activación y la funcionalidad se evaluó detectando la expresión del antígeno de activación temprana CD69.

La Metodología para el Análisis de Tres Colores (Maino & Suni, 1995) fue la siguiente:

- a) Activación de los linfocitos con los diferentes mitógenos. Para los cultivos se emplearon cinco tubos para cada una de las muestras de sangre: uno para la PHA (Boehringer Mannheim GmbH, W. Alemania), otro para el control positivo CD2/CD2R (Becton Dickinson), uno sin mitógeno como control de auto fluorescencia, otro para el PWM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) y otro para la IL-2 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). En el primero se colocaron 200  $\mu$ l de sangre completa y PHA a una concentración final de 5  $\mu$ g/mL; en el segundo 150  $\mu$ l de sangre completa y 2  $\mu$ l del control positivo de activación CD2/CD2R; el tercero 100  $\mu$ l de sangre sin mitógeno; el cuarto con 150  $\mu$ l de sangre y 3  $\mu$ l de PWM y al quinto 150  $\mu$ l de sangre y 15  $\mu$ l de IL-2 a una concentración final de 20 U/mL. Se incubaron a 37°C durante 4 horas.
- b) Marcaje de las células con los anticuerpos específicos. Se tomaron alícuota de los cultivos y se les agregó la mezcla de anticuerpos que se muestran en el Cuadro 5. Para detectar auto-fluorescencia se emplearon una mezcla de anticuerpos (control negativo) para cada uno de los tubos con los mitógenos utilizados. Las tinciones de los cultivos fueron preparadas de la siguiente manera: se les agregaron 20  $\mu$ l de la mezcla de anticuerpos y 50  $\mu$ l de sangre ya estimulada con

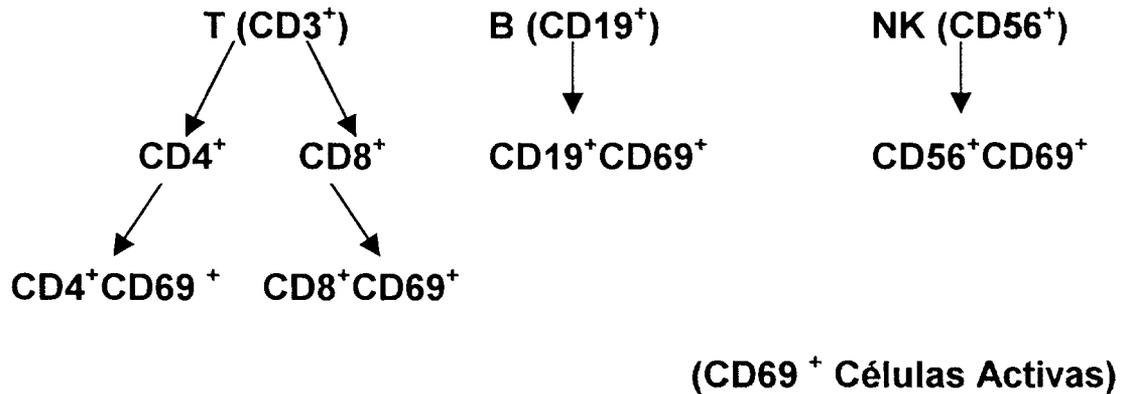
los mitógenos, se agitó en el vortex tres segundos. En el Figura 2 se muestran el diagrama para identificar simultáneamente los diferentes inmunofenotipos de linfocitos y la detección del marcador de activación temprana (CD69).

- c) Se incubaron las células con los anticuerpos marcados, durante 30 min. en oscuridad a temperatura ambiente.
- d) Tratamiento con solución de lisis. A cada alícuota se le añadieron 450 µl de solución de lisis 1X, se agitaron suavemente durante 3 segundos y se incubaron 15 min. en oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras fueron adquiridas inmediatamente o durante las primeras 24 h., guardándolas en refrigeración y oscuridad. Todos los anticuerpos y la solución de lisis fueron adquiridos en Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA.

**Cuadro 5. Combinación de anticuerpos utilizados en el análisis de la funcionalidad de las sub-poblaciones de linfocitos.**

<b>Combinación de anticuerpos utilizados</b>	<b>Tipos celulares identificados</b>
IgG1 FITC/IgG1 PE/CD3 PerCP	Control de isotipo (control negativo) para LT
CD4 FITC/CD69 PE/CD3 PerCP	Linfocitos CD4 <sup>+</sup> y células activas (CD69 <sup>+</sup> )
CD8 FITC/CD69 PE/CD3 PerCP	Linfocitos CD8 <sup>+</sup> y células activas (CD69 <sup>+</sup> )
CD19 FITC/CD69 PE/CD45 PerCP	Linfocitos B y células activas (CD69 <sup>+</sup> )
CD56 FITC/CD69 PE/CD45 PerCP	Linfocitos NK y activación (CD69 <sup>+</sup> )
γ1 PE/CD45 PerCP	Control de isotipo (negativo) para LB y NK

## ESTUDIO DEL INMUNOFENOTIPO Y LA ACTIVACIÓN CELULAR



**Figura 2.** Inmunofenotipos de los linfocitos y la detección de la activación temprana.

### C. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PARA AMBAS METODOLOGÍAS

Se adquirieron y analizaron las muestras en Citómetro de Flujo modelo FACScan (Becton Dickinson):

- Se calibró y ajustó el equipo empleando el software AutoCOMP.
- Se adquirieron los datos con el software LYSYS II.
- Se analizaron los datos con el software LYSYS II.

### D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan en medidas de tendencia central, promedio  $\pm$  el error estándar. Los cuales se determinaron para cada grupo de estudio. Las comparaciones entre los tres grupos se hicieron mediante un análisis multivariado,

utilizando el programa de JMP, y las diferencias estadísticas se definieron con la prueba no paramétrica de Wilcoxon y Kruskal-Wallis. La significancia fue establecida cuando  $p < 0.05$ .

La comparación de los datos se realizó considerando en niños sanos: edad, sexo, en el caso de los niños infectados por el tipo de infección (respiratoria, infección gastrointestinal o mixta) y en los desnutridos además por el grado y tipo de desnutrición (2o. grado, 3er. grado: kwashiorkor y marasmo). No todos los niños pudieron ser incluidos en el total de análisis de sub-poblaciones y/o de activación de linfocitos, algunos fueron excluidos cuando no cumplían los criterios de calidad o las características requeridas y/o cuando por algún motivo no se les podía realizar el total de las pruebas; de ahí que los cuadros de resultados para las diferentes sub-poblaciones y de activación de linfocitos varíen en el número (n) de pacientes incluidos.

Tanto en el análisis de las sub-poblaciones de linfocitos como en el de activación de linfocitos se obtuvieron:

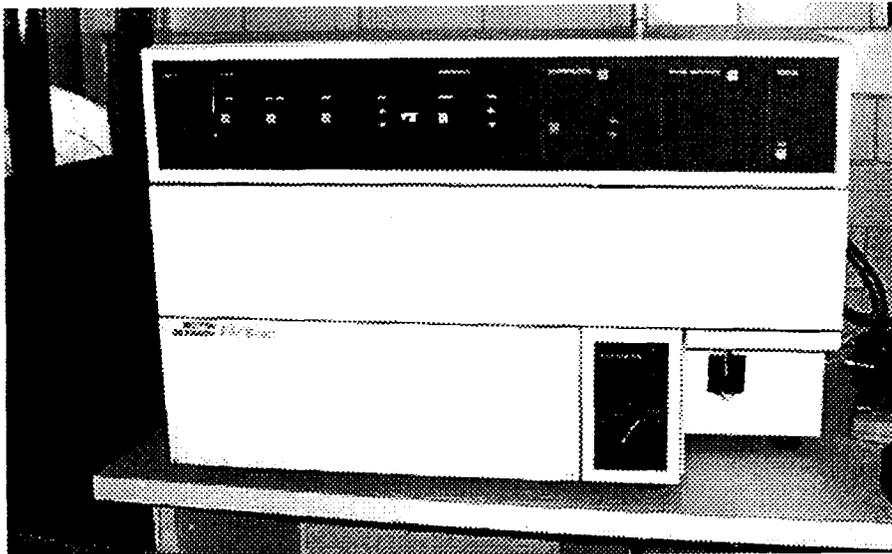
- a) Datos de referencia de niños preescolares mexicanos sanos (BN), lo que permitió establecer comparaciones con los demás grupos de estudio.
- b) Valores de referencia para niños bien nutridos infectados (BNI).
- c) Valores de referencia para niños desnutridos infectados (DES).
- d) Con estos valores se pudieron establecer comparaciones entre los diferentes grupos de estudio: BN vs BNI, BN vs DES y BNI vs DES.

También se calcularon y compararon los números absolutos de las células ( $X \cdot 10^6/L$ ) de cada una de las sub-poblaciones de linfocitos y de las sub-poblaciones de linfocitos activados. Estos fueron calculados de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\% \text{ subpoblación seleccionada}}{100} \times \frac{\text{cuenta linfocitaria}}{100} \times \text{la cuenta leucocitaria}$$

(multiplicando la corrección del porcentaje de la subpoblación seleccionada, por la corrección de la cuenta linfocitaria por la cuenta leucocitaria).

### III. CITÓMETRO DE FLUJO

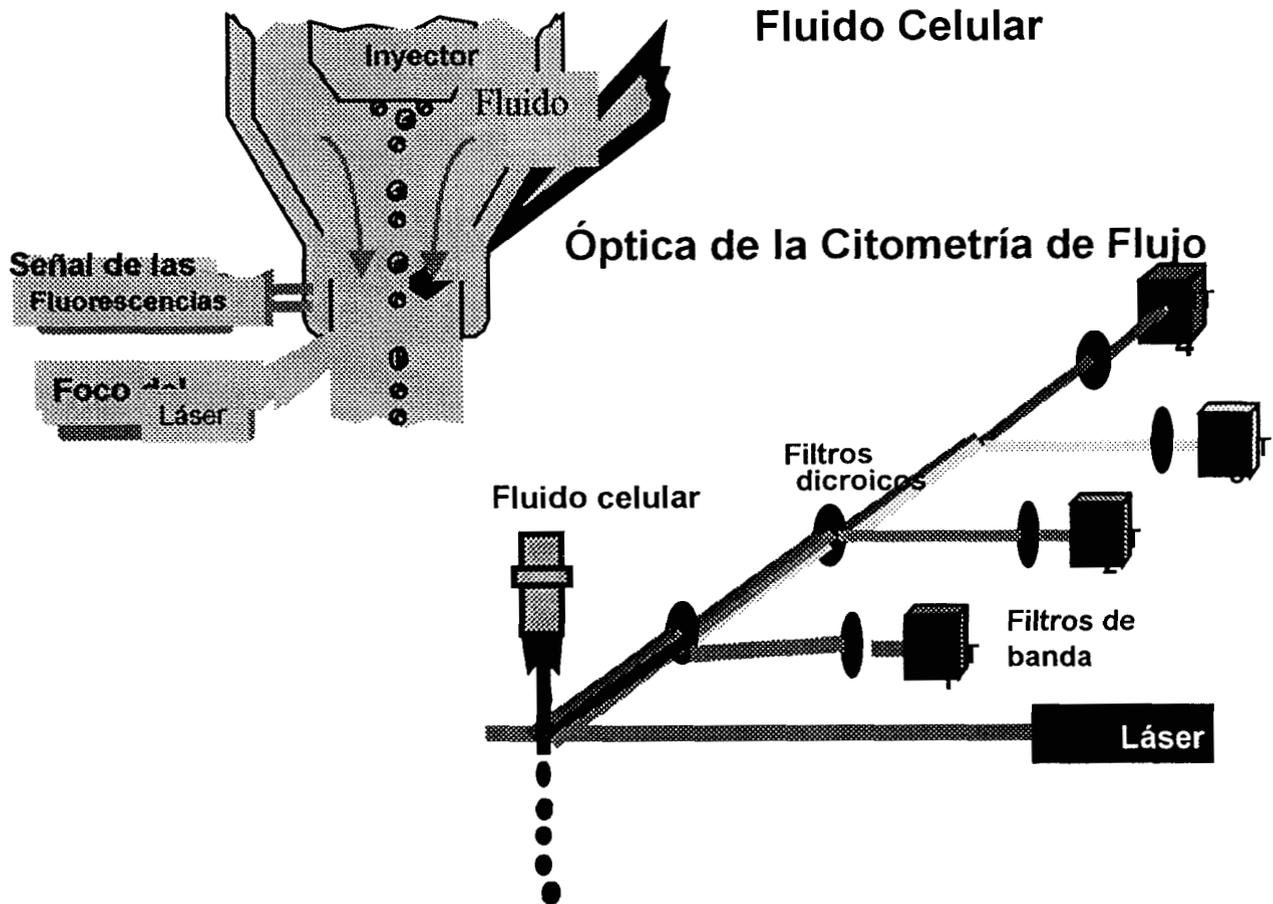


**Figura 3. Citómetro de flujo modelo FACScan**

El Citómetro de Flujo modelo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry System) que se muestra en la Figura 3, es un aparato de alta resolución óptica que puede analizar de manera simultánea cinco características de una sola célula: tamaño relativo, complejidad interna relativa e intensidad de las fluorescencias empleadas (FL1, FL2 y FL3). Para que el citómetro pueda medir las diferentes

características de la célula requiere de los siguientes sistemas (como se muestran en la Figura 4):

1. *Fluidos*: para introducir y alinear las células para ser medidas.
2. *Ópticos*: una fuente de excitación (láser de 488 nm) y colección óptica para generar y coleccionar las señales de luz.
3. *Electrónicos*: para convertir las señales ópticas a señales electrónicas proporcionales y digitalizadas para análisis en la computadora.



**Figura 4.** Los diferentes sistemas de la citometría de flujo.

Previo a la tinción y adquisición de las muestras de sangre periférica se tienen que hacer una serie de ajustes al citómetro que se describen:

#### **A. PROGRAMA DE AutoCOMP**

Para poder utilizar el Citómetro de Flujo en el análisis de muestras de sangre periférica para la identificación de sub-poblaciones de linfocitos y activación/funcionalidad celular, debe de hacerse un ajuste y calibración previa del aparato (*Calibración Estándar*). Para tal actividad se usa el *programa AutoCOMP*, el cual permite el ajuste de detectores (PMT), así como la compensación de las fluorescencias para la adecuada discriminación entre ellas. Ambos aseguran una prueba eficiente de detección y representan un procedimiento de control de calidad que permite definir que el FACScan está analizando cada una de las células de manera consistente (Becton Dickinson, guía del usuario),

Para lo anterior se emplean dos tipos de “perlas de calibración”. Las del primer tipo carecen de tinción y sirven para ajustar la dispersión lateral de la luz (SSC) y la dispersión anterior de luz (FSC). Las de segundo tipo son una combinación de perlas teñidas con fluoresceína (FITC), con ficoeritrina (PE) y sin teñir; sirven para determinar la adecuada discriminación entre las fluorescencias empleadas, dado que las longitudes de onda de emisión de color de los diferentes fluorocromos pueden sobreponerse ligeramente, sobre todo en relación con la FITC y la PE (Becton Dickinson, guía del usuario). En la figura 5 se muestran las longitudes de onda de los fluorocromos utilizados.

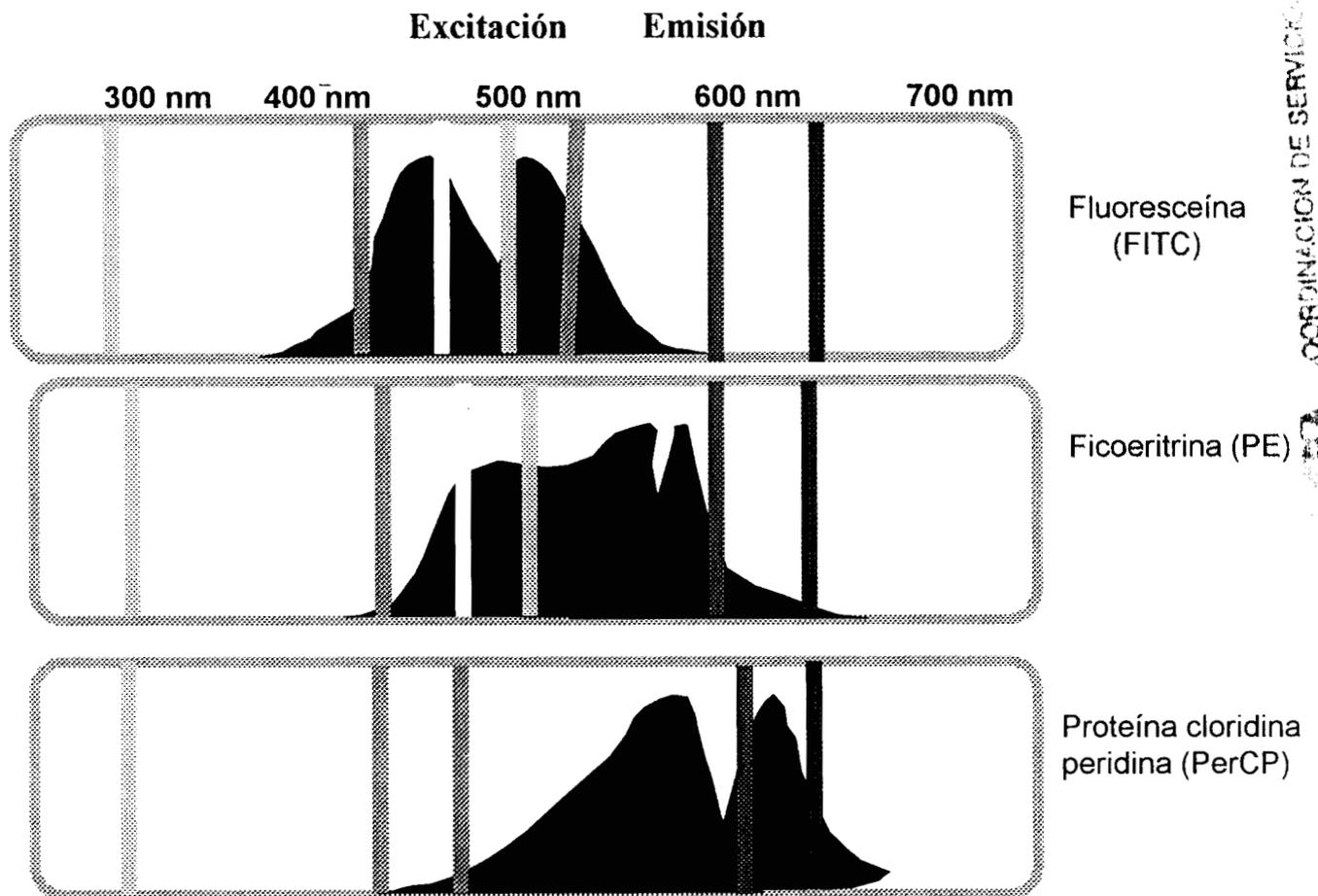
#### **B. PROGRAMA Lysys II**

El software Lysys II consta de dos aplicaciones, una para la **Adquisición** de las muestras y la segunda para el **Análisis** de las mismas. El programa:

- -Ajusta el equipo

- Adquiere la muestra
- Almacena los datos y
- Analiza los datos.

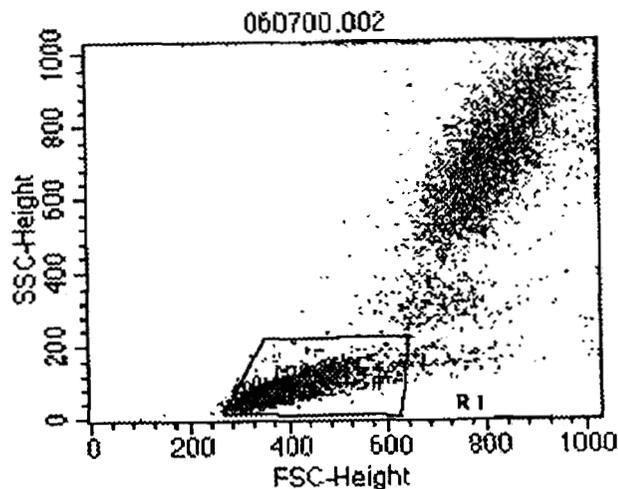
## Espectros de Excitación y Emisión de los Fluorocromos Empleados



COORDINACIÓN DE SERVICIOS DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

**Figura 5.** Longitud de onda de los tres fluorocromos detectados por las fluorescencias del citómetro.

En la adquisición de las muestras debe de hacerse un ajuste para la obtención de las gráficas de punto. Para ello se requieren detallar los parámetros, los detectores (tubos sensitivos foto-multiplicadores) y el umbral de voltaje que define el tamaño de partículas que van a ser eliminadas. Una vez ajustado el equipo con una primera muestra se solicitan las coordenadas de FSC (X) contra SSC (Y). De esta forma se obtiene información sobre la complejidad interna y el tamaño de las células, lo que permite identificar la población de linfocitos a la que se definirá como la región R1, con la ayuda de un polígono (Figura 6). A partir de esta región se adquieren los demás tubos de las muestras de sangre y dependiendo de los anticuerpos monoclonales altamente específicos conjugados con diferentes fluorocromos, el proceso de adquisición da las diversas sub-poblaciones de linfocitos (Becton Dickinson, manual).



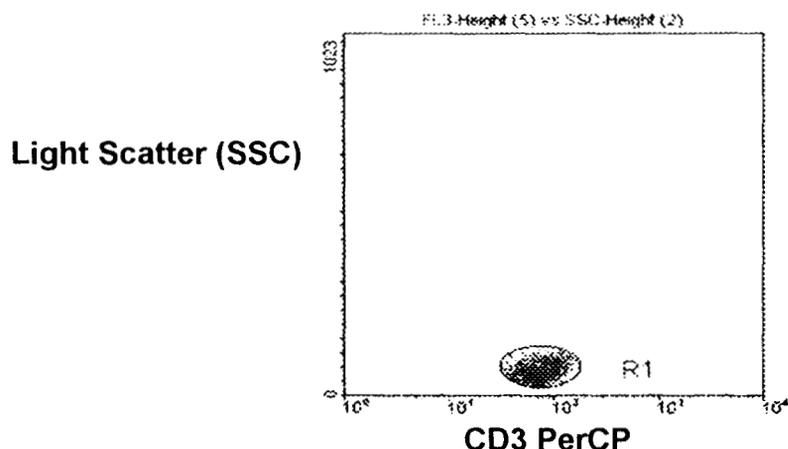
**Figura 6.** Gráfica de puntos (FSC contra SSC) para definir la región R1 (total de linfocitos).

Antes de empezar a adquirir las muestras hay que hacer un llenado de la ficha de registro del paciente, donde también se define el número de células a alcanzar. En el caso del estudio de sub-poblaciones de linfocitos se adquieren 10 000 eventos, en el de activación linfocitaria se obtienen 20 000 eventos.

Para confirmar la región de linfocitos establecida por su tamaño y complejidad interna (FSC-SSC) se usa el mismo programa y el reactivo LeucoGATE (CD45/CD14) CD45 identifica a todos los leucocitos y el CD14 a los monocitos, de esta forma se instaura una región de análisis que no está contaminada por más del 5% de los monocitos de la muestra, que permite recuperar el 95% de los linfocitos, estableciendo la pureza de la región. Para determinar las células positivas y negativas de cada combinación de anticuerpos se utilizó una combinación de anticuerpos inespecíficos como control negativo, con lo que se detectaron auto fluorescencias y se definió la altura de los cuadrantes en las gráficas de puntos.

Para adquirir las muestras en las que se detectó activación celular hay que calibrar nuevamente el citómetro, en este caso el ensayo se denomina "Tritest" (tres anticuerpos con tres fluorescencias), con la ayuda del software AutoCOMP. Al entrar al programa de Lysys II para la adquisición se debe calibrar y ajustar el equipo de la forma descrita en el apartado anterior.

Para la adquisición de las muestras de tres colores, la gráfica que se solicita es de FL3 para el eje de la X, contra SSC el eje de la Y (Figura 7), donde también se define una región R1, a través de un polígono que limita la población de linfocitos CD3<sup>+</sup> a partir de la cual proporcionará la subpoblación de linfocitos que le sea demandada de acuerdo a la combinación de anticuerpos monoclonales utilizados.

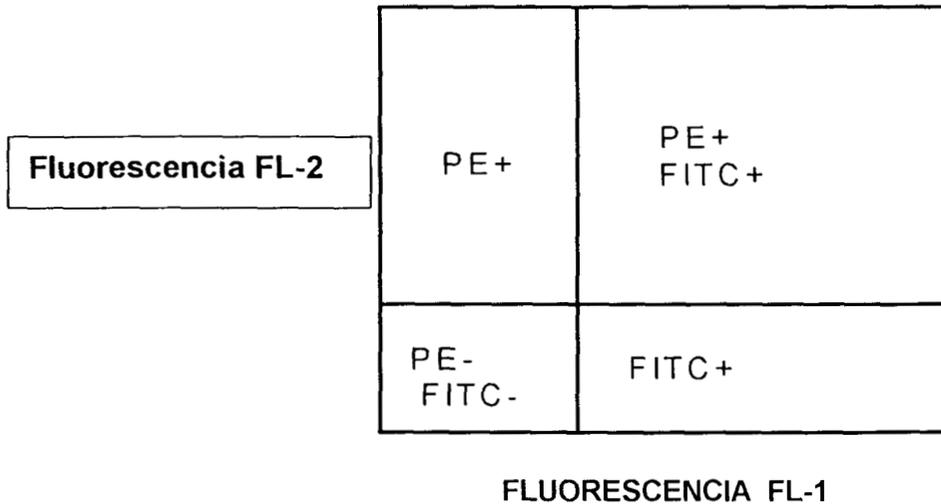


**Figura 7.** Gráfica de puntos (FL3 contra SSC) para muestra de tritest (linfocitos CD3<sup>+</sup>) y también utilizada para obtener los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> y los CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>.

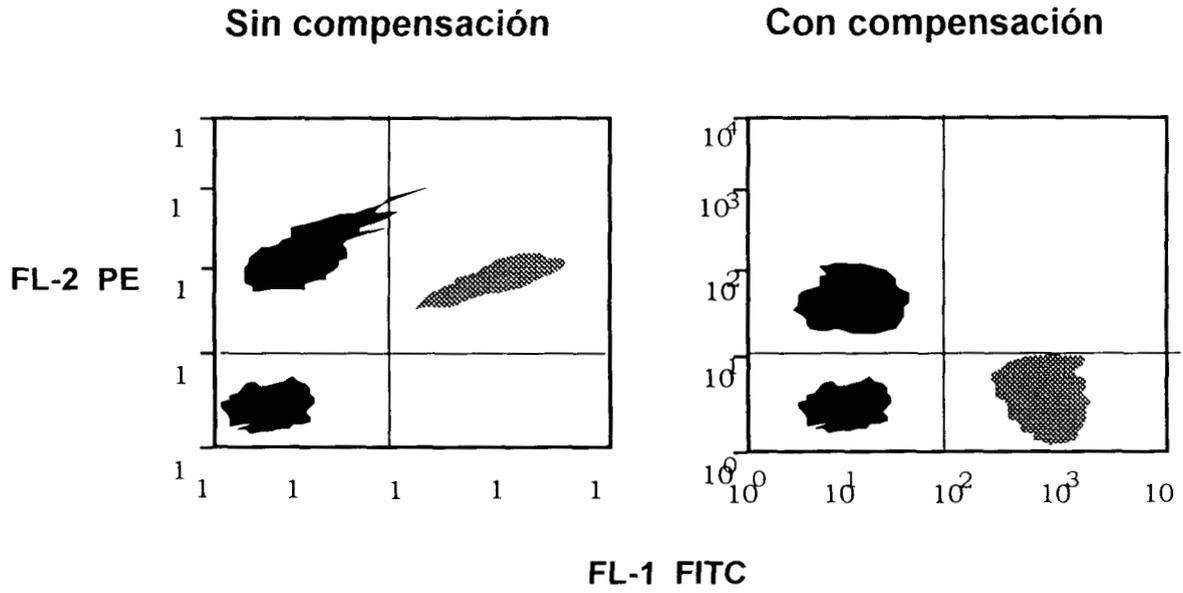
Conforme se van adquiriendo las muestras, los datos se van almacenando en la memoria de la computadora del citómetro, en el subdirectorío que se halla definido previamente en la ficha.

El análisis de los datos se puede hacer inmediatamente después de la adquisición de la muestra o en cualquier otro momento. El acceso se tiene a través de la ficha de registro del paciente. La primera gráfica que se pide en el análisis de la subpoblación de linfocitos es la de FSC contra SSC, donde se ratifica la región R1 de linfocitos para que a partir de ella se obtengan las diferentes combinaciones de fluorescencias trabajadas, las cuales serán asignadas como fluorescencia 1 (FL1) contra fluorescencia 2 (FL2) y se analizan con la ayuda de "cuadrantes" que discriminan las diferentes sub-poblaciones como se indica en la [Figura 8](#). Independientemente de las combinaciones que se usen de anticuerpos, la fluoresceína (FITC) siempre será la fluorescencia FL1, la ficoeritrina (PE) la fluorescencia FL2 y la proteína peridina cloridina (PerCP) la fluorescencia FL3

(Becton Dickinson, manual). En la Figura 9 se muestra las imágenes que se obtienen de las diferentes sub-poblaciones antes y después de la compensación.



**Figura 8.** Lectura de las fluorescencias en las gráficas. En el cuadrante inferior derecho es positivo a la fluoresceína (FITC) FL1, el cuadrante superior izquierdo es positivo a la ficoeritrina (PE) FL2, el cuadrante superior derecho es positivo para ambos fluorocromos (PE y FITC) FL1 y FL2 y el cuadrante inferior izquierdo es negativo para ambos fluorocromos.



**Figura 9.** Imágenes sobre la importancia de la compensación para obtener las diferentes sub-poblaciones de linfocitos en el cuadrante correspondiente.

## RESULTADOS

### I. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Las características clínicas de los niños en el momento de la toma de la muestra de sangre fueron las siguientes: los niños BNI y los DES con infección gastrointestinal presentaron diarrea con diferentes grados de deshidratación y fiebre. Los niños con infección respiratoria mostraron tos, fiebre y diferentes grados de insuficiencia respiratoria. Los niños con infección mixta mostraron la combinación de ambos cuadros infecciosos. En Los niños que se sospechó infección de tipo viral, tuberculosis, enfermedades cardiacas o enfermedades alérgicas fueron excluidos de la investigación.

El promedio de la concentración de hemoglobina en los niños BNI fue de  $11.5 \pm 0.7$  g/L; cuatro niños tenían anemia con un promedio en la concentración de hemoglobina de  $<10$  g/L. Los niños desnutridos presentaron anemia severa, con un promedio de la concentración de hemoglobina de  $8.3 \pm 1.0$  g/L, sólo en tres casos la concentración de hemoglobina fue normal. En los niños BN la concentración de hemoglobina fue de  $13.0 \pm 1.3$  g/L, solo cuatro niños presentaron anemia con una concentración de hemoglobina de  $<10$  g/L. La cuenta de leucocitos en los niños BN, BNI y DES fue el esperado para su edad, con un promedio de  $8.6 \pm 1.3 \times 10^6$  cells/L,  $9.0 \pm 1.6 \times 10^6$  cells/L y  $10.5 \pm 3.8 \times 10^6$  cells/L respectivamente. Dentro de los leucocitos la distribución de las células fue de la siguiente manera:  $58.1 \pm 9.8\%$  de linfocitos y  $40.0 \pm 8.4\%$  de neutrófilos en los niños BN;  $55.1 \pm 10.6\%$  de linfocitos y  $43.8 \pm 10.3\%$  de neutrófilos en los niños BNI y de  $46.1 \pm 10.3\%$  para linfocitos y de  $53.1 \pm 10.3\%$  para neutrófilos, en los niños DES, los cuales fueron ligeramente diferentes a los valores esperados para su edad [Games & Palacios, 1995].

## II. INTERVALOS DE REFERENCIA DE LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN NIÑOS PREESCOLARES SANOS

Un objetivo importante de la investigación fue determinar los valores de referencia en el grupo testigo, formado por niños preescolares sanos, que servirían de base para detectar los cambios o alteraciones que pudieran presentar los niños bien nutridos con infección asociada (BNI), y además poder establecer las comparaciones en las sub-poblaciones de linfocitos, entre ellos y con los niños desnutridos con infección asociada (DES). Estos valores también fueron de utilidad en el análisis de la activación de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos.

Los datos de los niños BN se agruparon por sexo y edad para determinar si estas características establecen diferencias en los porcentajes de leucocitos, de las sub-poblaciones de linfocitos T, B, NK, de las sub-poblaciones CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, de la relación T4/T8, de linfocitos T activos (HLA-DR<sup>+</sup>), de células CD45RA<sup>+</sup> (células nativas), de células CD45RO<sup>+</sup> (células de memoria) y de las CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> "opacas"; así como en el proceso activación temprana (CD69<sup>+</sup>) ante los diferentes mitógenos. Para el caso de la edad se agruparon a los niños en diferentes formas de acuerdo a reportes previamente publicados, para buscar diferencias estadísticas de acuerdo a este parámetro, con base a la distribución de las edades de los niños se consideró agruparlos, para el caso de los leucocitos y sub-poblaciones de linfocitos en tres grupos: de 8 a 24 meses, de 2 a 4 años y de mayores de 4 a 5 años. En el caso de células nativas y de memoria, así como para los linfocitos activos por ser menor el número de niños analizados, se agruparon en niños menores de 3 años y niños mayores de 3 años. De igual forma para encontrar las diferencias relacionadas con el sexo, primero se formaron grupos de niños menores y mayores de tres años y posteriormente se analizó el conjunto de todos los niños BN.

En el caso de los números absolutos, el conteo de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos no se pudo realizar en todos los niños, en los BN solo se realizó en el 25%; sin embargo, en el caso de células nativas y de memoria y en la activación de linfocitos estos niños representaron el 70% del grupo control. En los BNI se calcularon los números absolutos en el 81% de los niños y en los DES en el 42%.

A continuación se presentan los datos y el análisis estadístico encontrados en los diferentes grupos celulares:

### **A. LEUCOCITOS EN PREESCOLARES SANOS**

Con relación a los diferentes tipos de leucocitos obtenidos por citometría de flujo (Cuadro 6), se detectó diferencia estadística entre el porcentaje promedio de linfocitos, granulocitos y monocitos con relación a los diferentes grupos de edad. Los números absolutos exhibieron un comportamiento muy parecido al de los porcentajes promedios, sin ser estadísticamente significativos. Los niños de 8 a 24 meses exhibieron un porcentaje promedio mayor de linfocitos  $56.4 \pm 2.8\%$ , al que presentan los niños de 2 a 4 años y de los mayores de 4 a 5 años, siendo para estos últimos significativa la diferencia ( $46.1 \pm 4.2$  y  $36.5 \pm 2.3\%$ , respectivamente,  $p < 0.0004$ ). En cambio en los granulocitos, los niños de 8 a 24 meses mostraron valores promedio por abajo de los encontrados en los niños de 2 a 4 años y de los mayores de 4 a 5 años, siendo para ambos grupos significativa la diferencia ( $32.0 \pm 2.8$ ,  $43.3 \pm 4.2$  y  $52.8 \pm 2.4\%$ , respectivamente,  $p < 0.0002$ ) con respecto a los primeros. En los monocitos los niños que presentaron los valores más altos fueron los niños mayores de 4 años a 5 años con un porcentaje promedio de  $6.4 \pm 0.5\%$ , en relación con los niños de 8 a 24 meses y de 2 a 4 años ( $4.4 \pm 0.4$  y  $4.9 \pm 0.4\%$  respectivamente,  $p < 0.03$ ) siendo la diferencia significativa con el primer grupo.

Con relación al sexo en los leucocitos de los niños preescolares sanos (BN), no se encontraron diferencias estadísticas en los linfocitos y en los monocitos, solo se encontró diferencia estadística en los granulocitos; las niñas presentan un porcentaje

promedio mayor de  $47.1 \pm 2.9\%$  (n=18) al que presentan los niños  $37.7 \pm 2.9\%$  (n=24,  $p < 0.04$ ).

**Cuadro 6. Porcentaje promedio y números absolutos ( $\times 10^6/L$ , en negrillas) de los diferentes tipos de leucocitos en niños preescolares sanos (BN).**

Tipo Celular	Niños de 8 a 24 meses (n=16)		Niños >2 a 4 años (n=11)		Niños >4 a 5 años (n=15)	
	Prom	$\pm$ E. E.	Prom	$\pm$ E. E.	Prom	$\pm$ E. E.
<b>Linfocitos</b>	56.4	2.8	46.1	4.2	36.5	2.3*
	<b>2894</b>	<b>399</b>	<b>2163</b>	<b>289</b>	<b>1139</b>	<b>76</b>
<b>Granulocitos</b>	32.0	2.8	43.3	4.2*	52.8	2.4*
	<b>1163</b>	<b>179</b>	<b>1299</b>	<b>611</b>	<b>1824</b>	<b>205</b>
<b>Monocitos</b>	4.4	0.4	4.9	0.4	6.4	0.5*
	<b>153</b>	<b>31</b>	<b>164</b>	<b>39</b>	<b>289</b>	<b>8</b>

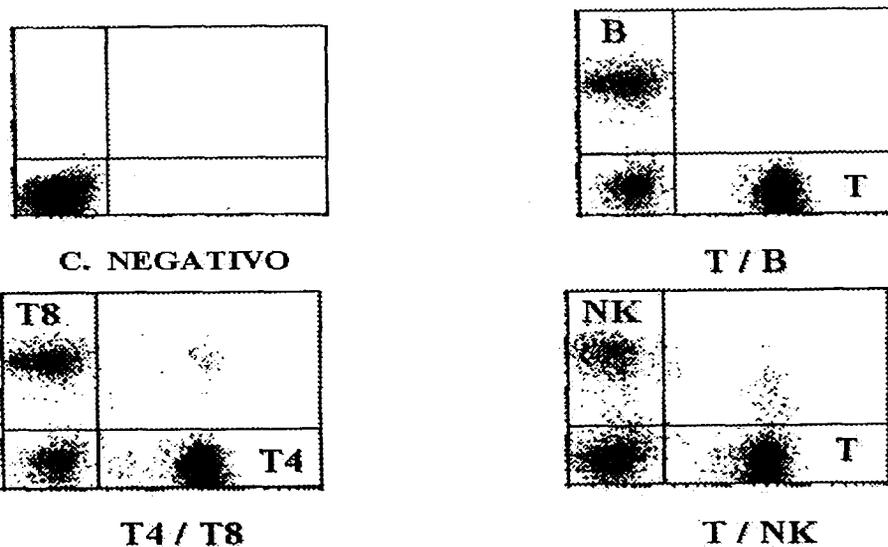
\* Indica diferencia estadística con los niños de 8 a 24 meses: linfocitos  $p < 0.0004$ , granulocitos  $p < 0.0002$  y monocitos  $p < 0.03$ .

## B. SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN PREESCOLARES SANOS

En las sub-poblaciones de linfocitos T ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$  y relación  $CD4/CD8$ ) y NK, así como en los linfocitos T activos ( $HLA-DR^+$ ), no se encontraron diferencias estadísticas en los porcentajes promedio de acuerdo a la edad (Cuadro 7). Sólo en los linfocitos T ( $CD3^+$ ) y B ( $CD20^+$ ) se encontraron diferencias estadísticas con relación a la edad, donde los niños menores de dos años presentaron en los linfocitos  $CD3^+$  promedio menor al que mostraron los niños de 2 a 4 años ( $61.2 \pm 1.3$  vs  $68.0 \pm 1.9\%$ ,  $p < 0.02$ ). En la Figura 10, se muestran las gráficas de puntos de donde se obtuvieron los diferentes porcentajes de estas sub-poblaciones.

En los linfocitos B (CD20<sup>+</sup>) los niños de 8 a 24 meses obtuvieron un valor de 24.0 ± 1.5%, que esta por arriba de la que presentaron los niños mayores de dos a cinco años (17.3 ± 1.5 y 17.9 ± 1.6%, respectivamente, p<0.003). Con relación al sexo no se encontraron diferencias estadísticas en las sub-poblaciones de linfocitos. Los números absolutos observaron el mismo comportamiento al del porcentaje promedio, sin presentar diferencias estadísticas.

## Gráficas de punto del análisis del inmunofenotipo



**Figura 10.** Gráficas de puntos sobre las diferentes sub-poblaciones de linfocitos, en el análisis de citometría de flujo.

**Cuadro 7. Porcentaje promedio y números absolutos ( $\times 10^6/L$ , en negrillas) de sub-poblaciones de linfocitos en niños preescolares sanos.**

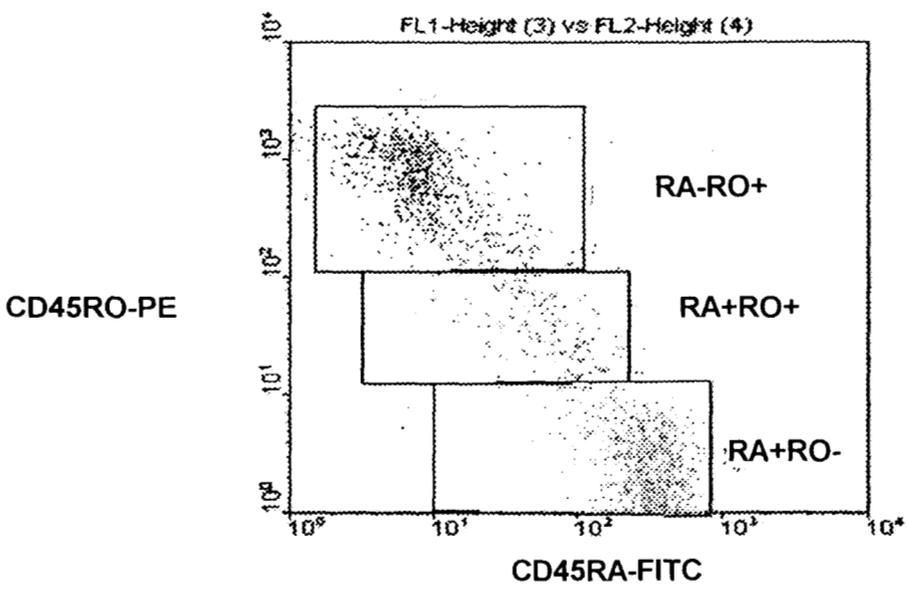
Linfocitos	Niños de 8 a 24 meses (n=16)		Niños >2 a 4 años (n=11)		Niños >4 a 5 años (n=15)	
	Prom	± E. E.	Prom	± E. E.	Prom	± E. E.
T (CD3 <sup>+</sup> )	61.2	1.3	68.0	1.9*	63.5	2.4
	<b>2814</b>	<b>413</b>	<b>4241</b>	<b>239</b>	<b>1796</b>	<b>424</b>
B (CD20 <sup>+</sup> )	24.0	1.5	17.3	1.5*	17.9	1.6*
	<b>1255</b>	<b>227</b>	<b>748</b>	<b>161</b>	<b>748</b>	<b>161</b>
NK (CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> )	12.4	1.3	10.7	2.2	14.8	1.6
	<b>477</b>	<b>75</b>	<b>392</b>	<b>84</b>	<b>411</b>	<b>85</b>
CD4 <sup>+</sup>	36.1	1.4	36.2	2.4	33.7	1.6
	<b>1772</b>	<b>228</b>	<b>2017</b>	<b>336</b>	<b>1809</b>	<b>332</b>
CD8 <sup>+</sup>	29.1	1.5	30.5	1.8	30.2	1.8
	<b>849</b>	<b>193</b>	<b>1183</b>	<b>134</b>	<b>878</b>	<b>98</b>
CD4/CD8	1.3	0.1	1.3	0.1	1.2	0.1
Tact CD3 <sup>+</sup>	10.3	1.4	10.5	1.9	10.3	1.0
(HLA-DR <sup>+</sup> )	<b>518</b>	<b>130</b>	<b>591</b>	<b>169</b>	<b>591</b>	<b>169</b>

\* Indica diferencia estadística con los niños de 8 a 24 meses: CD3<sup>+</sup> p<0.02 y CD20<sup>+</sup> p<0.003.

### C. CÉLULAS NATIVAS, DE MEMORIA Y DOBLES POSITIVAS EN PREESCOLARES SANOS

Estas sub-poblaciones de células, se pudieron determinar sólo en 18 niños. Se realizó el mismo proceso de análisis por edades como en el caso de los subtipos de linfocitos mencionados en el apartado anterior. Debido al número reducido de pacientes en cada grupo y dado que no se obtenían diferencias significativas, se agruparon los datos de estas poblaciones celulares en niños menores de tres años y mayores de tres años. Así mismo, para la observación de estas células se realizó en

dos modalidades: la primera fue considerando el total de linfocitos, de esta forma se regionalizó (R1) en una gráfica de puntos (FSC-SSC, Fig. 6) de acuerdo a la complejidad interna y tamaño de las células. La segunda forma de análisis fue para obtener sólo los linfocitos CD4<sup>+</sup> (R1) nativos (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), de memoria (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) y dobles positivos (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>), a través de una gráfica (FL-3-SSC, Fig. 7). Para las dos formas de análisis la gráfica de puntos a través de la cual se obtuvo el porcentaje de las diferentes sub-poblaciones anteriormente mencionadas se muestra en la Fig. 11.



**Figura 11.** Gráfica de puntos de las isoformas CD45. Células CD45RA+CD45RO- (nativas), células CD45RA-CD45RO+ (células de memoria) y células CD45RA+CD45RO+ (dobles positivas).

En la primera forma de análisis, a partir del total de linfocitos, se encontraron diferencias estadísticas con relación a la edad en las isoformas CD45RA<sup>+</sup> y CD45RO<sup>+</sup>, los niños menores de tres años obtuvieron porcentajes mayores de células nativas (75.3 ± 2.8%) al que presentan los niños mayores de tres años (61.3

$\pm 4.5\%$ ,  $p < 0.01$ ), en las células de memoria se invierte el proceso, los niños menores de tres años tienen porcentajes promedio más bajos al que mostraron los niños mayores de tres años ( $13.6 \pm 1.8$  vs  $21.8 \pm 2.0\%$ ,  $p < 0.02$ ). En las células  $CD45RA^+/CD45RO^+$  no se obtuvieron diferencias estadísticas, sin embargo hay un ligero aumento de células dobles positivas en los niños mayores de tres años. En el Cuadro 8 se muestran los valores de referencia para niños mayores y menores de tres años para estos tres grupos celulares.

En la segunda forma de análisis con región en linfocitos  $CD4^+$ , se encontraron diferencias estadísticas con relación a la edad en las células  $CD4^+CD45RA^+$ ,  $CD4^+CD45RO^+$  y  $CD4^+CD45RA^+/CD45RO^+$ , los niños menores de tres años exhibieron un aumento en el porcentaje promedio de células nativas y porcentajes más bajos en células de memoria y dobles positivas, a su vez los niños mayores de tres años mostraron porcentajes promedio disminuidos de células nativas y altos porcentajes en las células de memoria y dobles positivas.

Los valores de referencia (Cuadro 8) para niños menores y mayores de tres años fueron: células  $CD4^+CD45RA^+$  ( $71.4 \pm 1.9$  vs  $55.5 \pm 3.2\%$ ,  $p < 0.002$ ), células  $CD4^+CD45RO^+$  ( $19.4 \pm 1.5$  vs  $31.5 \pm 2.7\%$ ,  $p < 0.003$ ) y células  $CD4^+CD45RA^+/CD45RO^+$  ( $8.8 \pm 1.0$  vs  $12.8 \pm 1.3\%$ ,  $p < 0.01$ ). Un aspecto importante es que con ambas formas de análisis, de linfocitos totales y linfocitos  $CD4^+$ , se observa menor porcentaje de células  $CD45RO^+$  y mayor porcentaje de células  $CD45RA^+$  en los niños menores de tres años.

Con relación al sexo, aunque disminuyó el número de pacientes ( $n=18$ ) y el de niñas fue muy pequeño, se analizaron con relación a este rubro entre los menores de tres años (2 fem y 8 masc), los mayores de tres años (2 fem y 6 masc) y en todo el grupo de preescolares (4 fem y 14 masc), sin encontrarse diferencias estadísticas. Los números absolutos, aunque mostraron un comportamiento similar al de los porcentajes promedio, las diferencias no fueron significativas.

**Cuadro 8. Porcentajes promedio y números absolutos ( $\times 10^6/L$ , en negrillas) de células nativas, de memoria y dobles positivas en niños preescolares sanos.**

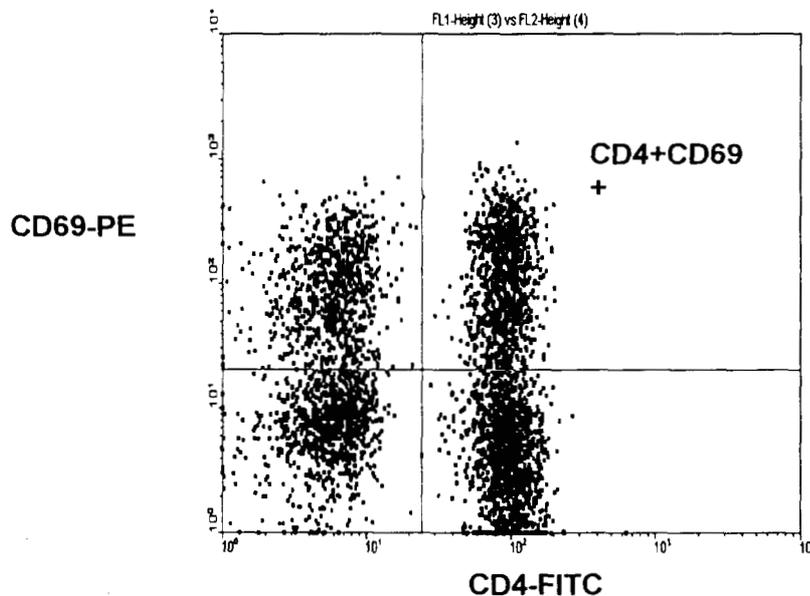
Tipo Celular	Niños < de 3 Años (n=10)		Niños > de 3 Años (n=8)	
	Prom	± E. E.	Prom	± E. E.
CD45RA <sup>+</sup>	75.3	2.8	61.3	4.5*
	<b>3535</b>	<b>444</b>	<b>2273</b>	<b>885</b>
CD45RO <sup>+</sup>	13.6	1.8	21.8	2.0*
	<b>577</b>	<b>68</b>	<b>793</b>	<b>146</b>
CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	7.5	1.4	9.3	1.1
	<b>301</b>	<b>45</b>	<b>544</b>	<b>117</b>
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>	71.4	1.9	55.5	3.2*
	<b>3339</b>	<b>401</b>	<b>1841</b>	<b>412</b>
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	19.4	1.5	31.5	2.7*
	<b>778</b>	<b>115</b>	<b>1021</b>	<b>127</b>
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	8.8	1.0	12.8	1.3*
	<b>376</b>	<b>37</b>	<b>533</b>	<b>74</b>

\*Indica diferencia estadística entre ambos grupos: CD45RA<sup>+</sup> p<0.01, CD45RO<sup>+</sup> p<0.02, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> p<0.002, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> p<0.003 y CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> p< 0.01.

### III. ACTIVACIÓN DE LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN NIÑOS PREESCOLARES SANOS

Para valorar la funcionalidad de los linfocitos se activó sangre completa *in vitro* durante cuatro horas, utilizando diferentes mitógenos para cada grupo celular, en el caso de las sub-poblaciones de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), se utilizó un segundo mitógeno como control positivo. En los datos obtenidos se determinó si la edad influye en la activación de los linfocitos. En relación con el sexo se hizo el mismo análisis como en

las células nativas y de memoria. En la Figura 12, se muestra la gráfica de puntos del porcentaje de la subpoblación celular y del porcentaje de células activas.



**Figura 12.** Análisis representativo de una gráfica de puntos en citometría de flujo. La subpoblación activada se muestra en el cuadrante superior derecho.

Primero se abordará lo referente a la funcionalidad de sub-poblaciones de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) para posteriormente describir lo relacionado con los linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) y NK (CD56<sup>+</sup>).

#### **A. ACTIVACIÓN DE SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS T (CD3<sup>+</sup>) EN PREESCOLARES SANOS**

En el porcentaje promedio de los linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y la relación CD4/CD8 de los niños preescolares, no se encontraron diferencias estadísticas con relación a la edad (menores y mayores de tres años). Al analizar el porcentaje promedio de células activas con PHA y por medio del marcador de activación

temprana (CD69), se observó que los niños menores de tres años tienen disminuida la capacidad para activar sus linfocitos de acuerdo a la que presentan los niños mayores de tres años, siendo estadísticamente significativas. En el Cuadro 9 se muestran los porcentajes obtenidos para cada subpoblación de linfocitos T y de las células activas (CD69<sup>+</sup>). Se obtuvieron diferencias estadísticas con relación a la edad, en los porcentajes promedios de las células CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> ( $18.3 \pm 2.6$  vs  $36.9 \pm 3.9\%$  respectivamente,  $p < 0.005$ ), CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> ( $11.1 \pm 1.7$  vs  $23.7 \pm 3.3\%$ ,  $p < 0.01$ ) y CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> ( $6.8 \pm 1.2$  vs  $13.2 \pm 1.4\%$ ,  $p < 0.009$ ). No se encontraron diferencias relacionadas con el sexo. Nuevamente para estas sub-poblaciones aunque los números absolutos mostraron las mismas tendencia los porcentajes no fueron significativos.

Al activar las sub-poblaciones de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) con CD2-CD2R (control positivo) no se encontraron diferencias estadísticas en relación con la edad, ni con el sexo, así mismo ni al comparar los porcentajes promedio con los datos obtenidos con la PHA en los niños mayores de tres años (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Porcentajes promedio y números absolutos ( $\times 10^6/L$ , en negrillas) de las sub-poblaciones de linfocitos activados con PHA y CD2-CD2R en niños preescolares sanos.**

Tipo Celular	Niños < de 3 Años (n=10)		Niños > de 3 Años (n=7)		CD2-CD2R (n=18)	
	Prom	± E. E.	Prom	± E. E.	Promedio	± E. E.
CD3 <sup>+</sup>	61.0	3.7	60.8	2.4	61.0	4.0
	<b>3088</b>	<b>497</b>	<b>2233</b>	<b>648</b>	<b>2634</b>	<b>481</b>
CD4 <sup>+</sup>	59.5	2.7	56.6	2.4	59.0	1.8
	<b>2870</b>	<b>285</b>	<b>2184</b>	<b>852</b>	<b>2726</b>	<b>377</b>
CD8 <sup>+</sup>	29.8	2.1	34.1	2.2	31.0	1.6
	<b>1342</b>	<b>222</b>	<b>1241</b>	<b>199</b>	<b>1320</b>	<b>220</b>
CD4/CD8	2.1	0.2	1.8	0.2	2.0	0.2
CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	18.3	2.6	36.9	3.9*	32.0	2.6
	<b>732</b>	<b>171</b>	<b>1439</b>	<b>666</b>	<b>1448</b>	<b>353</b>
CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	11.1	1.7	23.7	3.3*	20.1	1.8
	<b>471</b>	<b>111</b>	<b>952</b>	<b>540</b>	<b>935</b>	<b>244</b>
CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	6.8	1.2	13.2	1.4*	12.0	1.4
	<b>260</b>	<b>66</b>	<b>488</b>	<b>136</b>	<b>508</b>	<b>120</b>

\* Indica diferencia estadística entre los menores y mayores de tres años, estimulados con PHA: CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> p<0.005, CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> p<0.01 y CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> p<0.009.

## **B. ACTIVACIÓN DE SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS B (CD19<sup>+</sup>) y NK (CD56<sup>+</sup>) EN PREESCOLARES SANOS**

En los linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) de sangre periférica, se encontró diferencias estadísticas de acuerdo a la edad (Cuadro 10), siendo los niños menores de tres años los que presentaron los valores más altos ( $23.5 \pm 1.4\%$ ), que los niños mayores de tres años ( $18.9 \pm 1.4\%$ , p<0.04); estos datos correlacionan con los datos encontrados en la primera parte de sub-poblaciones de linfocitos, donde se empleó otra combinación de anticuerpos, técnica de tinción y se realizó también una

regionalización diferente (Fig. 7). En los linfocitos CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> no se encontraron diferencias en relación con la edad.

**Cuadro 10.** Porcentajes promedio y números absolutos (X 10<sup>6</sup>/L, en negrillas) de linfocitos B Y NK activados con PWM e IL-2 en niños preescolares sanos.

Tipo Celular	Niños < de 3 Años (n= 10)		Niños > de 3 Años (n= 7)	
	Prom.	± E. E.	Prom	± E. E.
B (CD19 <sup>+</sup> )	23.5	1.4	18.9	1.4*
	<b>1190</b>	<b>209</b>	<b>601</b>	<b>154</b>
NK (CD16+CD56 <sup>+</sup> )	10.1	2.7	8.8	1.1
	<b>570</b>	<b>233</b>	<b>345</b>	<b>44</b>
CD19 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	6.2	0.8	4.2	0.5
	<b>316</b>	<b>46</b>	<b>162</b>	<b>67</b>
CD16+CD56CD69 <sup>+</sup>	5.0	0.6	8.8	1.1
	<b>279</b>	<b>31</b>	<b>252</b>	<b>36</b>

\* Indica diferencia estadística entre ambos grupos: CD19<sup>+</sup> p<0.04.

En los linfocitos NK (CD56<sup>+</sup>) no se encontraron diferencias relacionadas con la edad y el sexo, en su porcentaje total y en el porcentaje de células activas (CD69<sup>+</sup>).

#### **IV. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO (BNI Y DES) CON LOS VALORES DE REFERENCIA OBTENIDOS DE LOS NIÑOS PREESCOLARES SANOS EN LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS**

Para esta parte del trabajo, el grupo control (BN) de 42 niños se utilizó en el análisis de linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, relación CD4/CD8, NK (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) y de linfocitos T (HLA-DR<sup>+</sup>) por no presentar diferencias estadísticas de acuerdo a la edad en estas sub-poblaciones. En el análisis de los monocitos el grupo de BN fue de 27 niños, considerando a los niños de 8 a 24 meses (n=16) y los niños mayores de 2 a 4 años. En el caso de linfocitos totales, granulocitos, linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) y B (CD20<sup>+</sup>) solo se consideró a los niños de 8 a 24 años (n=16) por presentar diferencias estadísticas con relación a la edad en estas sub-poblaciones.

Para evaluar los cambios relacionados con la infección, los niños BNI y DES se agruparon de acuerdo al tipo de infección: gastrointestinal, respiratoria y mixta y se analizaron dentro del grupo de bien nutridos con infección y de los desnutridos por tipo de infección. Posteriormente se compararon los datos de los BNI por tipo de infección con los de los DES que presentaron el mismo tipo de infección. En el caso de los niños DES también se hizo un análisis con relación al tipo y grado de desnutrición (segundo grado, tercer grado y dentro de estos últimos desnutrición tipo kwashiorkor y marasmo).

##### **A. LEUCOCITOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

Al comparar los resultados de los porcentajes de los leucocitos, se observó una disminución en el porcentaje total de linfocitos en los niños BNI y en los niños DES, con relación a los BN, siendo la diferencia significativa con los DES. En los monocitos no se observaron diferencias, los valores de los niños fueron cercanos ( $5.1 \pm 0.5$ ,  $6.2 \pm 0.6$  y  $4.6 \pm 0.3\%$ , respectivamente). Los granulocitos aumentaron significativamente en los niños infectados con relación a los valores del grupo testigo (Cuadro 1).

Los porcentajes promedio de los grupos BN, BNI y DES fueron: linfocitos  $56.4 \pm 2.8$ ,  $46.8 \pm 4.3$  y  $45.0 \pm 3.5\%$ , respectivamente ( $p < 0.03$ ). Los granulocitos con valores de  $32.0 \pm 2.8$ ,  $41.8 \pm 4.5$  y  $43.3 \pm 3.9\%$ , respectivamente ( $P < 0.05$ ). Los datos individuales de los leucocitos en los niños BN se observan en el Anexo I, Cuadro 1a y Cuadro 2a. Los datos individuales de los niños BNI y DES en el mismo anexo en el Cuadro 3a y el Cuadro 4a, respectivamente.

**Cuadro 11. Porcentaje promedio y números absolutos ( $\times 10^6/L$ , en negrillas) de leucocitos de sangre periférica en los grupos de estudio.**

Tipo Celular	BN (n= 16)		BNI (n= 14)		DES (n=18)	
	Prom.	$\pm$ E. E.	Prom.	$\pm$ E. E.	Prom.	$\pm$ E. E.
Linfocitos	56.4	2.8	46.8	4.3	45.0	3.5*
	<b>2597</b>	<b>340</b>	<b>2097</b>	<b>274</b>	<b>1659</b>	<b>298</b>
Granulocitos	32.0	2.8	41.8	4.5*	43.3	3.9*
	<b>1323</b>	<b>611</b>	<b>1869</b>	<b>235</b>	<b>2004</b>	<b>401</b>
Monocitos <sup>1</sup>	4.6	0.3	5.1	0.5	6.2	0.6
	<b>182</b>	<b>39</b>	<b>240</b>	<b>30</b>	<b>225</b>	<b>38</b>

<sup>1</sup> En este grupo los niños BN fueron 27. \* Indica diferencia estadística contra los BN: en linfocitos  $p < 0.03$  y en granulocitos  $p < 0.05$ .

### LEUCOCITOS POR TIPO DE INFECCIÓN Y TIPO Y GRADO DE DESNUTRICIÓN

En el análisis por tipo de infección en los niños BNI, se encontró diferencia estadística entre los niños con infección respiratoria ( $n=5$ ) e infección mixta ( $n=6$ ) en los linfocitos totales,  $63.9 \pm 10.0\%$  los primeros y  $37.4 \pm 4.8\%$  ( $p < 0.04$ ) los segundos. En el caso de los niños DES también se encontraron diferencias estadísticas en niños que padecían esas mismas entidades patológicas, pero en monocitos

presentando valores de  $3.7 \pm 0.5\%$  para los niños con infección respiratoria (n=4) y de  $7.8 \pm 0.9\%$  ( $p < 0.008$ ) para los de infección mixta (n=7). De acuerdo al tipo y grado de desnutrición no se encontraron diferencias estadísticas.

## **B. SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

Al comparar los datos de los niños BNI en relación con los BN se encontraron diferencias estadísticas en varias de las sub-poblaciones de linfocitos: linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, B (CD20<sup>+</sup>) y T (HLA-DR<sup>+</sup>). Los datos fueron: linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) con  $52.9 \pm 2.9$  vs  $61.2 \pm 1.3\%$ , respectivamente ( $p < 0.004$ ); CD4<sup>+</sup>  $29.3 \pm 2.4$  vs  $35.3 \pm 1.0\%$  ( $p < 0.01$ ); CD8<sup>+</sup>  $24.3 \pm 1.6$  vs  $29.9 \pm 1.0\%$  ( $p < 0.05$ ); CD20<sup>+</sup>  $31.7 \pm 2.4$  vs  $24.0 \pm 1.5\%$  ( $p < 0.03$ ) y en linfocitos T (HLA-DR<sup>+</sup>)  $6.9 \pm 1.6$  vs  $10.5 \pm 0.8\%$  ( $p < 0.05$ ). En los niños desnutridos no se encontraron diferencias estadísticas al comparar sus datos con los niños BN. (Cuadro 12)

Al observar los datos de los niños BNI y DES se aprecia que la subpoblación de linfocitos B (CD20) se encuentra significativamente disminuida en los DES ( $23.9 \pm 2.1$   $p < 0.03$ ). En el resto de las sub-poblaciones no se encontraron diferencias entre estos dos grupos.

Los linfocitos NK y la relación CD4/CD8 no presentó diferencia alguna, con una tendencia a mantenerse sin alteraciones entre los tres grupos de estudio. Los valores absolutos mostraron la misma tendencia en las sub-poblaciones de linfocitos, en los tres grupos, sin mostrar diferencias estadísticas.

Los valores individuales de las sub-poblaciones de linfocitos de los niños BN se muestran en el Anexo I, en el Cuadro 1a los linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, la relación CD4/CD8, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y T (HLA-DR<sup>+</sup>). En el Cuadro 2a los linfocitos CD3<sup>+</sup> y CD20<sup>+</sup>. En el caso de los BNI en el Cuadro 3a y de los DES en el Cuadro 4a también en el Anexo 1.

**Cuadro 12. porcentajes promedio y números absolutos ( $\times 10^6/L$ , en negrillas) de las sub-poblaciones de linfocitos en los grupos de estudio.**

Tipo Celular	BN (n=42)		BNI (n=14)		DES (n=18)	
	Prom	$\pm$ E. E.	Prom	$\pm$ E. E.	Prom	$\pm$ E. E.
T (CD3 <sup>+</sup> ) <sup>1</sup>	61.2	1.3	52.9	2.9*	56.1	2.9
	<b>2560</b>	<b>359</b>	<b>2395</b>	<b>229</b>	<b>2464</b>	<b>442</b>
CD4 <sup>+</sup>	35.3	1.0	29.3	2.4*	30.4	2.0
	<b>1787</b>	<b>244</b>	<b>1407</b>	<b>181</b>	<b>1210</b>	<b>133</b>
CD8 <sup>+</sup>	29.9	1.0	24.3	1.6*	28.6	2.4
	<b>983</b>	<b>141</b>	<b>965</b>	<b>130</b>	<b>964</b>	<b>215</b>
CD4/CD8	1.3	0.1	1.3	0.1	1.2	0.1
B (CD20 <sup>+</sup> ) <sup>1</sup>	24.0	1.5	31.7	2.4*	23.9	2.1**
	<b>1092</b>	<b>171</b>	<b>1410</b>	<b>165</b>	<b>974</b>	<b>109</b>
NK	12.8	1.0	12.9	2.1	10.5	1.9
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	<b>447</b>	<b>49</b>	<b>477</b>	<b>68</b>	<b>318</b>	<b>63</b>
T (LHA-DR <sup>+</sup> )	10.5	0.8	6.9	1.6*	9.9	1.8
	<b>518</b>	<b>130</b>	<b>406</b>	<b>49</b>	<b>555</b>	<b>216</b>

<sup>1</sup>Para estos tipos celulares los niños BN fueron 16. \* Indica diferencia estadística contra los BN: CD3<sup>+</sup> p<0.004, CD4<sup>+</sup> p<0.01, CD8<sup>+</sup> p<0.05, CD20 p<0.03 y T(HLA-DR<sup>+</sup>) p<0.05. \*\* Indica diferencia estadística contra BNI p<0.03.

### SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS POR TIPO DE INFECCIÓN Y TIPO Y GRADO DE DESNUTRICIÓN

Al buscar diferencias entre los BNI por el tipo de infección en las sub-poblaciones de linfocitos no se encontraron. En el caso de los niños DES se encontraron diferencias estadísticas en las células NK en los niños con infección respiratoria (n=4) comparadas con los niños de infección mixta (n=7):  $16.1 \pm 3.2$  y  $6.0 \pm 1.7\%$  respectivamente, p<0.02. En el caso de los niños BNI (n=6) contra DES (n=7) se encontraron diferencias estadísticas sólo en aquellos con infección mixta en las células NK ( $12.9 \pm 2.7$  y  $6.0 \pm 1.7\%$  respectivamente, p<0.02). Las células CD19<sup>+</sup>

aunque estadísticamente no fueron diferentes, en los niños con gastroenteritis e infección respiratoria, los DES presentaron valores disminuidos en relación con los niños BNI ( $27.2 \pm 2.9$ ,  $n=3$  vs  $36.8 \pm 4.8\%$   $n=7$  y  $15.1 \pm 5.0$ ,  $n=5$  vs  $28.3 \pm 5.7\%$ ,  $n=4$  respectivamente). Por tipo y grado de desnutrición no se encontraron diferencias estadísticas en ninguna de las sub-poblaciones de linfocitos.

### **C. CÉLULAS NATIVAS, DE MEMORIA Y DOBLES POSITIVAS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

Linfocitos de sangre periférica sin activar fueron analizados en BN, BNI y DES de acuerdo a la expresión de los antígenos de superficie  $CD45RA^+$ ,  $CD45RA^+/CD45RO^+$  y  $CD45RO^+$ , igual que en los niños sanos se realizaron dos formas de análisis, una para obtener en el total de linfocitos las células nativas, de memoria y las dobles positivas, y otra forma para obtener estos mismos subgrupos celulares dentro de las células  $CD4^+$ . En el Cuadro 13, se observa que los linfocitos totales  $CD45RA^+$  (nativos) en los grupos de estudio, presentaron promedios similares (BN  $75.3 \pm 2.8\%$ ; BNI  $77.3 \pm 1.3\%$  y DES  $72.6 \pm 2.3\%$ ), de igual manera en las células  $CD45RO^+$  (de memoria)  $13.6 \pm 1.8\%$ ;  $11.1 \pm 1.2\%$  y  $11.5 \pm 1.0\%$ , respectivamente y las células  $CD45RA^+/CD45RO^+$  (dobles positivas)  $7.5 \pm 1.4\%$ ;  $5.5 \pm 0.5$  y  $7.0 \pm 0.8\%$ , respectivamente.

El porcentaje de linfocitos  $CD4^+$  que expresaron estas isoformas mostraron las siguientes características. Las células  $CD4^+CD45RA^+$  en los niños BNI presentaron un porcentaje significativamente menor al de los niños BN ( $62.3 \pm 1.7\%$  vs  $71.4 \pm 1.9\%$ ,  $p<0.05$ ); así mismo, en las células  $CD4^+CD45RO^+$  se observaron diferencias significativas entre estos dos grupos de niños, obteniendo los primeros, porcentajes más altos ( $28.1 \pm 1.8\%$  vs  $19.4 \pm 1.5\%$ ,  $p<0.01$ ). No se encontraron diferencias estadísticas entre estos dos grupos de niños en las células  $CD4^+CD45RA^+/CD45RO^+$  ( $8.8 \pm 0.8\%$  vs  $8.8 \pm 1.0\%$ , respectivamente). Al comparar los datos de los niños DES con los BN solo se encontraron diferencias significativas en la subpoblación de

linfocitos CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>, siendo los niños DES los que obtuvieron porcentajes más altos ( $11.4 \pm 0.7\%$  vs  $8.8 \pm 1.0\%$ ,  $p < 0.02$ ).

**Cuadro 13. Porcentajes promedio y números absolutos ( $\times 10^6/L$ , en negrillas) de células nativas, de memoria y dobles positivas en sangre periférica de los grupos de estudio.**

Tipo Celular	BN (n=10)		BNI (n=12)		DES (n=15)	
	Prom.	$\pm$ E. E.	Prom.	$\pm$ E. E.	Prom.	$\pm$ E. E.
CD45RA <sup>+</sup>	75.3	2.8	77.3	1.3	72.6 $\pm$	2.3
	<b>3535 <math>\pm</math></b>	<b>444</b>	<b>3560</b>	<b>280</b>	<b>2728 <math>\pm</math></b>	<b>211</b>
CD45RO <sup>+</sup>	13.6	1.8	11.1	1.2	11.5	1.0
	<b>577</b>	<b>68</b>	<b>472</b>	<b>45</b>	<b>430</b>	<b>70</b>
CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	7.5 $\pm$	1.4	5.5	0.5	7.0	0.8
	<b>301</b>	<b>45</b>	<b>242</b>	<b>29</b>	<b>277</b>	<b>54</b>
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>	71.4	1.9	62.3	1.7*	68.2	2.2
	<b>3339</b>	<b>401</b>	<b>2756</b>	<b>246</b>	<b>2501</b>	<b>129</b>
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	19.4	1.5	28.1	1.8*	20.3	1.7**
	<b>778</b>	<b>115</b>	<b>1297</b>	<b>119*</b>	<b>781</b>	<b>119**</b>
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	8.8	1.0	8.8	0.8	11.4	0.7**#
	<b>376</b>	<b>37</b>	<b>434</b>	<b>70</b>	<b>509</b>	<b>52</b>

\* # Significa diferencias contra el grupo de los BN, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> ( $p < 0.02$ ), CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> ( $p < 0.005$  porcentaje y  $p < 0.01$  números absolutos), CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> DES ( $p < 0.02$ ).

\*\* Significa diferencias contra el grupo de los BNI, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> ( $p < 0.005$  porcentaje y  $p < 0.01$  valores absolutos), CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> ( $p < 0.02$ ).

Al analizar los datos entre los niños BNI y los DES, no se encontraron diferencias en las células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> ( $62.3 \pm 1.7\%$  vs  $68.2 \pm 2.2\%$ ); en cambio en las células CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, los niños BNI presentaron valores por arriba de los observados en los niños DES ( $28.1 \pm 1.8\%$  vs  $20.3 \pm 1.7\%$ ,  $p < 0.01$ ). En la [Figura 13](#), se muestra la

distribución de los datos de los diferentes grupos, donde los BNI presentan los valores más altos y se observa que los datos de los niños BN y DES son similares.

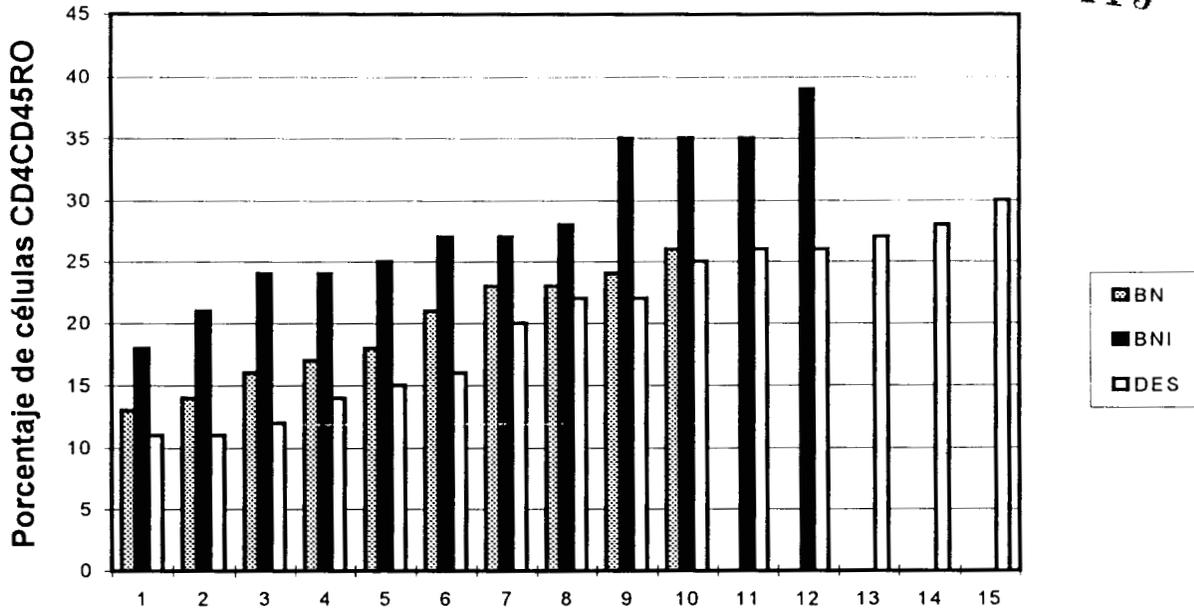
En las células  $CD4^+CD45RA^+/CD45RO^+$  los datos de los niños BNI exhiben porcentajes menores al de los niños DES ( $9.0 \pm 0.9\%$  vs  $11.4 \pm 0.8\%$ ,  $p < 0.03$ ). En la Figura 14, se muestran los valores de los tres grupos donde se aprecian los porcentajes mayores de los niños DES y los valores de los niños BN y BNI que en este caso son muy parecidos. La distribución de los valores absolutos de las células nativas, de memoria y dobles positivas mostraron la misma tendencia que los porcentajes promedio y solo se encontraron diferencias estadísticas en las células  $CD4^+CD45RO^+$ . Los valores individuales de las células nativas, de memoria y dobles positivas se presentan en el Anexo 1: Cuadro 5a para los niños BN, Cuadro 6a para los BNI y Cuadro 7a para los DES.

#### **CÉLULAS NATIVAS, DE MEMORIA Y DOBLES POSITIVAS POR TIPO DE INFECCIÓN Y TIPO Y GRADO DE DESNUTRICIÓN**

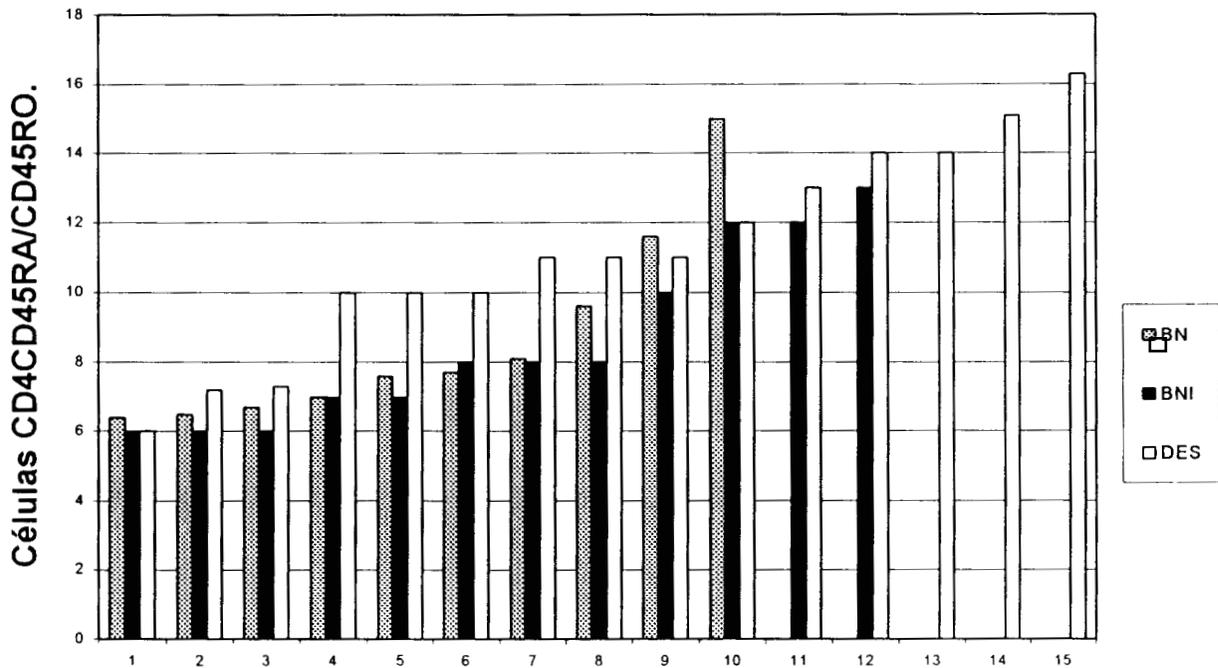
Al buscar diferencias en las células nativas y de memoria de acuerdo al tipo de infección, se encontraron entre los niños BNI en las células  $CD45RO^+$  entre los niños con infección gastrointestinal ( $n=3$ ) contra los de infección respiratoria ( $n=4$ )  $7.3 \pm 0.4$  vs  $12.2 \pm 2.2\%$ ,  $p < 0.03$ ; en los niños con infección respiratoria contra los niños con infección mixta ( $n=5$ ), en las células  $CD4^+CD45RA^+$  ( $69.7 \pm 1.9$  vs  $61.0 \pm 2.6\%$ ,  $p < 0.05$ ) siendo los primeros los que presentaron los valores más altos, más cercanos a los que presentan los niños BN. Entre los niños DES por tipo de infección no se encontraron diferencias. Al comparar los datos de los niños BNI contra los DES ( $n=5$ ) se encontraron diferencias en los niños con infección mixta en las células  $CD4^+CD45RO^+$  ( $31.0 \pm 3.6\%$  vs  $19.0 \pm 3.0\%$ , respectivamente,  $p < 0.05$ ).

De acuerdo a los diferentes tipos y grados de desnutrición se observaron diferencias sólo en las células  $CD4^+CD45RA^+/CD45RO^+$  entre los niños con desnutrición de segundo grado ( $n=6$ ) y los niños marasmáticos ( $n=6$ )  $13.4 \pm 1.0\%$  vs

227413



**Figura 13.** Porcentajes individuales de células CD4+CD45RO+ en los tres grupos de estudio. BN= bien nutridos, BNI= bien nutridos infectados y niños DES= desnutridos infectados.



**Figura 14.** Porcentajes individuales de las células CD4+CD45RA+/CD45RO+ en los grupos de estudio. BN= bien nutrido, BNI= bien nutridos infectados y niños DES= desnutridos infectados.

8.9 ± 1.0%, p<0.02, presentando estos últimos valores más cercanos a la de los niños BNI.

## V. ACTIVACIÓN DE SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

### A. LINFOCITOS T (CD3<sup>+</sup>, CD4 y CD8) B (CD19<sup>+</sup>) y NK (CD56<sup>+</sup>)

Los porcentajes promedio de las diferentes sub-poblaciones después de haber activado sangre periférica en los tres grupos de estudio se muestran en el Cuadro 14. Al comparar los datos de las sub-poblaciones de linfocitos se encontró, en los porcentajes de los linfocitos T (CD3), de los niños BNI con relación a los niños BN una disminución significativa en el porcentajes de los linfocitos CD3<sup>+</sup> (50.2 ± 2.5 vs 61.0 ± 3.7%, p<0.03), una ligera disminución de CD4<sup>+</sup> (54.5 ± 2.4 vs 59.5 ± 2.7%) y de la relación CD4/CD8 (1.7 ± 0.2 vs 2.1 ± 0.2%), así como aumento de los CD8<sup>+</sup> (35.0 ± 2.2 vs 29.8 ± 2.1%).

Los niños DES mostraron tendencias similares a las observadas en los niños BNI con relación a los BN, disminución de células CD3<sup>+</sup> (49.3 ± 4.1%, p<0.05), CD4<sup>+</sup> (52.2 ± 3.6%), en la relación T4/T8 (1.6 ± 0.2%) y aumento de CD8<sup>+</sup> (37.5 ± 3.0%), sin llegar a ser estas últimas significativas. En el caso de las células NK (CD56<sup>+</sup>) los valores en los tres grupos fueron cercanos: 10.1 ± 2.7% (BN), 8.9 ± 1.5% (BNI) y 9.3 ± 2.4% (DES) Cuadro 14.

La única subpoblación de linfocitos que se vio afectada significativamente por la presencia de la desnutrición e infección fue la de los linfocitos B (CD19<sup>+</sup>). Entre los grupos de estudio, los niños BNI mostraron el promedio más alto (31.3 ± 1.8%, p<0.0001), comparado con los niños BN (23.5 ± 1.4%) y DES (22.3 ± 1.6%). Los números absolutos mostraron la misma tendencia que los porcentajes promedio,

encontrando diferencia significativa solo en los linfocitos B (CD19) de los niños BNI en comparación con los niños DES  $p < 0.005$ .

**Cuadro 14. Porcentajes promedio y números absolutos ( $\times 10^6/L$ , en negrillas) de sub-poblaciones de linfocitos activados de sangre periférica en los grupos de estudio.**

Tipo celular	BN (n=10) Prom $\pm$ E. E.	BNI (n=15) Prom $\pm$ E. E.	DES (n=14) Prom $\pm$ E. E.
CD3 <sup>+</sup>	61.0 $\pm$ 3.7 <b>3263 <math>\pm</math> 319</b>	50.2 $\pm$ 2.5* <b>2541 <math>\pm</math> 297</b>	49.3 $\pm$ 4.1* <b>2518 <math>\pm</math> 507</b>
CD4 <sup>+</sup>	59.5 $\pm$ 2.7 <b>2012 <math>\pm</math> 142</b>	54.5 $\pm$ 2.4 <b>1377 <math>\pm</math> 187</b>	52.2 $\pm$ 3.6 <b>1122 <math>\pm</math> 148</b>
CD8 <sup>+</sup>	29.8 $\pm$ 2.1 <b>1056 <math>\pm</math> 174</b>	35.0 $\pm$ 2.2 <b>1180 <math>\pm</math> 135</b>	37.5 $\pm$ 3.0 <b>1453 <math>\pm</math> 447</b>
CD4/CD8	2.1 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2
CD19 <sup>+</sup>	23.5 $\pm$ 1.4 <b>1360 <math>\pm</math> 188</b>	31.3 $\pm$ 1.8* <b>1658 <math>\pm</math> 177</b>	22.3 $\pm$ 1.6** <b>964 <math>\pm</math> 125**</b>
CD56 <sup>+</sup>	10.1 $\pm$ 2.7 <b>499 <math>\pm</math> 58</b>	8.9 $\pm$ 1.5 <b>494 <math>\pm</math> 98</b>	9.3 $\pm$ 1.8 <b>477 <math>\pm</math> 235</b>

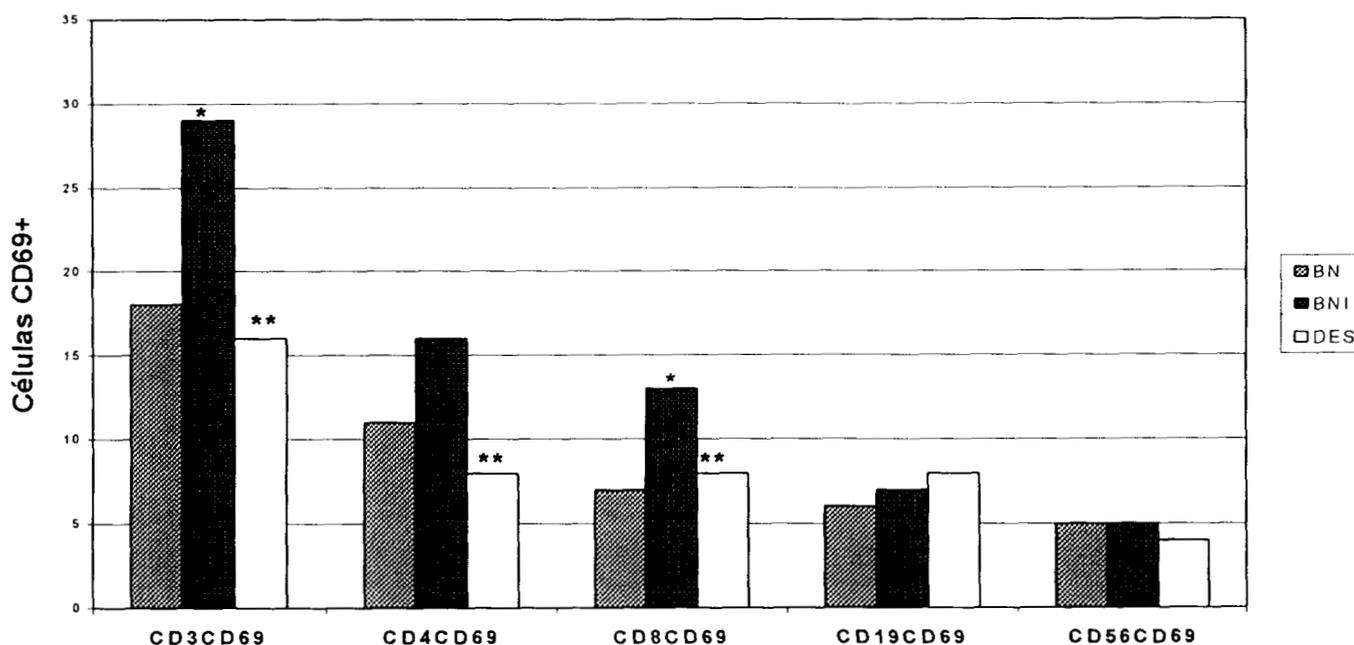
\* Significa diferencias contra el grupo de los BN: CD3<sup>+</sup> de BNI ( $p < 0.03$ ), CD3<sup>+</sup> de DES ( $p < 0.05$ ) y CD19<sup>+</sup> ( $p < 0.0001$ ). \*\* Significa diferencias contra el grupo de los BNI, CD19<sup>+</sup> ( $p < 0.0001$  en el porcentaje promedio y  $p < 0.005$  en números absolutos)

## B. EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO CD69 EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Con respecto a la proporción de células que respondieron a los diferentes mitógenos, y como consecuencia manifestaron el marcador de superficie de activación temprana CD69<sup>+</sup>. En los niños BNI se observó un promedio de células CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> significativamente aumentadas con relación a los niños BN (Figura 15). En las células CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y CD56<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> no se

encontraron diferencias significativas entre niños BN y BNI. Las células de los niños desnutridos no presentaron diferencias significativas en la activación de ninguna de las sub-poblaciones de linfocitos analizados con respecto a los niños BN.

En la comparación de las células activas de los BNI con los niños DES, como se muestra en la Figura 15, las principales diferencias entre estos dos grupos fueron que los niños DES mostraron disminución significativa en las células CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y en las CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, con relación a los niños BNI.



**Figura 15.** \* Diferencia estadística contra los BN: CD3+CD69+ p<0.0006 CD8+CD69+ p<0.003.\*\*Diferencia estadística contra BNI: CD3+CD69 p<0.0006, CD4+CD69+ p<0.007 y CD8+CD69+ p<0.003. BN= bien nutrido BNI= bien nutrido infectado y DES= desnutrido infectado

Los valores de los niños BN, en las células CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> fue de 18.3 ± 2.6% de las cuales 11.1 ± 1.7% correspondieron a células CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y 7.2 ± 1.2% a CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>. En los niños BNI los porcentajes promedio fueron 28.6 ± 2.6, 15.7 ± 2.0 y 13.0 ± 1.1% respectivamente. En los niños DES: 16.0 ± 1.3% para CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (P<0.0006), 7.7 ± 0.7% para las CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (P<0.007) y 8.3 ± 1.0% para CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (P<0.003). En cuanto a linfocitos CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> los niños BN presentaron 6.2 ± 0.8%, los BNI 8.2 ± 0.7% y los DES 8.3 ± 1.2%. Las células NK (CD56<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) tuvieron porcentajes de 5.0 ± 0.6%, 5.0 ± 0.6% y 4.0 ± 0.3% respectivamente.

Los valores individuales de las sub-poblaciones de linfocitos y de los linfocitos activos se presentan en el Anexo 1. Los datos de los niños BN en el Cuadro 8a, el de los BNI en el Cuadro 9a y el de los DES en el Cuadro 10a.

### **SUBPOBLACIÓN DE LINFOCITOS Y EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO CD69 POR TIPO DE INFECCIÓN**

Por tipo de infección en el porcentaje de sub-poblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD56<sup>+</sup> no se encontraron diferencias significativas entre los niños BNI, entre los DES y al comparar los BNI contra los DES. En el porcentaje de células CD3<sup>+</sup> se encontraron diferencias significativas solo entre los niños BNI, entre los niños con infección gastrointestinal (n=3) y los niños con infección mixta (n=7), así como entre los niños con infección respiratoria (55.8 ± 4.0%, p<0.04, n=5) contra los de infección mixta. Los que presentaron porcentajes más altos fueron los niños con infección gastrointestinal (57.3 ± 1.6%, p<0.02) y los de menor porcentaje los niños con infección mixta (44.2 ± 2.5%).

En los linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) aunque no se encontró diferencia estadística entre los niños BNI y los DES, en las infecciones de tipo respiratorio y en las mixtas los niños BNI presentan valores superiores a los que presentan los niños DES: 31.2 ± 0.6 vs

22.6 ± 3.0% para el primer tipo de infección y 34.1 ± 3.0 vs 22.8 ± 3.8% para los segundos.

En relación con la activación entre los niños BNI se encontró relación estadística entre los niños con infección respiratoria (n=5) y los niños con infección mixta (n=7) en las células CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, en estas últimas también hubo diferencias entre los niños con infección gastrointestinal (n=3) y los de infección mixta. Los valores fueron: CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> 28.7 ± 6.0 vs 10.9 ± 1.5%, p<0.03; CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> 11.0 ± 1.0 vs 7.0 ± 0.7% p<0.01, para el primer caso y de 6.3 ± 0.6 vs 11.0 ± 1.0%, p<0.03 para el segundo caso. En los niños DES con infección gastrointestinal (n=6) y los de infección mixta (n=4) mostraron diferencias en la activación de las células CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (18.3 ± 1.9 vs 11.6 ± 1.5%, p<0.05) y en las CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (9.1 ± 1.0 vs 5.5 ± 0.9%, p<0.05); los niños con infección mixta presentaron valores inferiores a los observados en los promedios generales de los niños DES.

Al comparar a los niños BNI contra los DES por tipo de infección se encontraron diferencias significativas en los niños con infección gastrointestinal en las células CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (15.2 ± 1.9 vs 9.1 ± 1.1%, p<0.04); en los niños con infección respiratoria en las células CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (34.5 ± 5.0 vs 16.9 ± 2.5%, p<0.01) y en las células CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (19.0 ± 4.4 vs 7.7 ± 0.7%, p<0.05); en los niños con infección mixta en las células CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (24.4 ± 3.5 vs 11.6 ± 1.5%, p<0.008) y en las CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (13.5 ± 2.7 vs 5.5 ± 0.9%, p<0.02). Los niños BNI presentaron siempre valores superiores al de los niños DES.

### **SUBPOBLACIÓN DE LINFOCITOS Y EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO CD69 POR TIPO Y GRADO DE DESNUTRICIÓN**

Las sub-poblaciones de linfocitos que presentaron diferencias estadísticas con relación al tipo de desnutrición fueron: las células CD3<sup>+</sup> entre los niños con desnutrición de segundo grado (n=4) contra los niños marasmáticos (n=7) y los niños

con kwashiorkor (n=3) contra los niños marasmáticos ( $37.5 \pm 5.5$  vs  $60.1 \pm 4.8\%$ ,  $p < 0.02$  y  $39.9 \pm 4.9$  vs  $60.1 \pm 4.8\%$ ,  $p < 0.03$ , respectivamente) presentando los niños marasmáticos valores muy cercanos a los de los niños BN. En las células NK ( $CD56^+$ ) se encontraron porcentajes aumentados en los niños de segundo grado de desnutrición en relación con los niños marasmáticos ( $21.1 \pm 3.4$  vs  $5.5 \pm 1.0\%$ ,  $p < 0.05$ ).

En cuanto a la activación, los linfocitos que mostraron diferencia significativa entre los niños de segundo grado y los kwashiorkor fueron los  $CD3^+CD69^+$  ( $17.2 \pm 0.9$  vs  $12.5 \pm 0.6\%$ ,  $p < 0.03$ ) y los  $CD8^+CD69^+$  ( $9.6 \pm 1.3$  vs  $4.9 \pm 1.4\%$ ,  $p < 0.03$ ), la mayor disminución de porcentajes se mostró en los niños con desnutrición tipo kwashiorkor.

## DISCUSIÓN

El inmunofenotipo de los linfocitos en sangre periférica ha sido una herramienta importante en el diagnóstico de enfermedades inmunológicas, hematológicas, infecciones por HIV, infecciones oportunistas y en el seguimiento de las intervenciones terapéuticas.

Los porcentajes y los números absolutos de las sub-poblaciones de linfocitos varían durante la niñez, debido al proceso de maduración y de expansión del sistema inmune en los primeros años de la vida (Comans-Bitter y col, 1997), traduciéndose en la habilidad de desarrollar sus funciones que incluyen, distinguir lo propio de lo no propio, de manera que se establecen mecanismos en el sistema inmune periférico para prevenir reacciones autoinmunes potenciales. Además, se desarrollan y se expanden clonas de linfocitos con memoria inmunológica, necesarios para combatir las infecciones (Clerici y col, 1993). Uno de los objetivos del presente estudio fue definir los valores que presentan los niños preescolares sanos en leucocitos, las diferentes sub-poblaciones de linfocitos y dentro de estos las células nativas, de memoria y dobles positivas, así como el funcionamiento de los subtipos de linfocitos a través de su comportamiento *in vitro* ante la presencia de mitógenos. Para ello se requirió definir el comportamiento “normal” en los primeros años de la vida de estas células, y así poder detectar las alteraciones en los valores de las sub-poblaciones o en la respuesta del sistema inmune ante la presencia de un agente extraño en el caso de las infecciones, y ante una alteración fisiológica como la desnutrición.

## **I. INTERVALOS DE REFERENCIA DE LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN NIÑOS PREESCOLARES SANOS.**

El establecer los intervalos de referencia de los linfocitos en sangre periférica se ha considerado que incluye una serie de características intrínsecas del paciente como son: la edad, el sexo, la raza, estados de estrés, el uso de tabaco y medicamentos, estos tres últimos en adultos; también la metodología utilizada para su detección y/o el tipo de anticuerpos y/o citómetro empleado puede variar los datos encontrados en una misma población (McCoy & Overton, 1994). En el presente trabajo se definieron los valores de referencia de linfocitos en sangre periférica en niños preescolares sanos de la ciudad de México para el Laboratorio de Biología Celular y Citometría de flujo de la UAM-I.

### **A. LEUCOCITOS EN PREESCOLARES SANOS.**

En los leucocitos se observó que los linfocitos presentan valores más altos en los dos primeros años y disminuyeron hasta los cuatro años. En el caso de los granulocitos sucede un fenómeno inverso, pues se manifestó un porcentaje menor en los primeros veinticuatro meses de vida para aumentar significativamente después de los dos años de vida, hasta los valores más altos encontrados en los niños de cuatro años. Los monocitos se mantienen con valores cercanos durante los primeros cuatro años para aumentar posteriormente. Con relación al sexo sólo se encontraron diferencias en los granulocitos, siendo las niñas las que presentaron los porcentajes promedios más altos. Algunos autores (Hannet y col, 1992; Denny y col, 1992; Kotylo y col, 1993) no han referido diferencias en relación con la edad y el sexo en leucocitos periféricos en los primeros cinco años de vida. Sólo en el porcentaje de linfocitos, Denny y col (1992) reportan valores más altos en los primeros meses de la vida para posteriormente ir disminuyendo. En un estudio con fetos, neonatos y adultos se encontró que el promedio de los monocitos CD14<sup>+</sup> no

varía al pasar de feto a neonatos pero disminuye de neonatos a adultos; en linfocitos y granulocitos no se encontraron diferencias en estos grupos de estudio (Bikoue y col, 1997).

De acuerdo al laboratorio de la UAM-I, los niños mayores de cuatro años son los que se acercan a los valores de los adultos, dado que un trabajo previo realizado en adultos, se encontró que el porcentaje ( $\pm$  desviación estándar) de leucocitos fue: linfocitos de  $26.6 \pm 4.2\%$  con un intervalo de 20.1 a 39.5%; granulocitos  $61.4 \pm 6.7\%$  con intervalo de 44.4 a 70.7% y monocitos  $5.6 \pm 1.9\%$  con intervalo de 3.0 a 10.9% (Ortiz y col, 1999).

## **B. SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN PREESCOLARES SANOS**

En las sub-poblaciones de linfocitos no se encontraron diferencias estadísticas entre los porcentajes promedio con relación a la edad, en linfocitos NK, así como en los subtipos  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , relación  $CD4/CD8$  y linfocitos T ( $HLA-DR^+$ ). En el caso de los linfocitos T  $CD3^+$  y B ( $CD20^+$ ) se encontraron diferencias significativas entre los niños de 8 a 24 meses y los niños mayores de 2 años; en los linfocitos T  $CD3^+$  los niños más pequeños presentaron promedios menores a los mostrados por los niños con más de 2 años de edad. En los linfocitos B  $CD20^+$  el porcentaje promedio fue a la inversa, los valores más altos lo obtuvieron los niños menores de 2 años para posteriormente disminuir. En los porcentajes de linfocitos T,  $CD4^+$  y  $CD8^+$  Hannet y col (1992) trabajando con una 88 pacientes entre neonatos y ancianos, encuentran aumento de estas sub-poblaciones en los primeros años de edad; así mismo, porcentajes altos de células NK en cordón umbilical, para disminuir en el primer año de vida para ir aumentando hasta alcanzar los niveles de los adultos. En otros reportes (208 pacientes entre 2 a 59 meses de edad) se ha encontrado que la mediana de las células  $CD4^+$  se encuentra aumentada en los primeros meses de la vida con relación a lo observado después de los 24 meses de edad y la mediana de los linfocitos  $CD8^+$  disminuida (Denny y col, 1992). Kotylo y col (1993) con un

estudio de 130 pacientes entre neonatos y niños de tres años, reportan diferencias estadísticas en niños menores de tres años con valores más altos para linfocitos CD4<sup>+</sup> y más bajos para CD8<sup>+</sup>, y a partir de esta edad consideran que los valores de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos son similares a la de los adultos.

En nuestro estudio no se encontraron diferencias entre las sub-poblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> relacionadas con la edad, concordando con los datos reportados por Hannet y col (1992) y Osugi y col (1995) este último con 41 pacientes entre neonatos y adultos de 25 años, indican que no hay diferencias en estas sub-poblaciones durante los primeros años de la vida. Sin embargo, estos mismos autores señalan diferencias en células NK, dato no registrado en este trabajo. Así mismo, se difiere en el contenido de células T CD3<sup>+</sup> y en las B CD 20<sup>+</sup>, dado que ninguno de los autores citados encontró discrepancias en estas células. Probablemente estas diferencias en linfocitos T CD3<sup>+</sup> y B CD20<sup>+</sup> estén relacionadas con la raza dado que los datos antes señalados corresponden a niños caucásicos y asiáticos. Aunque se tendría que aumentar el número de pacientes para verificar estos datos.

En niños mexicanos la madurez de las sub-poblaciones de linfocitos parece comenzar a establecerse después de los 2 años de edad, dado que sus porcentajes de sub-poblaciones se acercan a la de los adultos, de acuerdo a los datos del laboratorio, sobre todo en linfocitos CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y la relación CD4/CD8 (Ortiz y col, 1999; n= 50).

En este estudio no se recabaron muestras de niños menores de 8 meses, se espera que en un futuro logremos obtener muestras sobre todo en recién nacidos dado que en reportes previos se ha señalado diferencias en las sub-poblaciones de linfocitos en recién nacidos y menores de un año.

### C. CÉLULAS NATIVAS, DE MEMORIA Y DOBLES POSITIVAS EN PREESCOLARES SANOS.

En el análisis de las células nativas y de memoria en el total de los linfocitos y dentro de las células CD4<sup>+</sup>, las células nativas disminuyeron y las células de memoria aumentaron con la edad. En las células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> también se observaron diferencias, presentando los niños más pequeños porcentajes inferiores a los mostrados por los niños mayores de tres años. En estudios previos también se han señalado células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> aumentadas y CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> disminuidas en los primeros años de la vida (Pirenne y col, 1992; Nijhuis & Negelkerken 1992; Osugi y col, 1995), esto relacionado estrechamente con la mayor susceptibilidad de los niños menores a contraer enfermedades que niños de mayor edad o adultos; esta susceptibilidad aumentada generalmente se relaciona a la inmadurez del sistema inmune. Para otros autores también el aumento de la fracción de células de memoria está en relación a la exposición a los antígenos en los primeros años de la vida (Hodge y col, 1998), situación que ha sido reproducida y comprobada *in vitro* en diferentes estudios sobre activación y proliferación de linfocitos (Amlot y col, 1996; Johannisson & Festin, 1995).

En el presente trabajo en el total de los linfocitos, en las células dobles positivas no se observaron diferencias de acuerdo a la edad. A estas células se les reconoce como una sub-población intermedia surgida de la estimulación de células T maduras, en el cambio de células nativas a células de memoria; asimismo, se ha encontrado que las células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> son capaces de producir IL-2 e IFN $\gamma$ , (Hamann y col, 1996).

## D. ACTIVACIÓN DE LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN PREESCOLARES SANOS

En esta parte de la investigación se usó una combinación diferente de anticuerpos para cuantificar las diversas sub-poblaciones de linfocitos con respecto al utilizado en la primera parte del trabajo; los resultados obtenidos fueron similares, no se encontraron diferencias en los linfocitos T ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$  y  $CD8^+$ ), relación  $CD4/CD8$  y NK con relación a la edad. Solo en los linfocitos B  $CD19^+$ , se observaron diferencias significativas, presentando los niños menores porcentajes más altos al de los niños mayores de 3 años.

En las células activas ( $CD69^+$ ), en los niños preescolares se observaron diferencias estadísticas con relación a la edad entre los menores y mayores de tres años al ser activadas con PHA, siendo los niños menores de tres años los que presentaron porcentajes más bajos de linfocitos  $CD3^+$  en las células  $CD4^+CD69^+$ ,  $CD8^+CD69^+$  y  $CD3^+CD69^+$ . Estudios previos han señalado la incapacidad de los niños pequeños y sobre todo en recién nacidos para responder a la acción de diferentes antígenos y la producción de citocinas, mostrando que los niños neonatales presentan niveles aceptables de IL-2, pero disminución en los niveles de IFN e IL-4 (Wilson, 1991; Takahashi y col, 1995). Algunos estudios señalan que sobre todo después de los tres años los niños tienen respuestas de activación parecidas a la de los adultos (Clerici y col, 1993); sin embargo, algunos autores difieren y consideran que no hay diferencias en la activación con PHA entre neonatos y adultos. Se ha observado que la estimulación *in vitro* puede ser distinta dependiendo del tipo de mitógeno utilizado y aun más, que la estimulación de las células ante la presencia de un antígeno *in vivo* también puede desencadenar diferentes respuestas (Trivedi y col, 1997).

## **II. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO (BNI Y DES) CON LOS VALORES DE REFERENCIA OBTENIDOS DE LOS NIÑOS PREESCOLARES SANOS EN LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS.**

Los niños desnutridos tienen una mayor susceptibilidad para padecer infecciones por lo que han sido considerados como inmunodeficientes. Para corroborar algunas de estas deficiencias, se analizó un grupo de niños DES con relación a un grupo de niños BNI, y de un grupo de BN como grupo control. La propuesta es que las comparaciones entre los niños BN con los BNI nos indican los cambios asociados directamente con el proceso infeccioso; las diferencias entre los niños BNI y los DES reflejan las modificaciones que son influenciadas por el estado nutricional (dado que los niños desnutridos presentan invariablemente infecciones asociadas), que pueden reflejarse tanto en la proporción de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos, y/o en las células nativas, de memoria y dobles positivas, así como en las posibles diferencias en su capacidad de respuesta a los mitógenos.

### **A. SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

El estudio de las sub-poblaciones de linfocitos se realizó mediante dos tipos diferentes de anticuerpos y por consiguiente dos metodologías, sin embargo los resultados fueron similares. Se observó que el porcentaje promedio de las células  $CD3^+$   $CD4^+$  y  $CD8^+$  disminuyó significativamente en los BNI en comparación con los BN. En el caso de las sub-poblaciones que fueron activadas, estas diferencias no fueron significativas, a excepción de los linfocitos  $CD3^+$ . Al comparar los porcentajes de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos  $CD3^+$  de los niños DES con los BN, se observó la misma tendencia que presentaron los BNI. Al analizar los grupos de acuerdo al tipo de infección solo se observaron diferencias en el porcentaje de linfocitos T( $CD3^+$ ) activados en el grupo de niños BNI, entre aquellos con infección mixta y los que presentaron infección respiratoria y gastrointestinal.

Algunos autores han reportado una disminución en el número de las células T periféricas en niños DES, con una disminución específica en células CD4<sup>+</sup> y un aumento en células CD8<sup>+</sup> en comparación con niños eutróficos (Bhaskaram, 1992; Parent y col, 1994). Resultados similares han sido obtenidos por Betancourt y col (1995a), quienes al analizar el porcentaje de las sub-poblaciones de linfocitos encontraron en algunos niños DES, una disminución en la concentración de células T: CD11<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> y, en otros niños observaron un incremento en los porcentajes de linfocitos CD8<sup>+</sup>. Sin embargo los datos aquí obtenidos no muestran diferencias entre las sub-poblaciones de linfocitos TCD3<sup>+</sup> entre el grupo de los niños BNI y los DES, estos datos indican que las diferencias observadas por lo tanto están asociadas en este caso con una respuesta a la infección y no necesariamente a la desnutrición.

Los linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) tuvieron un incremento importante en los niños BNI en comparación con los porcentajes observados en los niños BN. En contraste los niños DES no incrementaron sus células CD19<sup>+</sup> y CD20<sup>+</sup> sino que incluso mostraron una ligera disminución en sus porcentajes con relación a los niños BN y una disminución significativa en relación con los niños BNI. Adicionalmente, se observó al realizar la comparación por tipo de infección entre los niños BNI y los DES, que los niños DES presentaron porcentajes más bajos en infección respiratoria y mixta a los mostrados por los niños BNI. Los linfocitos B son células efectoras (productoras de anticuerpos), así como células presentadoras del antígeno (CPA) ante los linfocitos CD4<sup>+</sup> (ayudadores) en la inmunidad específica, por lo tanto son esenciales para la eliminación de los agentes patógenos (Croix y col, 1996). Los niños BNI mostraron una importante movilización de estas células en sangre periférica ante la presencia de la infección, situación no exhibida por los niños DES.

Varios investigadores han reportado que el porcentaje de linfocitos B en niños desnutridos es semejante a la de los niños sanos (Raffi y col, 1977; Stiehm, 1980; Chandra, 1991; Bhaskaram 1992). Esta tendencia ha sido confirmada en los

resultados citados en el presente trabajo. Sin embargo, Rikimaru y col (1998) reportan proporción de células B significativamente disminuidas en niños con desnutrición severa en relación con niños sanos. En esta investigación, se detectaron porcentajes significativamente bajos de linfocitos B en los DES en comparación a BNI. Los niños BNI mostraron que ante la presencia de una infección se eleva la cantidad de los linfocitos B (CD19<sup>+</sup> y CD20<sup>+</sup>), probablemente como una respuesta efectora a la infección. Los niños DES mostraron una incapacidad de respuesta para incrementar los niveles de linfocitos B en sangre periférica, ante la presencia de infección; esto puede relacionarse principalmente con una alteración de la respuesta inmune humoral; lo que más ha sido señalado por diferentes autores es la disminución de la IgA secretora, en las secreciones nasofaríngeas y gastrointestinales (Reddy y col, 1976; Chandra, 1991).

En contraste, los porcentajes de las células NK (CD56<sup>+</sup>) mostraron valores similares en los diferentes grupos. Esto puede estar relacionado con la presencia de infecciones de tipo bacteriano y los linfocitos NK son de mayor relevancia en infecciones vírales; aunque es conocida su acción en citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

Al analizar los datos de las sub-poblaciones de linfocitos por tipo y grado de desnutrición, se observaron diferencias sólo en los linfocitos CD3<sup>+</sup> de las células que fueron activadas. Los niños marasmáticos presentaron porcentajes mayores a los presentados por los niños con desnutrición de segundo grado y tipo Kwashiorkor; presentando los marasmáticos valores cercanos a los mostrados por los BN y en este caso la tendencia exhibida por los BNI es de disminuir los porcentajes. Las diferencias en el porcentaje de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) entre los niños con desnutrición de segundo grado y los de tercer grado tipo marasmo y kwashiorkor son consideradas como un aspecto importante, porque permitirían indagar las diferencias por tipo y grado de desnutrición que se presentan en el sistema inmune;

por lo que sería de interés el análisis de un mayor número de pacientes desnutridos sobre todo de tipo kwashiorkor.

Se podría inferir que en la respuesta fisiológica normal ante la presencia de infección en un niño bien nutrido, los linfocitos CD4<sup>+</sup> (ayudadores) al nivel de la circulación periférica tienden a disminuir, probablemente por un secuestro en los tejidos linfoides donde se llevan a cabo los mecanismos de inmunidad específica: la fase de reconocimiento y la fase de activación (Reinisch & Litman, 1989); por otro lado, las células CD8<sup>+</sup> (citotóxicas) tienden a incrementarse aunque no significativamente. Los linfocitos B (productores de anticuerpos) encargados de la fase efectora de la inmunidad, presentan un claro incremento. Para el caso de los linfocitos CD8<sup>+</sup> se debería de buscar un mayor número de muestras de BNI para definir si finalmente esos cambios pueden ser significativos o aleatorios.

Sin embargo, el proceso de inmunidad específica es mucho más complejo ya que en él también intervienen una gran cantidad de citocinas producidas por estas células. Así mismo, las características propias del antígeno pueden desencadenar diferentes mecanismos efectores (acción de macrófagos, anticuerpos específicos, células citotóxicas, entre otras). De todos modos, en este punto los resultados del estudio solo permiten establecer la capacidad de movilización de las células del sistema inmune, a través del organismo, para llegar a los lugares donde podrían ser requeridos. Parece ser que este funcionamiento en los linfocitos T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, no está afectado en los niños desnutridos dado que presentan las mismas tendencias que los niños BNI. Por otro lado, en los linfocitos B CD19<sup>+</sup> y CD20<sup>+</sup> se muestra una notable alteración en el porcentaje y los números absolutos de sangre periférica. Basándose en esto se podría considerar que las alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos T CD3<sup>+</sup> se apegan más a una respuesta vinculada con la presencia de la infección que a la desnutrición, en cambio las alteraciones en los

ocitos B es una clara alteración provocada por la desnutrición, que puede estar relacionado con alteraciones en la respuesta humoral.

Otros autores han reportado datos similares con relación a procesos infecciosos. En pacientes con amibiasis se ha señalado aumento de linfocitos CD8<sup>+</sup> y disminución de linfocitos T totales (Ganguly y col, 1981; Ortiz-Ortiz y col, 1990); resultados similares se reportan en niños pequeños con diarrea infecciosa prolongada (Molbak y col, 1996). En pacientes con infecciones por hongos se reporta disminución de linfocitos CD4<sup>+</sup> (Bova y col, 1991). En otros casos se reportan tendencias diferentes ante la presencia de infecciones como en la meningitis, donde se habla de un aumento de los linfocitos CD4<sup>+</sup>, mientras que en las infecciones por estafilococos disminuyen los linfocitos CD11<sup>+</sup> y los CD8<sup>+</sup> (Bamborschke y col, 1991).

## **B. CÉLULAS NATIVAS, DE MEMORIA Y DOBLES POSITIVAS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

Se detectó la expresión de isoformas CD45 en linfocitos totales y linfocitos T CD4<sup>+</sup>, en células sin activar. Al nivel de linfocitos totales de acuerdo a las diferentes isoformas no se encontraron diferencias entre los niños BN y los otros dos grupos de niños infectados; de igual manera entre los grupos de niños infectados (BNI y DES) no se encontraron diferencias estadísticas en los porcentajes de linfocitos CD45RA<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> y de CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>. Sin embargo al analizar las sub-poblaciones de las células T CD4<sup>+</sup>, se encontró en primer lugar que en los niños BNI al nivel de sangre periférica disminuye el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, aumentan las células CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> y las células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> no sufren cambio, lo que se podría traducir como una secuencia esperada al transformarse de células CD45RA<sup>+</sup> (nativas) a células CD45RO<sup>+</sup> (de memoria) después de una exposición a un antígeno, como ha sido descrito en experimentos *in vitro*, en los que además se han incluido la detección de marcadores de superficie de activación, que verifican la

activación en fases tardías y proliferación de los linfocitos (Johannisson & Festin, 1995; Amlot y col, 1996).

Al comparar los niños DES con los niños BNI solo se encontraron diferencias significativas en las células  $CD4^+CD45RA^+/CD45RO^+$ , mostrando los primeros, porcentajes más altos. En los BNI contra los DES, las diferencias que se observaron están relacionadas con la incapacidad de los linfocitos de los DES, ante el estímulo de un antígeno de lograr el cambio de estas isoformas  $CD4CD45RA/CD45RO$  a  $CD4CD45RO$  lo que se percibe por el aumento de células dobles positivas y la disminución de células de memoria, comparado con la respuesta observada en los niños BNI. Los resultados obtenidos en este estudio parecen indicar que la fracción de células dobles positivas se acumula en sangre periférica al no lograr el cambio para pasar a células de memoria como se observa en los niños BNI, los cuales logran aparentemente una fácil transición de diferenciación de las células  $CD4^+$ .

Se sabe que las células dobles positivas son una población intermedia y transitoria. En la activación celular *in vitro*, aumenta su proporción a las 48 horas de cultivo y a las 72 horas pierden la isoforma  $CD45RA$  (Johannisson & Festin, 1995, Osugi, y col 1995). Sin embargo, las células  $CD4^+CD45RA^+/CD45RO^+$  se han mantenido en cultivos prolongados (14 días) sin presentar el cambio para transformarse en células  $CD45RO^+$  en ausencia de estimulación del receptor de las células T. Estas células mantienen estable la expresión de ambas isoformas  $CD45RA$  y  $CD45RO$ , pero una pequeña fracción puede reexpresar la isoforma  $CD45RA$  y una fracción de células  $CD45RO^+$  puede a su vez ganar el fenotipo de células dobles positivas en la ausencia de la transmisión de señales en el receptor de las células T (Hamann y col, 1996; Arlettaz y col, 1999). Por otro lado, las células dobles positivas tienen capacidad de proveer actividad ayudadora a los linfocitos B y contener células precursoras específicas del antígeno, aunque el número de inmunoglobulinas secretadas por los linfocitos B alcanza sólo la mitad de los niveles

presentados por las células CD45RO<sup>+</sup> (Hamann y col, 1996).

En la literatura no se encuentran estudios sobre células de memoria y dobles positivas en niños DES; sin embargo, en ratones desnutridos se han mostrado cambios en la relación de células nativas a células de memoria con aumentos de células nativas de linfocitos T en bazo (Woodward y col, 1995), así como, en nódulos linfáticos mesentéricos y en sangre periférica (Woodward y col, 1999). Los mismos resultados se han observado en ancianos severamente desnutridos, aumento de células nativas (CD45RA<sup>+</sup>) y una paralela disminución en células T de memoria (CD45RO<sup>+</sup>) en sangre periférica, comparados con ancianos sanos (Lesourd & Mazari, 1997). En nuestro estudio no encontramos diferencias en las isoformas CD45RA de linfocitos totales, aunque en las células CD45RO<sup>+</sup> sí se observó una disminución no significativa.

En otras enfermedades por inmunodeficiencias se ha demostrado que la fracción de células CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> son bajas en comparación con individuos sanos (Crockard y col, 1992) o presentan porcentajes altos de células CD4<sup>+</sup> dobles positivas (Kretowski y col, 1999). Además se ha estudiado el papel de estas isoformas en la evolución del trasplante de medula ósea, donde observaron que los porcentajes de células CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> se mantienen altos durante cinco años de seguimiento (de Vrie y col, 2000).

Se han realizado también estudios sobre células de memoria y dobles positivas en diferentes enfermedades infecciosas y han sido de gran ayuda en su pronóstico, como en infecciones por HIV (Benito y col, 1997; Ullum y col, 1997); su análisis sin activación ha sido una importante prueba que puede usarse en el seguimiento y detección de infecciones en recién nacidos (Bruning y col, 1997; Hodge y col, 1998).

Los datos obtenidos en esta parte del trabajo indican que el análisis de la

expresión de las células CD45RO<sup>+</sup> y de las CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son una importante prueba de inmunosupresión en la desnutrición. Permitiendo entender algunas de las alteraciones que presentan estos pacientes, que podrían estar directamente vinculadas con la presencia de infecciones.

### **III. ACTIVACIÓN DE LAS SUB-POBLACIONES DE LINFOCITOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

Los cambios observados en la activación entre los niños BNI y los niños BN fueron un incremento significativo en el porcentaje de células CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y un ligero incremento de las células CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>. Se consideran como una respuesta normal de los niños BN ante la presencia de un estímulo, en este caso representado por la presencia de una infección bacteriana.

Al comparar los datos de los niños DES con los de los niños BN el único subgrupo celular que se aprecia disminuido son los linfocitos CD4<sup>+</sup> activos. Esto refleja la importancia de comparar los datos de estos niños DES con los BNI, ya que en estos últimos se muestra la forma en que las proporciones de las diferentes subpoblaciones se modifican ante el establecimiento de una infección.

Así, los linfocitos de un niño infectado al ser nuevamente expuestos a un estímulo mitogénico tienen la capacidad de iniciar e incrementar un proceso de activación de sus células para hacer frente a la nueva "agresión" y poder desencadenar los mecanismos efectores necesarios para su eliminación. En el caso de los niños DES se observó una incapacidad de respuesta de sus linfocitos al estímulo para iniciar un proceso de activación que conlleva a la maduración, división celular y diferenciación. La disminución en el porcentaje de las células CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, observadas en los niños DES (que se encuentran infectados) con

relación a los niños BNI se consideran alteraciones trascendentales, directamente involucradas en que los niños DES sean inmunodeficientes.

En relación con lo encontrado entre los BNI y DES por tipo de infección, se refuerza la idea de que la deficiencia de la activación/funcionalidad de las sub-poblaciones de linfocitos T ( $CD3^+CD69^-$ ,  $CD4^+CD69^+$  y  $CD8^+CD69^+$ ) se debe a la presencia de la desnutrición. En el caso de la activación de las sub-poblaciones de linfocitos T  $CD3^+$  de acuerdo al tipo y grado de desnutrición, los niños con kwashiorkor mostraron los datos más bajos en las células  $CD3^+CD69^+$  y las  $CD8^+CD69^+$ . Esto se podría interpretar como un mayor daño en la activación/funcionalidad en los niños con kwashiorkor que en los niños marasmáticos. Sin embargo, este dato es importante y se propone ampliar los grupos por tipo de desnutrición para identificar con más precisión estas diferencias y también en los tipos de infección.

El CD69 es un marcador de superficie que aparece seguido de la estimulación del receptor TCR/CD3 en los linfocitos T; del estímulo de las inmunoglobulinas de superficies en los linfocitos B y por el estímulo de la interleucina 2 (IL-2) o el INF en los linfocitos NK; el marcador es de corta duración, desaparece después de las 24 horas de la estimulación (Testi y col, 1994). La eficacia del CD69 ha sido demostrada por algunos autores, Afeltra y col (1997) estudiaron la combinación de este antígeno de activación temprana (CD69) con el antígeno de activación tardía (HLA-DR) encontrando la coexpresión de ambos en los linfocitos del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y otros tipos de sinovitis. Los trabajos de Johannisson & Festin (1995) confirman la transición de las células nativas ( $CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$ ) a células de memoria ( $CD4^+CD45RA^-CD45RO^+$ ), en activación *in vitro*, y en relación con la expresión de antígenos de activación temprana (CD69), media (CD25) y tardía (CD71), encontrando porcentajes muy similares de estos tres antígenos a través de la transformación de las células. Los

trabajos que se han realizado con pacientes VIH positivos (Krowka y col 1996; Prince & Lape-Nixon, 1997), muestran al CD69 como un marcador importante. Sin embargo, ya que solo sirve como un indicador del inicio de la activación, sería conveniente realizar estudios adicionales que permitan establecer, si las células CD69<sup>+</sup> son capaces de diferenciarse y proliferar adecuadamente en niños desnutridos.

La disminución de la respuesta de las células T de niños desnutridos a mitógenos ya ha sido señalada por otros autores (Touraine & Gay 1981; Chandra 1991; Chowdhury y col, 1993; Hughes, 1998), lo cual concuerda con los hallazgos aquí presentados. La contribución del presente estudio, en comparación con los trabajos mencionados radica en los siguientes aspectos estudiados: el análisis de los niños desnutridos con niños bien nutridos que tienen infecciones similares, la comparación por tipo de infección y por el tipo y grado de desnutrición. Adicionalmente, se tiene la ventaja del uso de una metodología muy sensible como es la citometría de flujo, que permite el análisis de miles de células de cada muestra y la detección simultánea de las sub-poblaciones de los linfocitos T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) y su capacidad de activación temprana (CD69).

Las posibles causas que impiden a los linfocitos de los niños DES entrar en una eficaz activación y que también pueden estar relacionadas con la incapacidad de las células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> a transformarse en células CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> pueden ser interpretadas de diferentes maneras: uno, alteraciones en el proceso de activación de los linfocitos T a nivel del receptor TCRCD3 y/o de las moléculas accesorias; dos, como la falta de nutrientes que imposibilite la síntesis de nuevas proteínas, que permitan crear las moléculas de superficie que actúan como receptores de las señales bioquímicas para desencadenar la diferenciación de las células y una tercera posibilidad es la combinación de ambas. Aunque también se

ha señalado la alteración en la producción de citocinas las cuales median y regulan la activación y proliferación de los linfocitos (Chandra 1991).

Sin embargo, lo que sí está bien determinado es que la transición de células dobles positivas a células de memoria está mediado por una eficaz transmisión de señales del receptor TCR/CD3 de los linfocitos T, lo cual inicia el proceso de activación y si este receptor no es lo suficientemente estimulado puede alterar los mecanismos de diferenciación de las células: desencadenamiento de procesos metabólicos para la síntesis de nuevos receptores de superficie, producción de citocinas y de otras proteínas relacionadas con la diferenciación y la proliferación celular (Hamann y col, 1996; Arlettaz y col, 1999).

## CONCLUSIONES

### I. EN EL GRUPO TESTIGO (NIÑOS BIEN NUTRIDOS)

Se determinaron los valores de referencia de leucocitos, linfocitos T, B, NK, células nativas y de memoria para niños preescolares de la Ciudad de México del Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la UAM-I.

Se encontró que a nivel de leucocitos (linfocitos, granulocitos y monocitos) los niños a la edad de 4 años alcanzan su madurez, dado que son los valores cercanos a los de los adultos. En los niños mexicanos se observaron diferencias relacionadas con el sexo sólo en los granulocitos.

En las sub-poblaciones de linfocitos sólo se observaron diferencias de acuerdo a la edad en los porcentajes de los linfocitos T ( $CD3^+$ ) y en los B ( $CD19^+$  y  $CD20^+$ ), estas variaciones pueden estar relacionadas con la raza, dado que no han sido señaladas en caucásicos, ni en asiáticos. Asimismo, se consideró que el grupo control de estudio alcanzó la madurez y la expansión de sus sub-poblaciones de linfocitos a la edad de dos años, en este momento sus porcentajes promedio se acercan a los porcentajes de los adultos obtenidos en nuestro laboratorio.

En las células nativas y de memoria a nivel del total de linfocitos y dentro de las células  $CD4^+$  mostraron diferencias de acuerdo a la edad, conforme los niños se desarrollan las células nativas disminuyen y las células de memoria aumentan. Además se encontraron diferencias vinculadas a la edad en las células  $CD4^+CD45RA^+/CD45RO^+$  (dobles positivas), considerando este dato como una probable relación con la raza dado que tampoco ha sido señalado para caucásicos y asiáticos.

En la activación de las sub-poblaciones de linfocitos T  $CD3^+$  se observaron claras

diferencias en la capacidad de respuesta ante la presencia de PHA entre niños menores y mayores de tres años. Los niños menores de tres años presentaron una menor proporción de células activas. Los bajos niveles de activación aunado a los hallazgos en las células de memoria, confirmarían que los niños menores de tres años presentan rasgos de inmadurez de su sistema inmune.

## **II. EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

### **A. NIÑOS BIEN NUTRIDOS INFECTADOS**

En los niños bien nutridos infectados (BNI), ante la presencia de infección, en sangre periférica tienden a disminuir las células  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  y aumentar las células  $CD19^+$  y/o  $CD20^+$ . La disminución de los linfocitos T y el incremento de los linfocitos B son hallazgos significativos en las sub-poblaciones de linfocitos de los niños con infección.

Los niños bien nutridos infectados presentaron en las células  $CD4^+CD45RO^+$  (memoria) un aumento y una disminución de las células  $CD4^+CD45RA^+$  (nativas) que indican un buen funcionamiento (cambio) de la capacidad de los linfocitos T  $CD4^+$  para diferenciarse de células nativas a células de memoria.

En el caso de la activación se observó un aumento significativo de respuesta a los mitógenos en los linfocitos T  $CD3^+CD69^+$  y en los  $CD8^+CD69^+$  en los niños bien nutridos e infectados.

### **B. NIÑOS DESNUTRIDOS INFECTADOS**

En los niños desnutridos ante la presencia de infecciones sus sub-poblaciones de linfocitos T  $CD3^+$  presentan las mismas tendencias que los niños bien nutridos con infección. Sólo en los linfocitos B ( $CD19^+$  y/o  $CD20^+$ ) muestran una marcada disminución en comparación a los niños bien nutridos infectados, este es un hallazgo importante.

Los niños desnutridos infectados mostraron una disminución significativa en las células CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (memoria), con aumento de la fracción de células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> (dobles positivas) lo que indica alteraciones en la diferenciación (cambio) de estas células.

Además se encontró una importante disminución en la activación/funcionalidad de las sub-poblaciones de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), en los niños con desnutrición ante la incubación con mitógenos.

Las alteraciones en linfocitos B (CD19<sup>+</sup> y/o CD20<sup>+</sup>), las células de memoria, las dobles positivas y en la activación se presentaron tanto en niños con desnutrición de segundo como de tercer grado, estos son importantes hallazgos que pueden contribuir a entender la causa de la inmunodepresión observada en los niños desnutridos.

En los niños con desnutrición tipo kwashiorkor, las modificaciones más evidentes se mostraron en los linfocitos CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, en cambio los niños con segundo grado de desnutrición presentaron mayor dificultad en el cambio de células CD4<sup>+</sup> de nativas a células de memoria al presentar el porcentaje más alto células CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> /CD45RO<sup>+</sup>. Se requiere realizar estudios adicionales con un mayor número de pacientes desnutridos para corroborar estas tendencias.

Se considera que las pruebas de activación temprana (CD69) de linfocitos y el análisis de los isotipos CD45RO (memoria) y CD45RA/CD45RO (dobles positivas) en los linfocitos CD4<sup>+</sup>, mostraron ser una importante prueba de inmunodepresión.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología Celular y Molecular*. Interamericana McGRAW-Hill, Tercera Edición, México 1999; 4-14.
- Afeltra A, Galeazzi M, Sebastiani GD, Ferri GM, Caccavo D, Addessi MA, Marcolongo R, Bonomo L. Coexpression of CD69 and HLADR activation markers on synovial fluid T lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis: a three-colour cytometric analysis. *Int J Exp Path* 1997; **78**: 331-336.
- Amlot PL, Tahami F, Chinn D, Rawlings E. Activation antigen expression on human T cells. I. Analysis by two-colour flow cytometry of umbilical cord blood, adult blood and lymphoid tissue. *Clin Exp Immunol* 1996; **105**: 176-182
- Anderson R, Smit MJ, Joone GK, van Staden AM. Vitamin C and cellular immune functions. In: Bendich A, Chandra RK, eds. *Micronutrients and immune functions*. *Ann N Y Acad Sci* 1990: 34-48.
- Arlettaz L, Barbey C, Dumont-Girard F, Helg C, Chapuis B, Roux E, Roosnek E. Cd45 isoform phenotypes of human T cells: CD4 (+) CD45RA (-) RO (+) memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45RO. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 3987-3994.
- Arrieta R, Cravioto J. *Desnutrición Calórico-Proteínica en el Niño*. Nueva Guía para el Diagnóstico y Tratamiento del Paciente Pediátrico. (Romeo S. Rodríguez), 1977; **14**: 149-182.
- Arrieta R, Cravioto J. *Clínica de la Desnutrición Proteínico-Calórica de la Infancia*. Manuscrito proporcionado por los autores. 1982.

Ávila CA, Chávez VA, Shamah LT, Madrigal FH. La desnutrición infantil en el medio rural mexicano: análisis de las encuestas nacionales de alimentación. *Sal Pub Mex* 1993; **35**: 658-666.

Ávila CA, Shamah LT, Galindo GC, Rodríguez HG, Barragán HLM. La desnutrición infantil en el medio rural mexicano. *Sal Pub Mex* 1998; **40**: 150-160.

Bamborschke S, Wullen T, Beil C. Quantitation of lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid and blood during the clinical course of aseptic and bacterial meningitis. *Eur Neurol* 1991; **30**: 291-295.

BECTON DICKINSON. *s/f*. Introduction to flow cytometry, a learning guide. San Jose, California. USA.

BECTON DICKINSON. *s/f*. Manual del Citómetro. Section 5, Lysys II. San Jose, California. USA.

Benito JM, Zabay JM, Gil J, Bermejo M, Escudero A, Sánchez E, Fernández-Cruz. Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR and CD25 antigens. *J AIDS Hum Retrovirol* 1997; **14**: 128-135.

Betancourt M, González C, Ortiz R, Zumano E, Siller N, Espinoza M, Romero R. Peripheral Lymphocyte Subpopulation in Children with Severe Malnutrition. *Med Sci Res* 1995a; **23**: 405-406.

Betancourt M, Ortiz R, González C, Pérez P, Cortés L, Rodríguez L, Villaseñor L. Assessment of DNA Damage in Leukocytes from Infected and Malnourished

Children by Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay. *Mutat Res*, 1995b; **331**: 65-77.

Bhaskaram P. Nutritional modulation of immunity to infection. *Indian J Pathol Microbiol* 1992; **35**: 392-400.

Bikoue A, D'Ercole C, George F, Dameche L, Mutin M, Sampol J. Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression an human fetal and cord blood: normal values and changes during development. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; **84**: 56-64.

Bova AJ, Mistschenko AS, Palacios MF, Estévez ME, Tirabochi NY, Sen L, Negroni R, Diez RA. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis. *Micr Immunol* 1991; **35**: 167-174.

Bruning A, Daiminger A, Enders G. Diagnostic value of CD45RO expression on circulating T lymphocytes of fetuses and newborn infants with pre, peri or early post-natal infections. *Clin Exp Immunol* 1997; **107**: 306-311.

Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez-Lizaur AB Arroyo P. *Nutriología Médica*. Ed. Panamericana. Buenos Aires 1995: 152-165.

Chandra RK. Serum complement and immunoconglutinin in malnutrition. *Arch Dis Child* 1975; **50**: 225-229.

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

Chandra RK. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr* 1991; **53**: 129-132.

- Chandra RK. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proc Nutr Soc* 1999; **58**: 681-683.
- Chávez A, Martínez C, Martínez H. El impacto de la desnutrición en el desarrollo individual y colectivo. *Nutrición y Comunidad INNSZ* 1990: 1-9.
- Chevalier P, Sevilla R, Zalles L, Sejas E, Belmonte G, Parent G, Jambon B. Immunonutritional recovery of children with severe malnutrition. *Santé* 1996; **6**: 201-208.
- Chowdhury FA, Miah RA, Begum M, Rahman M. The Transformation in vitro of Peripheral Lymphocytes of Malnourished Children. *Bangladesh-Med-Res-Counc-Bull* 1993; **19**: 67-70.
- Clerici M, DePalma L, Roilides E, Baker R, Shearer GM. Analysis of T helper and antigen-presenting cell functions in cord blood and peripheral blood leukocytes from healthy children of different ages. *J Clin Invest* 1993; **91**: 2829-2836.
- Comans-Bitter W, de Groot R, van den Beemd, Neijens HJ, Hop WCJ, Groeneveld K, Hooijkaas H, van Dongen JJM. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. *J Pediatric* 1997; **130**: 388-393.
- Cravioto J, Arrieta R. Stimulation and mental development of malnourished infants. *Lancet* 1979; **2**: 899-994.
- Cravioto J. Nutrition, stimulation, mental development and learning. *Nutrition Today* 1981: 4-15.
- Cravioto J, Arrieta R. Malnutrition, infant stimulation and mental development. *Children Today* 1981: 35-38.

Cravioto J, Cravioto P. Some long-term psychobiology consequences of malnutrition. *Ann Nestle* 1990; **48**: 93-102.

Cravioto MJ, Ortega ER, Arrieta MR. Desnutrición en la infancia Cap. XXV en *La nutrición y la salud de las madres y niños mexicanos*. SSA, México. Fondo de Cultura Económica 1990; 251-256.

Crockard AD, Boyd NAM, McNEILL TA, McCLUSKEY DR. CD4 lymphocyte subset abnormalities associated with impaired delayed cutaneous hypersensitivity reactions in patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 1992; **88**: 29-34.

Croix DA, Ahearn JM, Rosengard AM, Han S, Kelsoe G, Ma M, Carrol MC. Antibody response to a T-dependent antigen requires B cell expression of complement receptors. *J Exp Med* 1996; **183**: 1857-1864.

Denny T, Yogev R, Gelman R, Skuza C, Oleske J, Chadwick E, Cheng SCH, Connor E. Lymphocyte subsets in healthy children during the first 5 years of life. *JAMA* 1992; **267**: 1484-1488.

de Vries E, van Tol MJ, van de Bergh RE, Waaijer JL, ten Dam MM, Hermans J, Vossen JM. Reconstitution of lymphocytes subpopulations after paediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; **25**: 267-275.

Faulk WP, Pinto PR, Mariago C, Verrier-Jones J. The Immunological System in Health and Malnutrition. *Proc Nutr Soc* 1976; **35**: 253-268.

Feldmand EB. *Principios de Nutrición Clínica*. Ed. El Manual Moderno. México, D. F. 1990; 345-360.

Ganguly NK, Mahajan RC, Gill NJ, Koshy A. Kinetics of lymphocyte subpopulations and their functions in cases of amoebic liver abscess. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1981; **75**: 807-810.

Golden MHN, Waterlow JC, Picou D. Protein turnover synthesis and breakdown before and after recovery from protein energy malnutrition. *Clin Scien* 1977; **53**: 473-477.

Golden MHN, Golden BE. Trace elements potential importance in human nutrition with particular reference to zinc and vanadium. *Brit Med Bull* 1981; **37**: 32-36.

Golden M. The effects of malnutrition in the metabolism of children. *Transact Roy Soc Trop Med Hygi* 1988; **82**: 3-6.

Gómez F. Desnutrición. *Bol Med Hosp Inf Mex* 1946; **3**: 543-551.

Gómez F, Ramos-Galván R, Cravioto J, Frenk S. Prevention and treatment of chronic severe infantile malnutrition (Kwashiorkor). *Ann N Y Acad Sci* 1958; **69**: 969-988.

Games EJ, Palacios TJL. Introducción a la Pediatría. Mendez Editores 1995: 557-558.

González C, Villaseñor L, Betancourt M. Cinética de Proliferación Celular de Linfocitos de Niños Desnutridos. *Rev Invest Clin* 1990; **42**: 18-22.

González TMC. Subpoblación de Linfocitos Circulantes en Niños Severamente Desnutridos. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias. UNAM 1993.

- Gorodezky C, Betancourt M, Salazar-Mallén M, Amezcua ME, Cravioto J. Blast Transformation in Mexican Malnourished Children. *Rev Lat-amer Microbiol* 1986; **28**: 217-220.
- Hamann D, Baars PA, Hooibrink B and van Lier RAW. Heterogeneity of the human CD4<sup>+</sup> T-cell population: two distinct CD4<sup>+</sup> T-cell subsets characterized by coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms. *Blood* 1996; **88**: 3513-3521.
- Hannet I, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Deneys V, DeBruyère M. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunology Today* 1992; **13**: 215-218.
- Hodge S, Hodge R, Flower R, Han P. Surface activation markers of T lymphocytes: role in the detection of infection in neonates. *Clin Exp Immunol* 1998; **113**: 33-38.
- Hughes DA. The influence of the diet on the maturation of the immune system. *Allergy* 1998; **55**: 26-28.
- James WPT. Sugar absorption and intestinal motility in children when malnourished and after treatment. *Clin Sci* 1970; **39**: 305-318.
- Johannisson A, Festin R. Phenotype transition of CD4<sup>+</sup> T cells from CD45RA to CD45RO is accompanied by cell activation and proliferation. *Cytometry* 1995; **19**: 343-352.
- Kotylo PK, Fineberg NS, Freeman KS, Redmond NL, Charland C. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. *Am J Clin Pathol* 1993; **100**: 111-115.
- Kretowski A, Mysliwiec J, Turowski D, Wysocka J, Kinalska I. Analysis of recently activated, memory and naive lymphocyte T subsets in the peripheral blood of

patients with Graves'disease and insulin-dependent diabetes mellitus. *Med Bialymst* 1999; **44**: 226-234.

Krowka JF, Cuevas B, Maron DC, Steimer KS, Ascher MS, Sheppard HW. Expression of CD69 after in vitro stimulation: a rapid method for quantitating impaired lymphocyte responses in HIV-infected individuals. *J. AIDS and Human Retrovirology* 1996; **11**: 95-104.

Kumate J, Gutiérrez G, Santos JI, Muños O. *Manual de Infectología Clínica*. M C Editores, México 1994: 45-54.

Lal N, Malik GB, Sehgal H. Profile of T and B lymphocytes in malnourished children. *Ind J Med Res* 1980; **71**: 576-580.

Landay AL, Muirhead KA. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopath*. 1989; **52**: 48-60.

Lesourd BM, Mazari L. Immune response during recovery from protein-energy malnutrition. *Clin Nutr* 1997; **16**: 37-46.

Luengas J, Valenzuela RH. Desnutrición. Kwashiorkor. Marasmo. En: *Manual de Pediatría*. Valenzuela RH, Luengas BJ, Marquet SL. Ed. Interamericana. McGraw-Hill, México 1993: 241-256.

Maino VC, Suni MA. Rapid flow cytometry method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry* 1995; **20**: 127-133.

Manary MJ, Brewster DR, Broadhead RL, Crowley JR, Fjeld CR, Yarasheski KE. Protein metabolism in children with edematous malnutrition and acute lower respiratory infection. *Am J Clin Nutr* 1997; **65**: 1005-1010.

Manary MJ, Broadhead RL, Yarasheski KE. Whole-body protein kinetics in marasmus and kwashiorkor during acute infection. *Am J Clin Nutr* 1998; **67**: 1205-1209.

McCoy JP, Overton WR. Quality control in flow cytometry for diagnostic pathology: II. A conspectus of reference ranges for lymphocyte immunophenotyping. *Cytometry* 1994; **18**: 129-139.

McLaren DS, Meguid MM. *La Nutrición y sus Trastornos*. Ed. El Manual Moderno, México D. F. 1993: 97-108

Mohan Ram M, Reddy V, Misra S. Lysozyme activity in plasma leukocytes in malnourished children. *Br J Nutr* 1974; **32**: 313-316.

Molbak K, Lisse IM, Aaby P. T-lymphocyte subsets and prolonged diarrhea in young children from Guinea-Bissau. *Am J Epidemiology* 1996; **143**: 79-84.

Mugerwa WJ. The Lymphoreticular System in Kwashiorkor. *J Pathol* 1971; **105**: 105-109.

Nicholson JKA, Rao PE, Calvelli T, et al. Artifactual staining of monoclonal antibodies in two-color combinations is due to an immunoglobulin in the serum and plasma. *Cytometry*. 1994; **18**: 140-146.

Nijhuis EW, Nagelkerken L. Age-related changes in immune reactivity: the influence of intrinsic defect and of a changed composition of the CD4+ T cell compartment. *Exp Clin Immunogenetics* 1992; **9**: 195-202.

- Onís M de, Monteiro C, Akre J, Clugston G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global Database on Child Growth. Bull WHO 1993; **71**: 703-712.
- Ortiz-Ortiz L, Ruíz B, González A. Cellular immune responses. En Amebiasis: Infection and disease by Entamoeba histolytica. R. Kretschmer. CRC-Press Inc 1990: 77-90.
- Ortiz R, Campos C, Gómez JL, Espinoza M, Ramos-Motilla M, Betancourt M. Sister Chromatic Exchange and Cell Proliferation in Lymphocytes from Infected and non-infected Children with Severe Protein Calorie Malnutrition. Mutat Res 1994; **213**: 33-37.
- Ortiz R, Campos C, Gómez JL, Espinoza M, Ramos-Montilla M, Betancourt M. Effect of Renutrition on the Proliferation Kinetic of PHA Stimulated Lymphocytes from Malnourished Children. Mutat Res 1995; **334**: 235-241.
- Ortiz R, Cortés L, González C, Cortés E, Betancourt M. Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de jóvenes mexicanos sanos: estudio por medio de citometría de flujo. Bioquímica 1999; **24**:18-22.
- Osugi Y, Hara J, Kurahashi H, Sakata N, Inoue M, Yumura-Yagi K, Kawa-Ha K, Okada S, Tawa A. Age-related changes in surface antigens on peripheral lymphocytes of healthy children. Clin Exp Immunol 1995; **100**: 543-548.
- Paget SJ. Some aspects of the long-term effects of malnutrition on the behaviour of children in the Third World. Proc Nut Soc 1993; **52**: 201-210.

- Parent G, Chevalier P, Zalles L, Sevilla R, Bustos M, Dhenin JM, Jambon B. In vitro lymphocytes-differentiating effects of thymulin (Zn-FTS) on lymphocyte subpopulations of severely malnourished children. *A J Clin Nutr* 1994; **60**: 274-278.
- Pelletier DI, Frongillo EA, Schroeder DG, Habicht J-P. Efectos de la malnutrición en la mortalidad de menores de 5 años en países en desarrollo. *Bol OPS* 1996; **120**: 425-432.
- Pirenne H, Aujard Y, Eljaafari A, Bourillon A, Oury JF, Gac SL, Blot P, Sterkers G. Comparison of T cell functional changes during childhood with the ontogeny of CDw29 and CD45 RA expression on CD+4 T cells. *Pediatr Res* 1992; **32**: 81-85.
- Prince HE, Lape-Nixon M. CD69 expression reliably predicts the anti-CD3-induced proliferative response of lymphocytes from human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; **4**: 217-225.
- Raffi M, Hashemi S, Nahani J, Mohaghehpour N. Immune responses in malnourished children. *Clin Immunol Immunopathol* 1977; **8**: 1-6.
- Ramos-Galván R. Somatometría pediátrica. *Arch Inv Med (México)* 1976; **6**: 5
- Reddy V, Raghuramulu N, Bhaskaram C. Secretory IgA in protein calorie malnutrition. *Arch Dis Child* 1976; **51**: 871-874.
- Reinisch CL, Litman GW. Evolutionary immunobiology. *Immunol Today* 1989; **10**: 278-281.
- Rikimaru T, Taniguchi K, Yartey JE, Kennedy DO, Nkrumah FK. Humoral and cell-mediated immunity in malnourished children in Ghana. *Eur J Clin Nutr* 1998; **52**: 344-350.

- Roa KSJ. Evolution of Kwashiorkor and marasmus. *Lancet* 1974; **1**: 709-711.
- Roa VV, Gupta EV, Thomas YM. Chromosome Damage in Untreated Tuberculosis Patients. *Tubercle* 1990; **71**: 169-172.
- Robles B, Ramos-Galván R, Cravioto J. Valoración de la conducta del niño con desnutrición avanzada y de sus modificaciones durante la recuperación. *Bol Med Hosp Inf Mex* 1959; **16**: 317-341.
- Selvaraj RJ, Bhat KS. Metabolic and bactericidal activities of leukocytes in Protein Calorie Malnutrition. *A J Clin Nutr* 1972; **25**: 166-174.
- Stiehm ER. Humoral immunity in malnutrition. *Fed Proc* 1980; **39**: 3093-3097.
- Strauss GHS. Non-random cell killing in criopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT) I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat Res* 1991; **252**: 1-5.
- Takahashi N, Imanishi K, Nishida H, Uchiyama T. Evidence for immunologic immaturity of cord blood T cells. Cord blood T cells are susceptible to tolerance induction to in vitro stimulation with a superantigen. *J Immunol* 1995; **155**: 5213-5219.
- Testi R, D'Ambrosio, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cell. *Immunol Today* 1994; **15**: 479-483.
- Torún B, Chew F. Protein-energy malnutrition. In: Shils ME, Olson JA, Shike M (editors). *Modern nutrition in health and disease*. Ed. Williams and Wilkins 1994; **57**: 950-964.

Touraine JL, Gay G. Deficit immunitaire secondaire a la malnutrition. *Gastroenterol Clin Biol* 1981; **5**: 835-838.

Trivedi HN, HayGlass KT, Gangur V, Allardice JG, Embree JE, Plummer FA. Analysis of neonatal T cell and antigen presenting cell functions. *Hum Immunol* 1997; **57**: 69-79.

Ullum H, Cozzi LA, Victor J, Skinhoj P, Philips AN, Klarlund PB. Increased losses of CD4CD45 cells in late stages of HIV infection is related to increased risk of death: evidence from a cohort of 347 HIV-infected individuals. *AIDS* 1997; **11**: 1479-1489.

Vint FW. Post-mortem Finding in the Native of Kenya. *East Afr Med J* 1937; **13**: 332-340.

Wilso CB. The ontogeny of T lymphocytes maturation and function. *J Pediatr* 1991; **118**: 54-59.

Woodward BD, Bezanson KD, Hillyer LM, Lee WH. The CD45 RA+ (quiescent) cellular phenotype is overabundant: relative to the CD45RA- phenotype within the involute splenic T-cell population of weaning mice subjected to wasting protein-energy malnutrition. *J Nutr* 1995; **125**: 2471-2482.

Woodward B, Hillyer L, Hunt K. T cells with a quiescent phenotype (CD45RA+) are overabundant in the blood and involute lymphoid tissues in wasting protein and energy deficiencies. *Immunology* 1999; **96**: 246-253.

## GLOSARIO

BN.- niños bien nutridos  
BNI.- niños bien nutridos infectados  
CD.- moléculas de superficie  
CPA.- células presentadoras del antígeno  
DES.- niños desnutridos infectados  
DCP.- desnutrición calórica-proteínica  
ENAL.- encuesta nacional en el medio rural  
FL-1.- fluorescencia 1  
FL-2.- fluorescencia 2  
FL-3.- fluorescencia 3  
FITC.- isotiacinato de fluoresceína  
FSC.- dispersión anterior de la luz  
IFN.- interferón  
IL-2.- interleucina 2  
IL-4.- interleucina 4  
OMS.- Organización Mundial de la Salud  
PE.- ficoeritrina  
PerCP.- proteína cloridina peridina  
PHA.- fitohemaglutinina  
PMT.- detectores (filtros de banda)  
PWN.- fitolaca  
TCR.- receptor de linfocitos T  
SSC.- dispersión lateral de la luz

# ANEXO I

Cuadros de los Datos Individuales Obtenidos en los Diferentes Grupos de Estudio:

**Cuadro 1a. Promedio de porcentajes por individuo de leucocitos y de subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de niños bien nutridos sanos.**

Niños	Linfocitos	Granulocitos	CD3	CD20
BN- 1	68.0	24.9	66.1	22.8
BN- 2	45.5	42.7	57.1	27.4
BN- 3	48.1	42.8	61.2	16.8
BN- 4	52.4	34.4	60.9	23.4
BN- 5	51.6	34.0	66.1	25.6
BN- 6	51.6	26.1	57.8	16.1
BN- 7	55.3	36.6	53.8	34.9
BN- 8	76.2	16.4	61.6	28.4
BN- 9	71.4	21.4	61.5	26.6
BN- 10	70.5	19.0	75.9	11.2
BN- 11	61.7	26.1	57.9	21.1
BN- 12	56.9	36.2	55.7	31.2
BN- 13	46.8	22.7	60.1	30.4
BN- 14	35.9	58.4	61.9	25.9
BN- 15	46.1	43.3	57.1	20.9
BN- 16	64.0	27.1	64.2	20.6
<b>Promedio</b>	<b>56.4</b>	<b>32.0</b>	<b>61.2</b>	<b>24.0</b>
EE	2.8	2.8	1.3	1.5

**Cuadro 2a. Promedio de porcentajes por individuo de monocitos y de subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de niños bien nutridos sanos.**

Niños	Monocitos	CD4	CD8	CD4/CD8	CD16+CD56	T HLA-DR
BN- 1	3.5	38.6	27.8	1.39	12.6	3.4
BN- 2	7.1	42.9	18.8	2.28	14.8	3.9
BN- 3	4.9	38.6	27.7	1.39	21.4	7.4
BN- 4	5.4	28.8	36.3	0.79	12.8	19.6
BN- 5	3.8	35.0	27.3	1.28	7.6	19.0
BN- 6	6.0	37.5	27.9	1.34	23.8	6.6
BN- 7	6.6	23.2	32.1	0.72	7.5	16.2
BN- 8	2.8	40.5	25.6	1.58	7.9	11.4
BN- 9	3.5	29.2	34.5	0.85	9.2	19.1
BN- 10	5.4	34.9	41.4	0.84	15.4	10.8
BN- 11	2.4	38.1	29.1	1.31	13.5	5.8
BN- 12	2.5	33.8	35.4	0.95	13.9	8.9
BN- 13	3.7	38.3	33.6	1.14	5.5	11.0
BN- 14	3.0	35.9	24.8	1.45	10.3	10.5
BN- 15	6.2	37.0	23.0	1.61	15.4	4.2
BN- 16	3.1	45.1	20.1	2.24	7.0	6.5
BN- 17	4.8	40.7	26.6	1.53	5.5	21.5
BN- 18	4.2	24.4	35.0	0.70	16.2	Nd
BN- 19	5.8	28.7	33.7	0.58	8.3	7.2
BN- 20	3.1	37.0	28.3	1.31	13.5	11.2
BN- 21	6.7	30.9	37.2	0.83	10.8	10.2
BN- 22	5.8	29.5	26.3	1.12	29.9	12.0
BN- 23	5.9	36.1	37.5	0.96	4.1	9.3
BN- 24	6.1	36.1	39.1	0.92	5.4	22.6
BN- 25	4.8	44.2	21.6	2.05	6.6	5.8
BN- 26	2.0	37.7	25.8	1.46	9.18	6.4
BN- 27	5.0	52.7	24.7	2.13	8.0	6.2
BN- 28	Nc	34.3	33.7	1.02	14.2	10.3
BN- 29	Nc	32.1	29.1	1.10	11.6	14.7
BN- 30	Nc	38.7	20.5	1.89	14.4	13.0
BN- 31	Nc	39.7	23.9	1.66	20.9	4.5
BN- 32	Nc	24.8	30.1	0.82	23.5	7.7
BN- 33	Nc	24.1	46.7	0.52	20.6	13.2
BN- 34	Nc	29.3	31.6	0.93	9.2	7.8
BN- 35	Nc	38.0	34.0	1.12	3.0	12.1
BN- 36	Nc	35.4	36.0	0.98	17.7	7.2
BN- 37	Nc	32.7	37.5	0.87	15.7	9.6
BN- 38	Nc	46.5	20.7	2.25	8.3	7.3
BN- 39	Nc	33.5	29.3	1.14	14.9	Nd
BN- 40	Nc	40.2	31.2	1.29	6.7	12.0
BN- 41	Nc	29.4	22.1	1.33	23.5	6.6
BN- 42	Nc	27.1	26.9	1.01	18.2	17.7
<b>Promedio</b>	<b>4.6</b>	<b>35.3</b>	<b>30.0</b>	<b>1.3</b>	<b>12.8</b>	<b>10.5</b>
EE	0.3	1.0	1.0	0.1	1.0	0.8

Nc no considerados por encontrarse diferencias por edad. Nd no se determinó.

**Cuadro 3a. Promedio de porcentajes por individuo de las sub-poblaciones de linfocitos en sangre periférica de niños bien nutridos infectados.**

Niños	Linfocitos	Granulo	Monocitos	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	CD20	CD16+CD56	T HLA-DR
BNI- 1 <sup>9</sup>	34.9	60.3	4.7	35.4	12.2	18.5	0.66	45.7	19.9	Nd
BNI- 2 <sup>9</sup>	37.2	48.2	3.0	54.0	24.0	13.7	1.75	24.1	30.7	Nd
BNI- 3 <sup>9</sup>	54.3	31.9	6.8	57.7	33.5	27.3	1.23	31.0	3.8	5.9
BNI- 4 <sup>m</sup>	71.6	15.7	4.7	35.6	32.5	29.6	1.10	35.3	20.6	3.1
BNI- 5 <sup>m</sup>	69.5	18.0	4.7	61.0	35.2	23.2	1.52	22.3	5.6	6.8
BNI- 6 <sup>m</sup>	49.7	42.9	6.3	44.0	14.0	30.4	0.46	50.6	21.0	17.2
BNI- 7 <sup>m</sup>	68.9	22.1	8.2	70.8	30.9	26.5	1.17	27.5	12.5	11.8
BNI- 8 <sup>m</sup>	36.2	59.0	3.0	51.4	26.7	17.3	1.54	26.8	8.8	3.0
BNI- 9 <sup>m</sup>	53.8	32.5	6.8	63.8	35.0	24.7	1.41	29.3	8.9	10.9
BNI-10 <sup>r</sup>	26.1	60.1	6.9	39.7	30.9	31.2	0.99	30.9	11.4	11.7
BNI-11 <sup>r</sup>	47.4	36.0	4.1	56.2	25.0	15.1	1.66	28.8	4.3	5.8
BNI-12 <sup>r</sup>	23.9	63.5	5.6	49.8	46.3	24.5	1.88	38.6	5.5	0.1
BNI- 13 <sup>r</sup>	35.4	53.4	2.0	57.0	28.3	31.0	0.91	26.7	17.0	Nd
BNI- 14 <sup>r</sup>	Nd	Nd	Nd	63.7	35.8	27.5	1.30	22.5	10.8	Nd
<b>Promedio</b>	<b>46.8</b>	<b>41.8</b>	<b>5.1</b>	<b>52.9</b>	<b>29.3</b>	<b>24.3</b>	<b>1.3</b>	<b>31.7</b>	<b>12.9</b>	<b>7.6</b>
EE	4.3	4.5	0.5	2.9	2.4	1.6	0.1	2.4	2.1	1.6

<sup>9</sup> Infección gastrointestinal, <sup>r</sup> Infección respiratoria, <sup>m</sup> Infección mixta.

**Cuadro 4a. Promedio de porcentajes por individuo de las sub-poblaciones de linfocitos en sangre periférica de niños desnutridos.**

Niños	Linfocitos	Granulo	Monocitos	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	CD20	CD16+CD56	T HLA-DR
DES- 1 <sup>sm</sup>	23.8	70.7	5.5	59.4	28.3	32.4	0.87	34.8	4.0	3.3
DES- 2 <sup>sr</sup>	62.3	28.3	5.2	66.9	31.2	31.6	0.99	16.0	12.0	Nd
DES- 3 <sup>sg</sup>	53.2	34.1	3.4	62.2	41.3	20.0	2.06	30.6	5.5	6.8
DES- 4 <sup>sg</sup>	40.5	51.5	8.0	41.9	25.4	25.0	1.02	19.7	31.4	5.4
DES- 5 <sup>sg</sup>	29.2	59.9	4.5	26.2	24.7	21.1	1.17	39.5	14.4	0.2
DES- 6 <sup>sr</sup>	34.0	63.4	3.2	46.0	17.1	41.1	0.41	Nd	21.0	19.7
DES- 7 <sup>Mg</sup>	57.0	23.3	9.6	53.0	41.3	20.3	2.03	28.2	13.0	Nd
DES- 8 <sup>Mm</sup>	61.0	31.3	7.5	37.0	23.8	13.7	1.74	Nd	4.4	3.7
DES- 9 <sup>Mr</sup>	46.0	13.5	3.4	66.0	43.2	26.7	1.61	23.4	9.1	3.7
DES- 10 <sup>Mg</sup>	60.4	31.1	8.5	60.6	28.7	30.0	0.96	32.4	2.4	16.3
DES- 11 <sup>Mm</sup>	16.4	70.6	13.0	72.8	31.3	23.3	1.34	16.4	2.6	7.4
DES- 12 <sup>Mm</sup>	35.4	39.0	8.0	67.5	47.3	30.0	1.57	19.6	4.4	11.3
DES- 13 <sup>Mm</sup>	50.2	43.4	6.3	58.9	26.0	22.6	1.15	32.2	3.7	18.0
DES- 14 <sup>Mg</sup>	73.7	23.5	2.8	66.3	25.6	47.9	0.53	21.2	14.6	23.3
DES- 15 <sup>Mr</sup>	44.3	46.7	2.9	68.4	23.8	50.8	0.47	6.0	22.2	23.4
DES- 16 <sup>Kg</sup>	45.3	49.6	5.1	54.5	37.8	17.3	2.18	19.1	1.7	6.4
DES- 17 <sup>Km</sup>	48.3	43.4	8.3	55.8	23.9	27.9	0.86	21.9	15.3	3.8
DES- 18 <sup>Km</sup>	29.7	55.2	6.2	45.7	26.9	33.4	0.81	21.9	7.5	6.4
Promedio	<b>45.0</b>	<b>43.3</b>	<b>6.2</b>	<b>56.1</b>	<b>30.4</b>	<b>28.6</b>	<b>1.2</b>	<b>23.9</b>	<b>10.5</b>	<b>9.9</b>
EE	3.5	3.9	0.6	2.9	2.0	2.4	0.1	2.0	1.9	1.8

<sup>s</sup> Segundo grado de desnutrición, <sup>M</sup> Marasmo, <sup>K</sup> Kwashiorkor, <sup>g</sup> Infección gastrointestinal, <sup>r</sup> Infección respiratoria e <sup>m</sup> Infección mixta.

**Cuadro 5a. Promedio de porcentajes por individuo de las sub-poblaciones de linfocitos nativos, de memoria y dobles positivos en sangre periférica de niños bien nutridos.**

Niños	CD45RA	CD45RO	CD45RARO	CD4CD45RA	CD4CD45RO	CD4CD45RARO
BN- 1	85.2	7.6	5.1	80.3	12.5	6.7
BN- 2	83.4	9.4	5.6	79.4	13.8	6.5
BN- 3	71.5	21.9	4.3	69.7	23.2	7.0
BN- 4	74.4	17.3	5.6	68.6	22.8	7.6
BN- 5	76.7	11.4	7.0	72.6	15.7	11.6
BN- 6	78.5	15.5	5.2	68.4	23.8	7.7
BN- 7	82.7	10.6	3.1	74.7	17.7	6.4
BN- 8	56.2	23.0	13.9	62.2	21.1	16.6
BN- 9	79.0	11.2	8.7	73.6	16.8	9.6
BN- 10	65.8	7.9	16.7	64.8	26.5	8.1
<b>Promedio</b>	<b>75.3</b>	<b>13.6</b>	<b>7.5</b>	<b>71.4</b>	<b>19.4</b>	<b>8.8</b>
EE	2.8	1.8	1.4	1.9	1.5	1.0

**Cuadro 6a. Promedio de porcentajes por individuo de las sub-poblaciones de linfocitos nativos, de memoria y dobles positivos en sangre periférica de niños bien nutridos infectados.**

Niños	CD45RA	CD45RO	CD45RARO	CD4CD45RA	CD4CD45RO	CD4CD45RARO
BNI-1 <sup>g</sup>	76.1	7.9	6.5	51.4	34.9	13.7
BNI- 2 <sup>g</sup>	74.5	6.6	4.2	59.5	27.0	12.0
BNI- 3 <sup>g</sup>	82.9	7.3	5.9	73.6	17.5	8.6
BNI- 4 <sup>r</sup>	70.7	18.8	8.6	65.0	24.0	9.9
BNI- 5 <sup>r</sup>	84.1	9.7	4.3	68.4	24.7	6.6
BNI- 6 <sup>r</sup>	82.7	8.9	5.3	71.3	19.7	6.9
BNI- 7 <sup>r</sup>	79.8	11.9	3.1	73.9	18.1	4.4
BNI- 8 <sup>m</sup>	76.2	8.2	6.1	68.8	18.4	12.5
BNI- 9 <sup>m</sup>	78.7	7.8	8.8	54.0	38.7	6.6
BNI- 10 <sup>m</sup>	75.7	14.0	5.3	64.9	28.0	6.9
BNI- 11 <sup>m</sup>	73.2	14.4	4.0	58.1	35.1	6.8
BNI- 12 <sup>m</sup>	72.4	18.0	3.9	59.1	34.6	6.3
<b>Promedio</b>	<b>77.3</b>	<b>11.1</b>	<b>5.5</b>	<b>62.3</b>	<b>28.1</b>	<b>8.8</b>
EE	1.3	1.2	0.5	1.7	1.8	0.8

<sup>g</sup> Infección gastrointestinal, <sup>r</sup> Infección respiratoria e <sup>m</sup> Infección mixta.

**Cuadro 7a.** Promedio de porcentajes por individuo de las sub-poblaciones de linfocitos nativos, de memoria y dobles positivos en sangre periférica de niños desnutridos infectados.

Niños	CD45RA	CD45RO	CD45RARO	CD4CD45RA	CD4CD45RO	CD4CD45RARO
DES-1 <sup>sm</sup>	Nd	Nd	Nd	78.1	10.9	10.9
DES-2 <sup>sr</sup>	67.0	17.0	13.6	62.8	22.0	15.1
DES-3 <sup>sg</sup>	75.4	12.1	10.4	54.0	30.0	13.6
DES-4 <sup>sg</sup>	72.1	6.8	4.1	77.9	11.6	9.9
DES-5 <sup>sg</sup>	87.2	7.3	4.5	57.0	26.5	16.3
DES-6 <sup>sr</sup>	77.3	14.7	5.9	59.2	26.5	14.3
DES-7 <sup>Mg</sup>	83.2	7.4	5.2	74.7	14.6	10.6
DES-8 <sup>Mr</sup>	84.4	10.0	4.5	76.9	15.9	7.2
DES-9 <sup>Mg</sup>	65.4	18.8	5.9	66.2	26.3	7.3
DES-10 <sup>Mm</sup>	65.8	8.5	4.1	78.6	14.3	5.8
DES-11 <sup>Mm</sup>	78.6	11.0	6.9	67.4	19.9	12.6
DES-12 <sup>Mg</sup>	68.0	13.3	13.6	65.0	24.9	9.9
DES-13 <sup>kg</sup>	59.6	7.8	5.2	78.6	11.3	9.9
DES-14 <sup>km</sup>	71.2	15.5	7.0	65.5	22.4	11.3
DES-15 <sup>Km</sup>	60.8	11.3	6.6	61.2	27.7	10.8
<b>Promedio</b>	<b>72.6</b>	<b>11.5</b>	<b>7.0</b>	<b>68.2</b>	<b>20.3</b>	<b>11.4</b>
EE	2.3	1.0	0.8	2.2	1.7	0.7

<sup>s</sup> Segundo grado de desnutrición, <sup>M</sup> Marasmo, <sup>k</sup> Kwashiorkor, <sup>g</sup> Infección gastrointestinal, <sup>r</sup> Infección respiratoria e <sup>m</sup> Infección mixta. Nd no se determinó

**Cuadro 8a. Promedio de porcentajes por individuo de las sub-poblaciones de linfocitos activados en sangre periférica de niños bien nutridos sanos.**

Niños	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	CD19	CD56	CD3CD69	CD4CD69	CD8CD69	BCD69	NKCD69
BN- 1	49.1	64.8	21.7	2.99	20.6	8.5	13.7	8.9	4.8	5.0	6.1
BN- 2	63.6	72.0	24.4	2.95	22.0	6.5	14.8	8.5	6.3	8.8	3.3
BN- 3	77.1	57.2	35.9	1.59	31.9	6.3	7.9	4.6	3.3	6.1	3.3
BN- 4	74.9	67.3	25.1	2.68	24.9	9.6	9.2	5.6	3.6	11.2	6.7
BN- 5	46.9	57.3	26.2	2.19	22.1	10.9	24.2	15.4	8.8	6.6	8.2
BN- 6	76.6	57.3	28.8	1.99	30.4	30.4	11.9	7.5	4.4	7.8	5.8
BN- 7	61.4	69.6	26.5	2.63	22.0	Nd	24.7	18.6	6.1	5.9	Nd
BN- 8	56.8	52.5	30.5	1.72	17.7	4.3	29.4	18.1	11.3	3.2	3.1
BN- 9	55.5	47.1	34.3	1.37	23.0	Nd	16.2	8.1	8.1	4.3	Nd
BN- 10	48.4	50.1	44.3	1.13	20.4	4.6	30.7	15.3	15.4	2.8	3.7
<b>Promedio</b>	<b>61.0</b>	<b>59.5</b>	<b>29.8</b>	<b>2.1</b>	<b>23.5</b>	<b>10.1</b>	<b>18.3</b>	<b>11.1</b>	<b>7.6.8</b>	<b>6.2</b>	<b>5.0</b>
EE	3.7	2.7	2.1	0.2	1.4	2.7	2.6	1.7	1.2	0.8	0.6

Nd no se determinó.

**Cuadro 9a. Promedio de porcentajes por individuo de las sub-poblaciones de linfocitos activados en sangre periférica de niños bien nutridos infectados.**

Niños	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	CD19	CD56	CD3CD69	CD4CD69	CD8CD69	BCD69	NKCD69
BNI-1 <sup>g</sup>	59.9	62.4	27.3	2.29	32.4	25.2	19.8	11.7	8.1	6.5	6.7
BNI-2 <sup>g</sup>	54.5	60.5	29.4	2.06	31.0	2.8	30.9	18.4	12.5	7.2	2.6
BNI-3 <sup>g</sup>	57.4	44.0	48.4	0.91	30.3	6.9	35.7	15.6	20.1	5.3	5.3
BNI-4 <sup>m</sup>	46.1	66.9	23.9	2.80	46.3	Nd	20.5	14.0	6.5	4.0	Nd
BNI-5 <sup>m</sup>	46.5	56.4	32.1	1.76	28.7	5.1	40.9	27.1	13.8	7.2	4.4
BNI-6 <sup>m</sup>	34.6	38.5	51.1	0.75	31.0	18.1	22.8	7.6	15.2	6.3	9.7
BNI-7 <sup>m</sup>	48.1	60.2	30.4	1.98	29.6	7.2	17.2	8.6	8.6	9.2	6.4
BNI-8 <sup>m</sup>	53.3	59.0	26.4	2.23	39.7	7.3	31.2	18.7	12.5	9.0	6.7
BNI-9 <sup>m</sup>	36.5	62.3	40.9	1.52	33.0	7.2	24.8	10.8	14.0	6.2	3.5
BNI-10 <sup>m</sup>	44.2	50.2	35.0	1.43	29.2	5.1	13.3	7.4	5.9	7.0	3.5
BNI-11 <sup>r</sup>	64.1	39.4	42.2	0.93	24.8	8.2	24.3	7.2	17.1	7.5	3.2
BNI-12 <sup>r</sup>	59.6	66.0	26.5	2.49	41.1	4.7	31.1	19.1	12.0	13.7	3.2
BNI-13 <sup>r</sup>	54.8	43.2	41.5	1.04	27.2	11.5	31.9	14.7	17.0	12.2	8.5
BNI-14 <sup>r</sup>	59.5	53.0	38.0	1.39	21.8	6.7	31.7	19.9	11.8	10.1	2.5
BNI-15 <sup>r</sup>	33.5	55.0	32.3	1.70	24.8	8.3	53.5	34.0	19.5	11.5	3.8
<b>Promedio</b>	<b>50.2</b>	<b>54.5</b>	<b>35.0</b>	<b>1.7</b>	<b>31.4</b>	<b>8.9</b>	<b>28.6</b>	<b>15.7</b>	<b>13.0</b>	<b>8.2</b>	<b>5.0</b>
EE	2.5	2.4	2.2	0.2	1.7	1.5	2.6	2.0	1.1	0.7	0.6

Nd no se determinó. <sup>g</sup> Infección gastrointestinal, <sup>r</sup> Infección respiratoria e <sup>m</sup> Infección mixta.

**Cuadro10a. Promedio de porcentajes por individuo de las sub-poblaciones de linfocitos activados en sangre periférica de niños desnutridos infectados.**

Niños	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	CD19	CD56	CD3CD69	CD4CD69	CD8CD69	BCD69	NKCD69
DES-1 <sup>sr</sup>	53.2	48.2	32.2	1.50	18.9	Nd	16.7	9.2	7.5	4.5	Nd
DES-2 <sup>sg</sup>	32.1	59.4	30.6	1.94	19.6	21.4	15.3	4.2	11.1	5.0	4.4
DES-3 <sup>sg</sup>	28.0	56.9	27.6	2.06	Nd	nd	17.0	9.7	7.3	Nd	Nd
DES-4 <sup>sr</sup>	36.6	28.1	52.7	0.53	25.8	18.8	19.6	7.1	12.5	13.1	4.6
DES-5 <sup>Mr</sup>	74.7	69.4	24.4	2.84	18.5	6.1	10.1	6.1	4.0	11.7	3.8
DES-6 <sup>Mg</sup>	44.0	35.9	49.8	0.72	28.4	2.9	21.7	9.4	12.3	4.6	1.6
DES-7 <sup>Mim</sup>	50.1	59.9	35.7	1.68	19.8	5.7	7.2	3.6	3.6	3.6	4.3
DES-8 <sup>Mim</sup>	54.0	49.7	35.4	1.40	33.7	4.2	13.2	4.7	8.5	7.3	3.6
DES-9 <sup>Mg</sup>	74.7	35.0	57.8	0.61	20.0	Nd	23.8	12.4	11.4	18.0	Nd
DES-10 <sup>Mg</sup>	53.9	69.6	31.1	2.24	31.0	8.7	20.4	10.0	10.4	6.9	6.2
DES-11 <sup>Mr</sup>	69.6	37.1	51.4	0.72	Nd	Nd	21.3	8.3	13.0	Nd	Nd
DES-12 <sup>kg</sup>	45.8	66.7	22.5	2.96	14.2	Nd	11.4	9.0	2.4	4.9	Nd
DES-13 <sup>km</sup>	30.1	55.8	36.9	1.51	22.0	6.9	12.9	5.8	7.1	13.5	3.7
DES-14 <sup>km</sup>	43.7	58.5	37.2	1.57	15.8	Nd	13.2	8.0	5.2	6.6	Nd
<b>Promedio</b>	<b>49.3</b>	<b>52.2</b>	<b>37.5</b>	<b>1.6</b>	<b>22.3</b>	<b>9.3</b>	<b>16.0</b>	<b>7.7</b>	<b>8.3</b>	<b>8.3</b>	<b>4.0</b>
EE	4.1	3.6	3.0	0.2	1.6	1.8	1.3	0.7	1.0	1.2	0.3

<sup>s</sup> Segundo grado de desnutrición, <sup>M</sup> Marasmo, <sup>k</sup> Kwashiorkor, <sup>g</sup> Infección gastrointestinal, <sup>r</sup> Infección respiratoria e <sup>m</sup> Infección mixta.

# **ANEXO II**

Se presentan dos artículos como productos directos de la Tesis que han sido publicados y un artículo derivado del programa del Doctorado en el Seminario Temático:

O. Nájera, C. González, G. Toledo, E. Cortés, L. López, M. Betancourt and R. Ortiz. **EARLY ACTIVATION OF T, B AND NK LYMPHOCYTES IN INFECTED MALNOURISHED AND INFECTED WELL-NOURISHED CHILDREN.** J Nutr Immunol 2001; **5** (3/4):

O. Nájera, C. González, G. Toledo, L. López, E. Cortés, M. Betancourt and R. Ortiz. **CD45RA AND CD45RO ISOFORMS IN INFECTED MALNOURISHED AND INFECTED WELL-NOURISHED CHILDREN.** Clin Exp Immunol 2001; **125**: 1-5.

Oralia Nájera M, Cristina González T, Miguel Betancourt R y A. Rocío Ortiz M. **LA DESNUTRICIÓN EN MÉXICO: REVISIÓN DE LOS PROGRAMAS GUBERNAMENTALES Y LOS ESTUDIOS DIAGNÓSTICOS DE ALCANCE NACIONAL.** Bol Med Hosp Inf Mex 2001; **58**: 120-133.

## EARLY ACTIVATION OF T, B AND NK LYMPHOCYTES IN INFECTED MALNOURISHED AND INFECTED WELL-NOURISHED CHILDREN.

O. Nájera, MS; C. González, MS; G. Toledo, MD; E. Cortés, MS; L. López, MD; M. Betancourt, PhD & R. Ortiz, PhD.

**ABSTRAT.** *In vitro* response of T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>), B (CD19<sup>+</sup>) and NK (CD56<sup>+</sup>) peripheral blood lymphocytes to the mitogen PHA, PWM and IL-2 respectively, were compared in three groups of children: non-infected well-nourished, well-nourished infected and malnourished infected children. This response was measured by analysing the expression of the early activation antigen CD69 by three-color flow cytometry. All T lymphocyte subsets of malnourished infected children showed impaired activation capability, as the percentages of CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> lymphocyte were lower than those observed in well-nourished infected children. The percentage of B-lymphocytes (CD19<sup>+</sup>) was also significantly decreased in malnourished as compared to well-nourished infected children. These results indicate that malnutrition influences the function and proportion of peripheral lymphocytes suggesting that malnourished children have a defect which alters their activation process and might explain some of the T immunoregulatory abnormalities observed in these children.

**Keywords:** CD69; Immune deficiency; Three-color immunofluorescence; Flow cytometry; Malnutrition.

---

O. Nájera, Departamento de Atención a la Salud, UAM-Xochimilco. México DF.

C. González, E. Cortés, M. Betancourt and R. Ortiz, Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-Iztapalapa. México DF.

G. Toledo, Hospital Pediátrico del DDF Xochimilco, México DF.

L. López, Hospital Pediátrico del DDF Iztapalapa. México DF.

Address correspondence to: Oralia Nájera, Departamento de Atención a la Salud,

## INTRODUCTION

In Latin America, malnutrition associated with infection is considered as directly or indirectly responsible of one third of deaths in children under 6 years of age [1]. It is well known that malnourished individuals are more susceptible to infection, therefore they are considered as immunodeficient [2-4]. Several differentiation activators (mitogens) have been used to assess the functional capability of the cell-mediated immune response *in vitro*. Chowdhury et al. [5] and Chandra [6] found that lymphocytes of malnourished children show an impaired response to mitogens. While Ortiz et al. [7] and González et al. [8] found that this response was faster in lymphocytes from malnourished children. Nevertheless, this initial efficiency response did not persist; also a lower proportion of actively proliferating lymphocytes has been detected in these children [9]. In addition, controversial results in peripheral lymphocyte subpopulation studies have been reported for malnourished children [2,6,10,11].

Several factors may be responsible for these controversial results, such as the type and degree of malnutrition of the studied children, the association with infections, and the methodology used. Therefore, it is important to study the effects of malnutrition on the immune system with more sensitive methods. Flow cytometry is a highly sensitive that allows the simultaneous detection of lymphocyte populations proportions and their activation capability. The early activation antigen CD69<sup>+</sup> allows the faster identification (4 to 6 hours) of cells going through the activation process. This antigen is expressed in T, B and NK lymphocytes, as well as in other immune cell [12]. CD69 expression detected by

---

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, A. P. 23-181, Coyoacán, 04960 México, D. F.

**Acknowledgments.** This work was supported in part by CONACyT, México grants 3005P-M9606, F282-M-9208 and 114128/114816. And FOMES, México, grant 98-35-28.

flow cytometry has been used to obtain subset-specific information about lymphocyte activation in different tissues [13,14], as in several diseases [15-17]. Other studies have investigated the co-expression of this antigen with other membrane surface receptors and/or cytokines [18,19].

The purpose of this study was to assess the effects of infection and malnutrition on the proportion of peripheral lymphocyte subsets and on their activation capability by flow cytometry, comparing these parameters in malnourished infected (MNI), well-nourished infected (WNI) and non-infected well-nourished children (WN).

## **SUBJECTS AND METHODS**

### **Subjects**

Blood samples were obtained on the day of hospital admission prior to treatment. The study groups consisted of 12 WNI children, 14 MNI children of both sexes, who were inpatients at two Pediatric DDF Hospitals in Mexico City, all suffering from severe bacterial infection. The control group (WN), recruited from healthy children in routine consultation in the same hospitals, included 10 children of both sexes. The Medical Ethics Committee of the General Direction of Medical Services (DDF, Mexico) approved the study. The characteristics of three groups are shown in Tables 1, 2 and 3. Weight/height deficit (determined according to the tables established for mexican children) [20] and other clinical signs and symptoms were considered to establish the severity of malnutrition. Diagnosis of bacterial infection was based on the symptoms and laboratory tests, being classified as gastrointestinal, respiratory or mixed (with both infections).

---

**(Table 1, 2 and 3)**

### **Samples and Mitogens**

Whole blood was collected using Vacutainer™ brand blood collection tubes (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ) containing sodium heparin anticoagulant, and processed on the same day. Cell viability was determined by using a double staining with fluorescein diacetate and ethidium bromide [21]. Always more than 90% of the cells were viable. For each sample three mitogens were used to activate different lymphocyte subsets: phytohemagglutinin (PHA; Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany) for T lymphocytes (final concentration 5 µg/mL). Pokeweed mitogen (PWM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) for B-lymphocytes (2 µl), and interleukin 2 (IL-2; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) for NK lymphocytes (final concentration 20 U/mL). Each mitogen was added to 150µl whole blood. An additional aliquot was used as control without mitogen. All samples were incubated at 37°C for 4 hours.

### **Three-Color Immunofluorescent Staining**

After incubation, cells were stained with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (three different colors) according to previously described methods [14] with modifications, using the FASTIMMUNE™ kit. To detect T lymphocytes, a mixture of CD3 antibody conjugated with peridinin chlorophyll protein (PerCP), anti-CD69 with phycoerythrin (PE) and CD4 or CD8 antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) were used. To identify B and NK lymphocytes, anti-CD45 conjugated with PerCP, anti-CD69 with PE, anti-CD19 (for B-lymphocytes) and anti-CD56 (for NK) conjugated with FITC were used. Cells were prepared as follows: 20 µl of the corresponding antibody mix were added to 50 µl whole blood, mixed and incubating for 30 min at room temperature in

the dark, 450  $\mu$ l of 1X FACS Lysing Buffer was added during vortex mixing. Incubated for 15 minutes at room temperature in the dark. Simultaneously, a mix of  $\gamma_1$ FITC/ $\gamma_1$ PE/CD3 PerCP or  $\gamma_1$ PE/CD45 PerCP antibodies were prepared as isotype controls to establish the background fluorescence and analysis region. All antibodies and Lysing Buffer were purchased from Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA. The absolute numbers of cells ( $\times 10^6/L$ ) for each lymphocyte subset were calculated by multiplying the corrected relative value by the total lymphocyte count.

### **Flow Cytometry Analysis**

Whole blood samples were analysed by three-color analysis using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry System). Data were acquired with LYSYS II software by fluorescence triggering in the FL3 channel to gate on lymphocyte populations (CD3<sup>+</sup>) or on leukocytes (CD45<sup>+</sup>). Data were displayed as two-color dot plots (FL1 vs FL2) to identify cell type (FL1<sup>+</sup>) and activation (FL2<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>). Quadrant location on dot plot was determined with negative control antibodies ( $\gamma_1$ ) and unstimulated samples to identify CD69<sup>+</sup> cells (Figure 1). All samples were processed within the first 24 hours after staining.

### **(Figure 1)**

### **Statistical Analysis**

Results are expressed as mean  $\pm$  standard error and compared using the ANOVA and non-parametric Wilcoxon/Kruskal-Wallis tests, using JMP statistics program. Statistical significance was considered when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Lymphocyte Subsets: T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>), B (CD19<sup>+</sup>) and NK (CD56<sup>+</sup>)

Clinical characteristics (on hospital admission): WNI and MNI children with gastrointestinal and mixed infection showed diarrhoea with dehydration and fever. Respiratory infection was associate with fever, cough and several degree of respiratory insufficiency. Mean haemoglobin concentration in the WNI was  $11.5 \pm 0.7$  g/L and only three cases had anemia with haemoglobin <10 g/L. The MNI children presented more severe anemia, mean haemoglobin concentration was  $8.3 \pm 1.0$  g/L and only one case presented normal haemoglobin concentration. In WNI and MNI children leukocyte counts were expected to age with an average of  $9.03 \pm 1.6 \times 10^6$  cells/L and  $10.47 \pm 3.8 \times 10^6$  cells/L respectively. In WNI circulating leukocyte counts showed  $55.11 \pm 10.6\%$  lymphocytes and  $43.78 \pm 10.3\%$  neutrophils, in MNI leukocyte counts were  $46.14 \pm 10.3\%$  lymphocytes and  $53.14 \pm 10.3\%$  neutrophils, which were slightly different values than expected at this age [22].

Distribution of the absolute and relative (percentage) values for lymphocyte subsets found in the study groups are shown in Table 4. The absolute numbers sowed the same tendency that relative numbers. Lymphocyte subset percentages were not significantly different among the three groups of children except for T (CD3<sup>+</sup>) lymphocyte, where the percentage was significantly lower in WNI children in relation to WN children ( $61.0 \pm 3.7\%$  vs  $50.4 \pm 2.7\%$ ;  $p < 0.03$ ). CD4 and CD4/CD8 ratio seems to be lower in WNI and MNI children. Mean CD8<sup>+</sup> percentages were slightly higher in WNI and MNI as compared to the WN children. Mean NK cell (CD56<sup>+</sup>) percentages were similar between groups. In all cases there was not statistical difference.

On the other hand, the absolute and relative values for B lymphocyte (CD19<sup>+</sup>) were significantly higher in WNI ( $1658 \pm 177$  and  $33.1 \pm 1.8\%$ ;) as compared to MNI children ( $964 \pm 125$   $p < 0.005$ ;  $22.3 \pm 1.8\%$   $p < 0.0001$ ), to WN children only the mean percentage was different ( $23.5 \pm 1.4\%$   $p < 0.002$ ) (Table4).

**(Table 4)**

### **CD69 Antigen Expression**

Cells responding to mitogens are shown in Table 5. Mean percentage of all activated lymphocyte subsets was similar in MNI and non-infected WN children. However, when comparing WNI with WN children, the mean percentage of CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> ( $26.0 \pm 2.3\%$  vs  $18.3 \pm 2.6\%$ ;  $p < 0.03$ ) and CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> cells ( $12.2 \pm 1.2\%$  vs  $7.2 \pm 1.2\%$ ;  $p < 0.01$ ) were significantly higher in children suffering from infection. While mean CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> percentages were similar in both groups.

When comparing WNI with MNI children, was clear that the latter group showed impaired activation responses. Percentages of activated T cells (CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) were significantly lower in the MNI ( $16.4 \pm 1.3\%$   $p < 0.002$ ,  $7.7 \pm 0.7\%$   $p < 0.008$  and  $8.3 \pm 1.0\%$   $p < 0.02$ ) as compared to the WNI group ( $26.0 \pm 2.3\%$ ,  $13.9 \pm 1.8\%$  and  $12.2 \pm 1.2$ ). Nevertheless, the CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> percentages were similar in both groups.

**(Table 5)**

## **Lymphocyte Subsets and CD69 Antigen Expression According to the Infection Type and Severity of Malnutrition.**

CD3<sup>+</sup> percentages were significantly lower in WNI children with mixed infection ( $44.2 \pm 2.5\%$ ;  $p < 0.02$ ;  $n=7$ ) as compared to WNI with gastrointestinal ( $57.3 \pm 1.6\%$ ;  $n=3$ ) and respiratory ( $61.9 \pm 2.3\%$ ;  $n=2$ ) infections. The percentages of the other subpopulation showed no significant differences among WNI and MNI children with any infection type (data not shown).

B lymphocyte percentages (CD19<sup>+</sup>) were increased in WNI and decreased in MNI children regardless of different infection type. In the same way, the percentages of activated T lymphocyte subsets (CD69<sup>+</sup>) were lower in MNI than those showed in WNI children with different infections. In both cases non-significative difference was obtained.

The mean percentage of T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>) were significantly higher in children with marasmus ( $64.6 \pm 5.1\%$ ;  $n=7$ ,  $p < 0.02$ ) than in those with 2<sup>nd</sup> degree malnutrition ( $37.5 \pm 5.5\%$ ,  $n=4$ ) or kwashiorkor ( $39.9 \pm 4.9\%$ ,  $n=3$ ) children.

## **DISCUSSION**

Decrease in T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>) in WNI children agree with previous studies [23-25]. In addition, children with mixed infections show the greater reduction, suggesting that T lymphocytes decrease may be proportional to the illness severity. The increased percentage of CD8<sup>+</sup> and decreased CD4<sup>+</sup> lymphocytes found in WNI children, are similar to those of previous reports [26-28], although, in this study the difference among groups were not statistically significant.

Decrease in peripheral T cells (CD3<sup>+</sup>) in MNI have been previously reported,

showing decreased percentages of CD4<sup>+</sup> and increased percentages of CD8<sup>+</sup> cells as compared to WN children [6,29,30]. On the other hand, studies [10,11] and the results obtained in the present study showed no significant differences in T lymphocyte subsets among WN and MNI children. Moreover, our data show no differences in T lymphocyte subsets between WNI and MNI children. Nevertheless, the analysis according to the malnutrition type showed higher percentages of T lymphocyte in marasmus children. This increase may be related to the fact that these children have suffered from chronic malnutrition allowing the organism to adapt to this situation. This difference is an important finding that requires further studies including a greater number of patients.

Analyses of peripheral T lymphocyte subsets reflect the capability of immune system cells to move through the organism and arrive to the sites where they are needed. It seems that this is not affected in MNI, as their T lymphocyte subset were similar as those observed in WNI children.

Previous studies report that the percentage of B-lymphocytes is similar in malnourished and healthy children [6,29,31]. Recently, Rikimaru et al. [11] reports that the proportions of B cells were significantly lower in severely malnourished children than in the healthy children. Our data indicate that B-lymphocytes from WNI children showed an evident increase by infection. On the other hand, MNI children are unable of increasing their B-lymphocyte levels in response to an infection. This may be related to an impairment in T-cell to B cell co-operation, finally leads to humoral immune response impairment in these children.

The comparison of activated cells in MNI and WN children showed that only the active CD4<sup>+</sup> lymphocytes decreased significantly in the MNI group. It is of uttermost importance to compare the proportion of lymphocyte subsets in MNI and WNI children, as the latter show how they normally change in response to a bacterial infection.

Lymphocytes of malnourished children showed an impaired mitogen-induced response (lower percentage of CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) as compared to WNI children. This indicates that those cells are unable of initiating an activation process to respond a new “aggression” and to trigger effector mechanisms to eliminate it. It appears to be an important finding related to immunodeficiency in MNI children.

Since CD69 is indicator of activation initiation, further studies are required to establish if these cells are capable of differentiating and proliferating in a way.

Other authors had previously described a decreased response to mitogens of T cells from malnourished children [5,6,32], that agree with the data found here. Nevertheless, the data of this study not show a fraction with increased response to PHA found by González et al [8].

There are several possible factors altering the lymphocyte activation process in MNI children: incapability of specific antigen recognition at the T-cell receptor (TCR); lack of nutrients which would alter the production of new proteins needed to synthesise receptor surface molecules to trigger cell differentiation, or a combination of both mechanisms.

In conclusion, the results of this study complement previous studies of lymphocyte subpopulation and activation in malnutrition. It shows that the proportion of B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>) of malnourished children are altered, as this was the only lymphocyte subset clearly decreased as compared to WNI children. In addition, the activation capability of T lymphocyte subsets (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) is considerably decreased in malnourished children. These results suggest that the peripheral blood lymphocytes from malnourished children have a defect that alters their activation process and might explain some of the T immunoregulatory abnormalities observed in these children.

## REFERENCES

1. Cravioto MJ, Ortega ER, Arrieta MR. Desnutrición en la infancia. Chapter XXV. In: La nutrición y la salud de las madres y niños mexicanos. SSA, Fondo de Cultura Económica. Mexico 1990: 251-6
2. Chevalier P, Sevilla R, Zalles L, Sejas E, Belmonte G, Parent G, Jambon B. Immunonutritional recovery of children with severe malnutrition. *Sante* 1996; 6: 201-8
3. Bhaskaram P. Nutritional modulation of immunity to infection. *Indian J Pathol Microbiol* 1992; 35: 392-400.
4. Chandra RK. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 681-3.
5. Chowdhury FA, Miah RA, Begum M, Rahman M. The transformation in vitro of peripheral lymphocytes of malnourished children. *Bangladesh-Med-Res-Counc-Bull* 1993; 19: 67-70.
6. Chandra RK. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 126-32.
7. Ortiz R, Campos C, Gómez JL, Espinoza M, Ramos-Motilla M, Betancourt M. Sister chromatic exchange and cell proliferation in lymphocytes from infected and non-infected children with severe protein calorie malnutrition. *Mutation Res* 1994; 312: 33-7.
8. González C, Villaseñor I, Betancourt M. Cinética de proliferación celular de linfocitos de niños desnutridos. *Rev Inv Clín (Mexico)* 1990; 42: 18-22.
9. Ortiz R, Campos C, Gómez JL, Espinoza M, Ramos-Montilla M, Betancourt M. Effect of renutrition on the proliferation kinetics of PHA stimulated lymphocytes from malnourished children. *Mutation Res* 1995; 334: 235-41.

10. Ozkan H, Olgun N, Sasmaz E, Abacioglu H, Okuyan M, Cevik N. Nutrition, immunity and infection: T lymphocyte subpopulation in protein-energy malnutrition. *J Trop Pediatr* 1993; 39: 257-60.
11. Rikimaru T, Taniguchi K, Yartey JE, Kennedy DO, Nkrumah FK. Humoral and cell-mediated immunity in malnourished children in Ghana. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52: 344-50.
12. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 1994; 15: 479-83.
13. Amolot PL, Tahami F, Chinn D, Rawlings E. Activation antigen expression on human T cell. I. Analysis by two-colour flow cytometry of umbilical cord blood, adult blood and lymphoid tissue. *Clin Exp Immunol* 1996; 105: 176-82.
14. Maino VC, Suni MA. Rapid flow cytometry method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry* 1995; 20: 127-33.
15. Afeltra A, Galeazzi M, Sebastiani GD, Ferri GM, Caccavo D, Addressi MA, Marcolongo R, Bonomo L. Coexpression of CD69 and HLADR activation markers on synovial fluid T lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis: a three-colour cytometric analysis. *Int J Exp Path* 1997; 78: 331-6.
16. Krowka JF, Cuevas B, Maron DC, Steimer KS, Ascher MS, Sheppard HW. Expression of CD69 after in vitro stimulation: a rapid method for quantitating impaired lymphocyte responses in HIV-infected individuals. *J AIDS and Hum Retrovirology* 1996; 11: 95-104.
17. Allende LM, Corell A, Manzanares J, Madruga D, Marcos A, Madrono A, Lopez-Goyanes A, Garcia-Perez MA, Moreno JM, Rodrigo M, Sanz F, Arnaiz-Villena A. Immunodeficiency associated with anorexia nervosa is secondary and improves after refeeding. *Immunology* 1998; 94: 543-51
18. Johannisson A, Festin R. Phenotype transition of CD4+ T cells from CD45RA to CD45RO is accompanied by cell activation and proliferation. *Cytometry* 1995; 19: 343-52.

19. Mehta BA, Maino VC. Simultaneous detection of DNA synthesis and cytokine production in Staphylococcal enterotoxin B activated CD4+T lymphocytes by flow cytometry. *J of Immunol Methods* 1997; 208: 49-59.
20. Ramos-Galván R. Somatometría pediátrica. *Arch Inv Med (Mexico)* 1976; 6: 5
21. Strauss GHS. Non-random cell killing in criopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT) I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutation Res* 1991; 252: 1-5.
22. Games EJ, Palacios TJJ. *Introducción a la pediatría*. Mendez Editores 1995: 557-8.
23. Ganguly NK, Mahajan RC, Gill NJ, Koshy A. Kinetics of lymphocyte subpopulations and their functions in cases of amoebic liver abscess. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1981; 75: 807-10.
24. Ortiz-Ortiz L, Ruíz B, González A. Cellular immune responses. In: R. Kretchmer eds. *Amebiasis: Infection and disease by Entamoeba histolytic*. CRC-Press Inc, 1990:77-90.
25. Molbak K, Lisse IM, Aaby P. T-lymphocyte subsets and prolonged diarrhea in young children from Guinea-Bissau. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 79-84
26. Bova AJ, Mistschenko AS, Palacios MF, Estévez ME, Tirabochi NY, Sen L, Negroni R, Diez RA. Lymphocyte subpopulation and cytokine production in paracoccidioidomycosis. *Microbiol and Immunol* 1991; 35: 167-74.
27. Semba RD, Bulterys M, Munyeshuli V, Gatsinzi T, Saah A, Chao A, Dushimimana A. Vitamin A deficiency and T-cell subpopulation in children with meningococcal disease. *J Trop Pediatr* 1996; 42: 287-90.

28. Taniguchi K, Rikimaru T, Yartey JE, Akpedonu P, Armar-Klemesu MA, Nkrumah FK, Kamiya H, Kishi K, Armar DA. Immunological background in children with persistent diarrhea in Ghana. *Pediatr Int* 1999; 41: 162-7.
29. Parent G, Chevalier P, Zalles L, Sevilla R, Bustos M, Dhenin J M, Jambon B. In vitro lymphocyte-differentiating effects of thymulin (Zn-FTS) on lymphocyte subpopulations of severely malnourished children. *Am J Clinical Nutrition* 1994; 60: 274-8.
30. Betancourt M, González C, Ortiz R, Zumano E, Siller N, Espinoza M, Romero R. Peripheral lymphocyte subpopulation in children with severe malnutrition. *Med Sci Res* 1995; 23: 405-6.
31. Stiehm ER. Humoral immunity in malnutrition. *Federation Proceedings* 1980; 39: 3093-7.
32. Touraine JL, Gay G. Deficit immunitaire secondaire a la malnutrition. *Gastroenterol Clin Biol* 1981; 5: 835-8.

**Table 1. Characteristics of the well-nourished non-infected children.**

Sample	Age	Sex	Weight	Height
WN	(months)		(Kg)	(cm)
1	8	M	6.7	66
2	12	M	10.0	74
3	13	M	10.2	78
4	14	F	12.2	81
5	18	M	10.8	79
6	22	M	12.5	90
7	24	M	12.6	ND
8	29	M	12.5	88
9	36	M	14.7	ND
10	36	M	16.0	92

ND= not determined

**Table 2. Characteristics of the well-nourished infected children.**

Sample	Age	Sex	Weight	Height	Infection
WNI	(months)		(Kg)	(cm)	type
1	9	M	7.2	70	Gastrointestinal
2	13	M	9.2	77	Gastrointestinal
3	16	F	10.1	80	Gastrointestinal
4	7	M	7.0	ND	Mixed
5	7	M	6.5	70	Mixed
6	16	M	10.0	76	Mixed
7	18	M	9.9	78	Mixed
8	22	M	10.0	88	Mixed
9	31	M	11.6	91	Mixed
10	34	M	13.0	93	Mixed
11	9	M	9.0	71	Respiratory
12	10	F	7.5	71	Respiratory

ND = not determined. Mixed = gastrointestinal and respiratory infection

**Table 3. Characteristics of the malnourished infected children.**

Sample	Age	Sex	Weight	Height	Weight/Height	Malnutrition	Infection
MNI	(months)		(Kg)	(cm)	deficit (%)	type	type
1	6	M	5.4	67	29.4	2 <sup>nd</sup>	Respiratory
2	12	F	6.8	73	28.4	2 <sup>nd</sup>	Gastrointestinal
3	14	F	7.2	78	29.1	2 <sup>nd</sup>	Gastrointestinal
4	15	M	8.0	77	25.0	2 <sup>nd</sup>	Respiratory
5	6	M	4.1	61	41.1	Marasmus	Respiratory
6	10	F	4.6	72	48.6	Marasmus	Gastrointestinal
7	14	F	3.4	58	54.8	Marasmus	Mixed
8	17	F	7.2	769	40.0	Marasmus	Mixed
9	17	M	7.5	75	40.0	Marasmus	Gastrointestinal
10	18	M	6.3	79	43.0	Marasmus	Gastrointestinal
11	29	F	7.2	ND	47.7 <sup>*</sup>	Marasmus	Respiratory
12	10	M	6.0	74	36.3	Kwashiorkor	Gastrointestinal
13	12	M	6.8	69	25.1	Kwashiorkor	Mixed
14	24	M	11.4	81	2.3	Kwashiorkor	Mixed

\* Only weight deficit. Mixed = gastrointestinal and respiratory infection

**Table 4. Absolute ( per 10<sup>6</sup>/L, in bold) and relative (%) numbers of peripheral blood lymphocyte subsets in the three study groups. Data are expressed as mean ± S.E.**

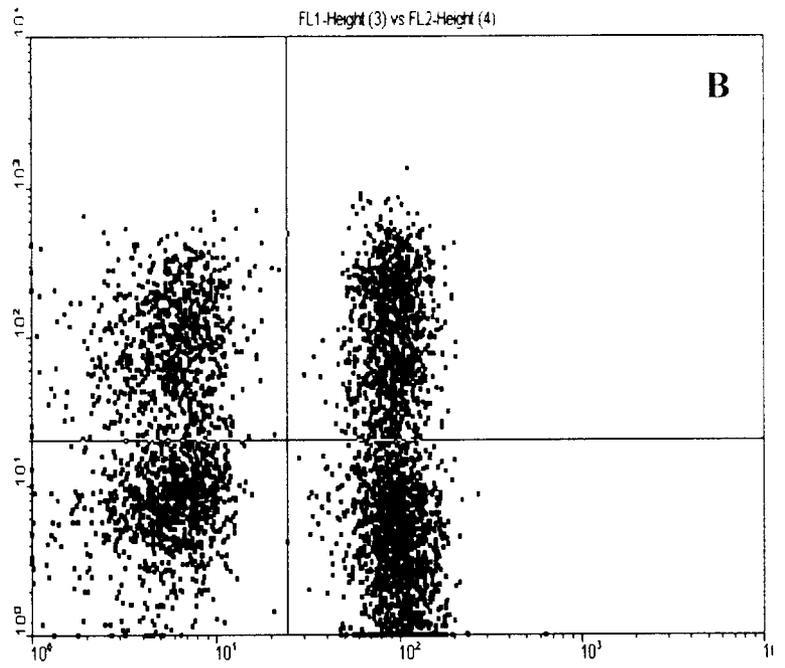
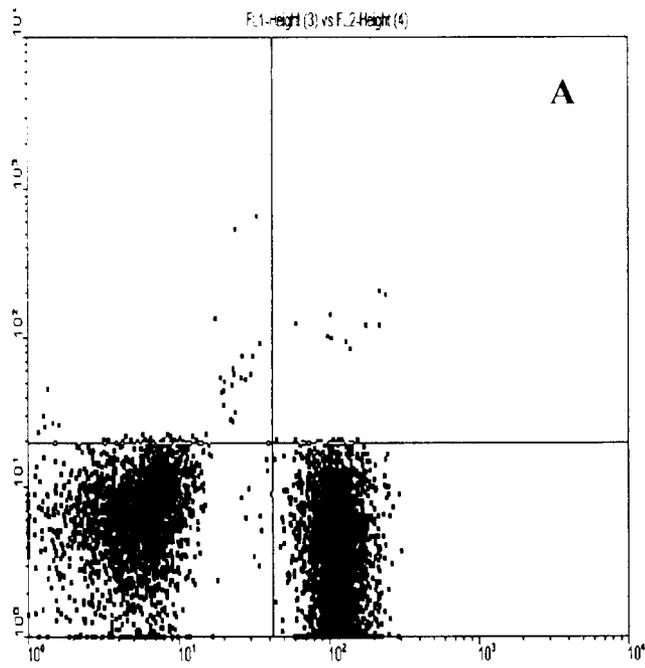
Cell type	WN (n=10)	WNI (n=12)	MNI (n=14)
CD3 <sup>+</sup>	61.0 ± 3.7 <b>3263 ± 319</b>	50.4 ± 2.7* <b>2541 ± 297</b>	49.4 ± 4.1* <b>2518 ± 507</b>
CD4 <sup>+</sup>	59.5 ± 2.7 <b>2012 ± 142</b>	55.5 ± 2.9 <b>1377 ± 187</b>	52.2 ± 3.6 <b>1122 ± 148</b>
CD8 <sup>+</sup>	29.8 ± 2.1 <b>1056 ± 174</b>	34.5 ± 2.6 <b>1180 ± 135</b>	37.5 ± 3.0 <b>1453 ± 447</b>
CD4/CD8	2.1 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.2
CD19 <sup>+</sup>	23.5 ± 1.4 <b>1360 ± 188</b>	33.1 ± 1.8* <b>1658 ± 177</b>	22.3 ± 1.8** <b>964 ± 125**</b>
CD56 <sup>+</sup>	10.1 ± 3.0 <b>499 ± 58</b>	8.9 ± 2.0 <b>494 ± 98</b>	9.1 ± 2.3 <b>477 ± 235</b>

\*Significant difference from WN group, CD3<sup>+</sup> WNI (p<0.03), CD3<sup>+</sup> MNI (p<0.05), CD19<sup>+</sup> (p<0.002). \*\* Significant difference from WNI group (p< 0.0001, relative numbers p<0.005, absolute numbers) .

**Table 5. Mean percentage of active peripheral lymphocyte subsets (CD69<sup>+</sup>) in the three different study groups.**

Cell group	WN (n=10)	WNI (n=12)	MNI (n=14)
CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	18.3 ± 2.6	26.0 ± 2.3*	16.4 ± 1.3**
CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	11.1 ± 1.7	13.9 ± 1.8	7.7 ± 0.7**
CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	7.2 ± 1.2	12.2 ± 1.2*	8.3 ± 1.0**
CD19 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	6.2 ± 0.8	7.4 ± 0.7	8.3 ± 1.3
CD56 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	5.0 ± 0.7	5.0 ± 0.7	4.0 ± 0.5

\*Significantly different as compared to the WN group, CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (p<0.03) and CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (p <0.01). \*\*Significantly different as compared to the WNI group, CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (p<0.002), CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (p<0.008) and CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (p<0.02).



FL1 H (FITC) CD4

Fig. 1. Representative flow cytometry analysis of T lymphocytes (gate in FL3). A) dot plot of unstimulated control, B) dot plot of activated sample. Lymphocytes expressing CD69 are show in the upper right quadrant of the dot plot.

## CD45RA and CD45RO isoforms in infected malnourished and infected well-nourished children

O. NÁJERA\*, C. GONZÁLEZ†, G. TOLEDO‡, L. LÓPEZ§, E. CORTÉS†, M. BETANCOURT† & R. ORTIZ¶  
\*Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Departamento de Atención a la Salud, †Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Departamento de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo, ‡Hospital Pediátrico Xochimilco, Departamento del Distrito Federal and §Hospital Pediátrico Iztapalapa, Departamento del Distrito Federal, México

(Accepted for publication 16 August 2001)

### SUMMARY

The aim of this study was to determine if the distribution *in vivo* of CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> (naive), CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> (Ddull) and CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (memory) lymphocytes differs in malnourished infected and well-nourished infected children. The expression of CD45RA (naive) and CD45RO (memory) antigens on CD4<sup>+</sup> lymphocytes was analysed by flow cytometry in a prospectively followed cohort of 15 malnourished infected, 12 well-nourished infected and 10 well-nourished uninfected children. Malnourished infected children showed higher fractions of Ddull cells (11.4 ± 0.7%) and lower fractions of memory cells (20.3 ± 0.7%) than the well-nourished infected group (8.8 ± 0.8 and 28.1 ± 1.8%, respectively). Well-nourished infected children showed increased percentages of memory cells, an expected response to infection. Impairment of the transition switch to the CD45 isoforms in malnourished children may explain these findings, and may be one of the mechanisms involved in immunodeficiency in these children.

**Keywords** CD4CD45RA CD4CD45RA/CD45RO CD4CD45RO malnutrition flow cytometry

### INTRODUCTION

In Latin America, protein-energy malnutrition (PEM) associated infections are considered as directly or indirectly responsible for one third of the deaths in children under 5 years of age [1]. It is well known that malnourished individuals are more susceptible to infection, and are thus considered immunodeficient [2–4]. The two major components of cause-specific mortality in malnourished children in developing countries are pneumonia and diarrhoea [5]. In a previous study, we found that all T lymphocyte subsets of malnourished children showed impaired activation capability *in vitro*, as CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> lymphocyte percentages were significantly lower in these children than those observed in well-nourished infected children [6].

As T lymphocyte subsets of malnourished children show an impaired response to mitogens *in vitro*, we considered it important to characterize CD4<sup>+</sup> T lymphocyte differentiation assessing the expression of different CD45RA and CD45RO antigen isoforms *in vivo*, in malnourished children. Hodge *et al.* in 1998 [7] reported that the CD45RA isoform is brightly expressed on

newborn naive T cells and the CD45RO isoform marks memory T cells, which respond to recall antigenic stimulation by proliferation and provide help activate for antigen-specific antibody synthesis. Naive cells acquire CD45RO and lose CD45RA expression, following *in vitro* antigenic stimulation [8–10]. Additionally these studies have shown that expression of dual positive CD45RA/CD45RO occurs after stimulation of adult T lymphocytes, before conversion to single CD45RO isoform expression. These cells have been shown to be important in the diagnostics and prognostics of several diseases [11–13].

The aim of this study was to determine if peripheral blood from malnourished infected children shows alterations to the *in vivo* distribution of CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>/CD45RO<sup>+</sup> lymphocytes as compared to well-nourished infected children.

### SUBJECTS AND METHODS

#### Subjects

The study groups consisted of 12 well-nourished infected (WNI) and 15 malnourished infected children (MNI) of both sexes who were inpatients at the Xochimilco and Iztapalapa Paediatric Federal District Department (DDF) Hospitals in Mexico City, suffering from severe bacterial infection: respiratory and/or gastrointestinal. The WNI children had normal weight and height

Correspondence: M en C. Oralia Nájera, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Departamento de Atención a la Salud, Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, A. P. 23–181, Coyoacán, 04960 México, D. F. México.

E-mail: onajera@cueyatl.uam.mx

according to age, from 7 to 34 months. Four children showed respiratory infections, three gastrointestinal and five both respiratory and gastrointestinal infections (mixed). The MNI group who were primary admitted for severe infections aged 6–24 months. Six children with second degree malnutrition (weight/height deficit >25% and <40% according to age). Nine with severe (third degree) malnutrition, six with marasmus showing severe weight/height deficit (>40% for age) and three with kwashiorkor, one showing only 2.3% weight/height deficit due to the presence of oedema. Three of these children had bacterial respiratory infection, seven gastrointestinal and five mixed infections. The severity of malnutrition was assessed on clinical signs and symptoms of malnutrition, as well as weight/height deficit according to the established values for Mexican children [14]. Bacterial infection was diagnosed rigorously on clinical data and laboratory routine tests. The children that were referred with viral infection or clinical suspicion of tuberculosis, cardiac diseases, or allergic diseases were excluded from the study. A group of 10 well-nourished uninfected children of both sexes who were outpatients at the same hospital were studied as controls. These children had normal weight/height ratios according to age. The study was approved by The Medical Ethics Committee of The General Direction of Medical Services (Federal District Department, Mexico).

#### Cell preparation and staining

Whole blood samples were collected using Vacutainer™ blood collection tubes (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ) with sodium heparin anticoagulant on the day of hospital admission and prior to treatment. The samples were processed on the day of collection. Cell viability was determined with double fluorescein diacetate and ethidium bromide staining [15]. More than 95% of the cells were viable. Lymphocyte subsets were determined using standard techniques for simultaneous, direct, 3-colour immunofluorescence staining [16] with minor modifications. Commercially conjugated antibodies to fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) and peridinin-chlorophyll protein (PerCP) dyes (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA) were used, including: (1) isotype control; (2) CD45 FITC/CD14 PE; (3) CD45 FITC/CD45RO PE; and (5) CD4 PerCP. Twenty microlitres of each monoclonal reagent pair were added to 100 µl of whole blood in 12 × 75 mm test tubes. Whole blood and monoclonal antibody mixture was gently stirred and incubated at room temperature for 20 min in the dark. Then, 2 ml of (X) FACs brand lysing solution was added and incubated for 10 min at room temperature in the dark. The cell suspension was centrifuged for 5 min at 300 × g, the supernate was aspirated and the pellet resuspended in 2 ml PBS, centrifuged 5 min at 200 × g, the supernate was aspirated and the pellet resuspended in 1% paraformaldehyde for fixation.

#### Flow cytometry analysis

Data were acquired with a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA). Instrument set-up was performed using CaliBRITE brand beads and AutoCOMP brand software. A minimum of 10 000 total events was acquired, using LYSYS II software and the LeucoGATE brand reagent (CD45/CD14) to establish an analysis gate including at least 95% of lymphocytes and no more than 5% of monocytes in the sample. Markers for determining positive and negative cells for reagents were set by LYSYS II software using

conjugated antibodies of irrelevant specificity as negative controls. Figure 1 shows how gates were set on the FSC-SSC to obtain all lymphocytes. FL3-SSC distribution for gate on CD4<sup>+</sup> cells, also a representative dot plot of the distribution of naive Ddull and memory cells. The absolute cells number (× 10<sup>6</sup>/l) for each lymphocyte subset was calculated by multiplying the corrected relative value by the total lymphocyte count.

#### Statistical analysis

Results are expressed as mean ± standard error, and compared using the ANOVA and nonparametric Wilcoxon/Kruskal-Wallis tests, with the JMP statistics program. Statistical significance was considered when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

#### Clinical characteristics on hospital admission

The WNI and MNI children with gastrointestinal and mixed infections showed diarrhoea, fever and several degrees of dehydration. Respiratory infection was associated with fever, cough and respiratory distress. Mean haemoglobin concentration was  $11.5 \pm 0.7$  g/l in WNI and  $8.6 \pm 1.0$  g/l in MNI children. Mean total leucocyte counts were as expected for age ( $9.03 \pm 1.6 \times 10^9$  and  $9.47 \pm 3.8 \times 10^9$  cells/l in WNI and MNI children, respectively). Circulating leucocyte counts showed  $55.11 \pm 10.6\%$  lymphocytes and  $43.78 \pm 10.3\%$  neutrophils in WNI children, and  $46.14 \pm 10.3\%$  lymphocytes and  $57.14 \pm 10.3\%$  neutrophils in the MNI group. These percentage values were slightly different to those expected for age [17].

#### Distribution of cells on RA/RO subsets

The mean percentages and absolute values of naive, memory and Ddull lymphocytes for each group and the results of the statistical analyses are presented in Table 1. In general, the distribution of absolute values for lymphocyte subsets showed the same tendency as relative values. CD45RA<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> surface antigen expression on nonactivated peripheral lymphocytes showed no significant differences among the three groups. The mean CD45RA<sup>+</sup> (naive) cells were  $75.3 \pm 2.8\%$  in WN,  $77.3 \pm 1.3\%$  in WNI and  $72.6 \pm 2.3\%$  in MNI children. The mean CD45RO<sup>+</sup> (memory) cells were  $13.6 \pm 1.8\%$ ,  $11.1 \pm 1.2\%$  and  $11.5 \pm 1.0\%$  in WN, WNI and MNI children, respectively, and the mean CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> (Ddull) cells were  $7.5 \pm 1.4\%$ ,  $5.5 \pm 0.5$  and  $7.0 \pm 0.9\%$  in the WN, WNI and MNI groups, respectively.

The contrast of CD45RA and CD45RO isoform expression on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in the WN and WNI groups showed that the mean CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> cells were significantly lower in WNI ( $62.3 \pm 1.7\%$ ) than in WN children ( $71.4 \pm 1.9\%$ ;  $P < 0.02$ ), while the mean CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells were higher in WNI ( $28.1 \pm 1.8\%$ ) than in WN children ( $19.4 \pm 1.5\%$ ,  $P < 0.005$ ). No significant difference between well-nourished groups in CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> cells was detected ( $8.8 \pm 0.8\%$  versus  $8.8 \pm 1.0\%$ , respectively).

The comparison of CD45RA<sup>+</sup> antigen expression on CD4<sup>+</sup> lymphocytes in WNI and MNI children showed no significant differences ( $62.3 \pm 1.7\%$  versus  $68.2 \pm 2.2\%$ , respectively). However, WNI children showed significantly higher CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cell fraction than in MNI children ( $28.1 \pm 1.8\%$  versus  $20.3 \pm 1.7\%$ ,  $P < 0.005$ ). The mean CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> cells were significantly lower in

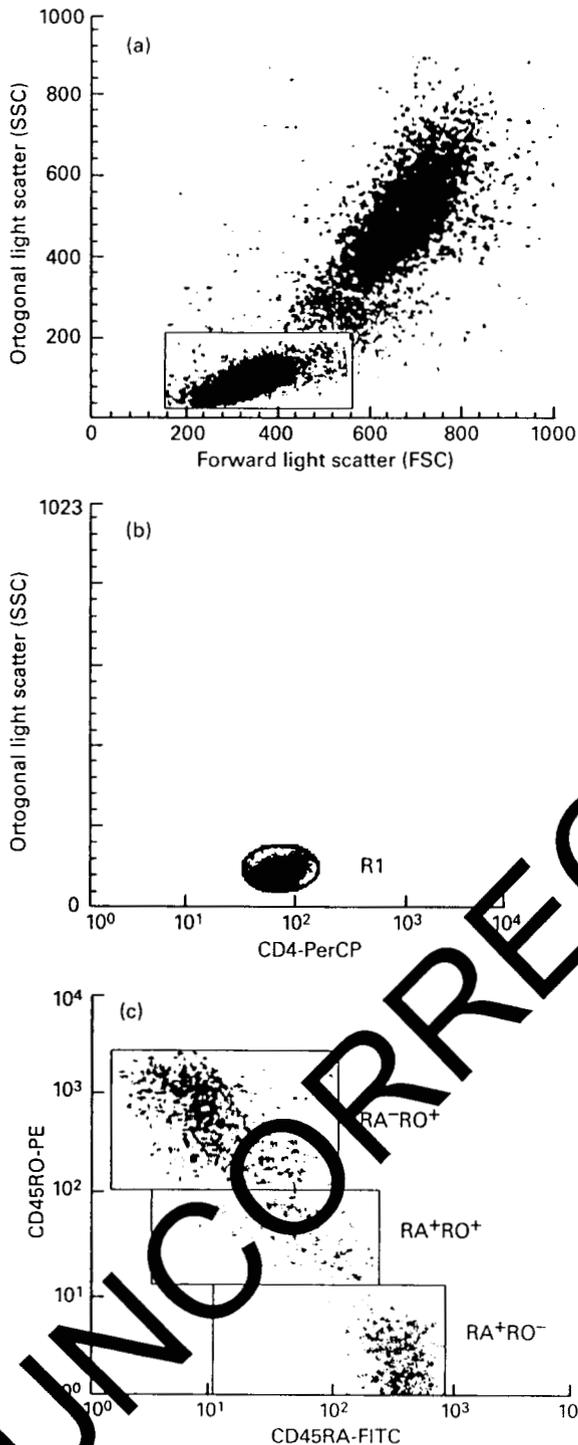


Fig. 1. (a) The lymphocyte gate set in the FSC–SSC distribution. (b) The FL3–SSC distribution, the (R1) gate was set on to restrict the analysis to CD4 positive cells. (c) The FL1–FL2 distribution on the cells passed by the window of (a) for all lymphocytes or by the window of (b) to restrict the analysis on the RA/RO phenotype to CD4 positive cells. FL1 = CD45RA-FITC; FL2 = CD45RO-PE; FL3 = CD4-PerCP.

**Table 1.** Percentage and absolute (per 10<sup>6</sup>l, in bold) numbers of peripheral blood naive, memory and Ddull lymphocyte subsets in well-nourished (WN), well-nourished infected (WNI) and malnourished infected (MNI) children

Cell type	WN (n = 10)	WNI (n = 12)	MNI (n = 15)
CD45RA <sup>+</sup>	75.3 ± 2.8	77.3 ± 1.3	72.6 ± 2.3
CD45RO <sup>+</sup>	<b>3535 ± 444</b>	<b>3560 ± 280</b>	<b>2728 ± 211</b>
CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	577 ± 68	<b>472 ± 45</b>	<b>430 ± 70</b>
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>	7.5 ± 1.4	5.5 ± 0.5	7.1 ± 0.9
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	<b>301 ± 45</b>	<b>242 ± 29</b>	<b>177 ± 54</b>
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	71.4 ± 1.9	62.3 ± 1.7*	8.2 ± 2.2
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	<b>3339 ± 401</b>	<b>2756 ± 246</b>	<b>2211 ± 129</b>
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	19.4 ± 1.5	28.1 ± 1.8*	30.5 ± 1.7**
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	<b>778 ± 115</b>	<b>1297 ± 119*</b>	<b>111 ± 119**</b>
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	8.8 ± 1.0	8.8 ± 0.8	1.4 ± 0.7**#
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	<b>376 ± 37</b>	<b>414 ± 40</b>	<b>509 ± 52</b>

Data are expressed as mean ± s.d.  
\*Significant difference from WN group, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> ( $P < 0.02$ ), CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> ( $P < 0.005$  relative and  $P < 0.01$  absolute values), CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> MNI ( $P < 0.02$ ).  
\*\*Significant difference from WNI group, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> ( $P < 0.005$  relative and  $P < 0.01$  absolute numbers), CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> ( $P < 0.02$ ).

WNI than MNI children ( $8.8 \pm 0.8\%$  versus  $11.4 \pm 0.7\%$ ,  $P < 0.02$ ), similar data were observed in WN than in MNI children ( $8.8 \pm 1.0\%$  versus  $11.4 \pm 0.7\%$ ,  $P < 0.02$ ).

The analysis of CD45 isoform expression in children with different types of infection revealed significant differences only in the CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells, which was higher in WNI children with mixed infections ( $31.0 \pm 3.6\%$ ,  $n = 5$ ) than in MNI children with mixed infections ( $19.0 \pm 3.0\%$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ). Furthermore, isoform expression analysis of children with different types and degree of malnutrition showed differences only in the CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> fraction, which was higher in children with second degree malnutrition ( $13.4 \pm 1.0\%$ ,  $n = 6$ ) as compared to marasmus children ( $8.9 \pm 1.0\%$ ,  $P < 0.02$ ,  $n = 6$ ), whose CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> cells were closer to that of WNI children.

## DISCUSSION

We analysed the expression of CD45RA, CD45RO and CD45RA/CD45RO antigens in all lymphocytes and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in WN, WNI and MNI children in order to identify possible infection-related and malnutrition-related alterations. In general, malnourished children had severe infections, therefore the inclusion of a group of well-nourished infected children also hospitalized by severe infections was considered important. This group may indicate changes in CD45 isoforms related to infections.

The analysis of CD4<sup>+</sup> T cells revealed that the presence of infection in WN children decreased the peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> cells and increased the CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, while the CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> cells remained unaltered in relation to WN non-infected children. This sequence of events is expected, as it is known that CD45RA<sup>+</sup> (naive) cells are Q3

transformed to CD45RO<sup>+</sup> (memory) cells as a response to an antigenic stimulus by an infective organism. This has been observed in *in vitro* stimulation studies [9,10]. Specific infection diseases have shown alterations at the same level *in vivo*. Patients with tuberculosis showed higher CD45RO<sup>+</sup> T cells in pleural fluid [18]; in patients with chronic hepatitis, within hepatic tissue the CD45RO expression was greater than that of the CD45RA isotype [19]. In severe pneumonia after activation-induced was reported higher proportion of CD45RO<sup>+</sup> T cells, than that in healthy volunteers [20]. In this study, we made nonspecific bacteriologic determination in infected children, but in previous studies it has been established that enteropathogens most frequent in Mexican children are: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* (enteropathogenic) and *Campylobacter* spp. [21,22]. The most commonly isolated bacteria from invasive respiratory infections are *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* in Mexico [23,24].

The comparative analysis of MNI and WN children showed differences only in the proportion of CD4<sup>+</sup> Ddull cells, which were higher in MNI children. However, the comparison between WNI and MNI groups revealed differences that may be related to malnutrition: increase of peripheral CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> cells and decrease of CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells, as compared to the response observed in WNI children.

The results obtained in this study may indicate that the fraction of Ddull lymphocytes was raised in peripheral blood because they are unable to transform to memory cells. It is known that Ddull cells are transient. In cellular activation they are going from strongly positive at 48 h and after cultured for 72 h this population loss CD45RA<sup>+</sup> [25]. However, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> cells kept in culture for prolonged periods (14 days) did not switch to CD45RO expression in absence of stimulation of the T-cell receptor. These cells maintained stable expression of both CD45RA and CD45RO isoforms but a small subset reexpress the CD45RA isoforms, and a fraction of the CD45RO cells may gain a Ddull phenotype in the absence of T-cell receptor crosslinking [26]. Moreover, there is evidence that Ddull cells have the capacity to provide help for B cells containing antigen-specific precursor cells, although the concentration of secreted immunoglobulins reached only about half that of that in the presence of CD45RO cells [26].

The increased proportion of CD4<sup>+</sup> Ddull cells and the decrease of CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells in MNI children may be due to an alteration in the switch from the Ddull to memory cells and/or that the CD45RO cells may reexpress a Ddull phenotype. There are several possible factors that may contribute to alter this process in MN children: inability of specific antigen recognition at the T-cell receptor (TCR); lack of nutrients which would alter the production of new proteins needed to synthesize surface receptor to trigger cell differentiation; or a combination of both mechanisms may explain the immunosuppression in malnourished children.

Several reports have indicated that the immune system impairment in severe malnourished children may be related mainly to the altered physiology of lymphocytes, rather than to a fall in the number of peripheral blood T lymphocyte subpopulations. It has been suggested that these are unable to secrete normal quantities of lymphokines which mediate and regulate differentiation, activation and proliferation of lymphocytes to achieve an adequate immunological function [27]. In addition, an impaired early activation of CD4 and CD8 T lymphocytes of malnourished children has been detected [6]. Moreover, in relation to the

proliferation kinetics of lymphocytes from malnourished children a faster response was found at 48 h of culture. Nevertheless, this initial efficiency response did not persist additionally; a lower proportion of actively proliferating lymphocytes had been detected at 72 h of culture in these children [28,29].

According to the degree of malnutrition the analysis showed a higher percentage of CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> cells in children with second degree malnutrition as compared to marasmus children whose were similar to WNI children. This may be related to the fact that marasmus children have suffered from chronic malnutrition allowing the organism to adapt to this condition. Moreover a previous report concludes that most malnutrition-related deaths are attributable to second degree malnutrition rather than to severe malnutrition [30]. Differences observed between degrees of malnutrition are important findings that require further studies including a greater number of patients.

We found no studies on Ddull and memory cells in malnourished children. In mice, malnutrition may change the ratio of naive to memory cells by increasing naive T lymphocytes population in splenic [31], as well as in mesenteric lymph nodes and whole blood [32]. In the same way, increased naive CD45RA<sup>+</sup> cells with a parallel decrease in memory CD45RO<sup>+</sup> T cells have been observed in elderly humans with severe malnutrition compared to healthy elderly subjects [33]. In this study, we did not find differences in total lymphocyte CD45RA isoforms when comparing WN and MNI children, although the latter group showed a no significant decrease of the CD45RO<sup>+</sup> cells.

In other immunodeficiency diseases it has been demonstrated that the CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> fraction was lower than in healthy individuals [34] or higher levels of CD4<sup>+</sup> Ddull cells [35]. In addition, the role of these cell subsets in the development of bone marrow transplantation has been studied [36].

Naive and memory on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes have been analysed in different infectious diseases, and has proved to be of prognostic value in certain infections such as HIV [37,38]. CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> isoforms expression is a test which can be used *in vivo* for screening and monitoring of infection in the newborn [8,39].

The data obtained in our work indicate that the analysis of CD45RO and CD45RA/CD45RO expression on CD4<sup>+</sup> lymphocytes is a valuable immunosuppression test in malnutrition. This sort of analysis in malnourished infected children may help to understand the mechanisms of immunodeficiency in malnutrition. Further studies using *in vitro* activation and other surface antigens may be necessary to analyse this finding.

In conclusion, the results obtained in this study show that CD4<sup>+</sup> lymphocytes of well-nourished infected children show adequate differentiation capability, as the CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (memory) cell fraction increased and the CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (naive) cell decreased in peripheral blood. In contrast, CD4<sup>+</sup> lymphocytes of malnourished children are unable to achieve adequate memory cell fractions to provide protection against external antigens and to provide helper activity for antigen-specific antibody synthesis. These alterations contribute to understanding the mechanisms of immunodeficiency observed in malnourished children.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by CONACYT, México grants 3005P-M9606, F282-M-9208 and 114128/114816, and FOMES, México grant 98-35-28.

REFERENCES

- Cravioto MJ, Ortega ER, Arrieta MR. Desnutrición en la infancia. In: La nutrición y la salud de las madres y niños mexicanos, Chapter XXV. México: SSA, Fondo de Cultura Económica, 1990:251-6.
- Chandra RK. Nutrition and immunity: lesson from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr* 1991; **53**:1087-101.
- Bhaskaram P. Nutritional modulation of immunity to infection. *Indian J Pathol Microbiol* 1992; **35**:392-400.
- Chevalier P, Sevilla R, Zalles L, Sejas E, Belmonte G, Parent G, Jambon B. Immuno-nutritional recovery of children with severe malnutrition. *Santé* 1996; **6**:201-8.
- Yoon PW, Black RE, Moulton LH, Becker S. The effect of malnutrition on the risk of diarrheal and respiratory mortality in children < 2 y of age in Cebu, Philippines. *Am J Clin Nutr* 1997; **65**:1070-7.
- Nájera O, González C, Toledo G, Cortés E, López L, Betancourt M, Ortiz R. Early activation of T, B and NK lymphocytes in infected malnourished and infected well-nourished children. *J Nutr Immunol* 2001; **XXX**:XXX-X, in press.
- Hodge S, Hodge R, Flower R, Han P. Surface activation markers of T lymphocytes: role in the detection of infection in neonates. *Clin Exp Immunol* 1998; **113**:33-8.
- Osugi Y, Hara J, Kurahashi H *et al*. Age-related changes in surface antigens on peripheral lymphocytes of healthy children. *Clin Exp Immunol* 1995; **100**:543-8.
- Fahey JL, Schnelle JF, Boscardin J, Thomas JK, Gorre ME, Aziz N, Sadeghi H, Nishanian P. Distinct categories of immunologic changes in frail elderly. *Mech Ageing Dev* 2000; **115**:1-20.
- Amolot PL, Tahami F, Chinn D, Rawlings E. Activation antigen expression on human T cells. I. Analysis by two-colour flow cytometry of umbilical cord blood, adult blood and lymphoid tissue. *Clin Exp Immunol* 1996; **105**:176-82.
- Plaeger-Marshall S, Hultin P, Bertolli J *et al*. Activation and differentiation antigens on T cells of healthy, at-risk and HIV-infected children. *J AIDS* 1993; **6**:984-93.
- Sing G, Butterworth L, Chen X, Bryant A, Cooksley G. Composition of peripheral blood lymphocyte populations during different stages of chronic infection with hepatitis B virus. *J Viral Hepatitis* 1998; **5**:93-93.
- Pawlik I, Mackiewicz U, Lacki JK, Wirtorowicz K, Kony J. The differences in the expression of CD45 isoforms on peripheral blood lymphocytes derived from patients with seasonal or perennial atopic allergy. *Tohoku J Exp Med* 1997; **182**:1-8.
- Ramos-Galván R. Somatometría Pediátrica. *Arch Inv Med (México)* 1976; **6**:5.
- Strauss GHS. Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of lymphocyte tests (BLT) I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutation Res* 1999; **252**:1-5.
- Kotylo PK, Fineberg NS, Freeman KS, Edmond NI, Charland C. Reference ranges for lymphocyte subsets in paediatric patients. *Am J Clin Pathol* 1993; **100**:111-11.
- Games EJ, Palacios TJL. Introducción a pediatría. México: Mendez Editores, 1995: 67-8.
- Montes J, Jambon B, Deza J, Pacheco M, Cerdá T. Linfocitos T de memoria durante infección y enfermedad tuberculosa. *Arch Broncopulmonol* 1998; **34**:384-7.
- Kore S, Galetta V, Piazzolla G, Angarano I, Jirillo E, Schiraldi O, Antonucci M. CD45RA and CD45RO isoforms expression on intrahepatic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *Microbios* 1997; **92**:73-82.
- Kodera T, Iwagaki H, Miromoto Y, Kobashi K, Hizuta A, Tanaka N. Involvement of apoptosis in activation-induced cell death of bacterial-reactive human CD45RO+ T cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1999; **104**:205-18.
- Olarte J. El laboratorio de bacteriología intestinal del Hospital Infantil de México contribuciones acerca de la etiología de la diarrea aguda. *Bol Med Hospital Infant Mex* 1997; **54**:591-5.
- Pérez MA, Mejía AE. Evolución temporal del patrón de aislamiento de enteropatógenos en diarrea aguda. *Bioquímica* 1998; **23**:873-7.
- López-Antuñano FJ, Silva-Sánchez J. Bacterial resistance to antibiotics in acute respiratory infections (ARIs). *Arch Med Res* 1997; **28**:195-203.
- Spiritus EM. Diagnóstico y tratamiento de infecciones agudas en vías respiratorias inferiores. *Infectología* 1994; **14**:517-24.
- Johannisson A, Festin R. Phenotype transition of CD4<sup>+</sup> T cells from CD45RA to CD45RO is accompanied by cell activation and proliferation. *Cytometry* 1995; **19**:343-52.
- Hamann D, Baars PA, Hooibrink B, van Lier RAW. Heterogeneity of the human CD4<sup>+</sup> T-cell population: two distinct CD4<sup>+</sup> T-cell subsets characterised by coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms. *Blood* 1996; **88**:3513-21.
- González C, Rodríguez L, Bonilla E, Betancourt M, Siller N, Zumárrigo E, Ortiz R. Electrophoretic analysis of plasmatic and lymphocyte secreted proteins in malnourished children. *Med Sci Res* 1997; **25**:643-6.
- Ortiz R, Campos C, Gómez JL, Espinoza M, Ramos-Motilla M, Betancourt M. Sister chromatid exchange and cell proliferation in lymphocytes from infected and non-infected children with severe protein-calorie malnutrition. *Mutation Res* 1997; **312**:33-7.
- Ortiz R, Campos C, Gómez JL, Espinoza M, Ramos-Motilla M, Betancourt M. Effect of refeeding on the proliferation kinetics of PHA stimulated lymphocytes from malnourished children. *Mutation Res* 1995; **334**:235-41.
- Pelletier DI, Frydell EA, Schröder DG, Habicht J-P. Efectos de la malnutrición en la mortalidad de menores de 5 años en países en desarrollo. *Bol Oficina Sanit Panam* 1996; **120**:425-32.
- Woodward BB, Bezanah KD, Hillyer LM, Lee WH. The CD45 RA+ (quiescent) cell phenotype is overabundant: relative to the CD45 RO+ phenotype within the involuted splenic T-cell population of weaning mice subjected to wasting protein-energy malnutrition. *J Nutr* 1995; **125**:771-82.
- 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.
- Lesourd BM, Mazari L. Immune response during recovery from protein-energy malnutrition. *Clin Nutr* 1997; **16**:37-46.
- Crockard AD, Boyd NAM, McNeil TA, McCluskey DR. CD4 lymphocyte subset abnormalities associated with impaired delayed cutaneous hypersensitivity reactions in patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 1992; **88**:29-34.
- Kretowski A, Mysliwiec J, Turowski D, Wysocka J, Kinalska I. Analysis of recently activated, memory and naive lymphocyte T subsets in the peripheral blood of patients with Graves' disease and insulin-dependent diabetes mellitus. *Med Bialymst* 1999; **44**:226-34.
- de Vries E, van Tol MJ, van de Bergh RE, Waaijer JL, ten Dam MM, Hermans J, Vossen JM. Reconstitution of lymphocyte subpopulations after paediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; **25**:267-75.
- Benito JM, Zabay JM, Gil J, Bermejo M, Escudero A, Sánchez E, Fernández-Cruz. Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR and CD25 antigens. *J AIDS Human Retrovirol* 1997; **14**:128-35.
- Ullum H, Cozzi LA, Victor J, Skinhoj P, Philips AN, Klarlund PB. Increased losses of CD4CD45 cells in late stages of HIV infection is related to increased risk of death: evidence from a cohort of 347 HIV-infected individuals. *AIDS* 1997; **11**:1479-89.
- Bruning A, Daiminger A, Enders G. Diagnostic value of CD45RO expression on circulating T lymphocytes of fetuses and newborn infants with pre, peri or early post-natal infections. *Clin Exp Immunol* 1997; **107**:306-11.

Q13



## La desnutrición en México: revisión de los programas gubernamentales y los estudios diagnósticos de alcance nacional

Oralia Nájera-Medina<sup>1</sup>, Cristina González-T.<sup>2</sup>, Miguel Betancourt-R.<sup>2</sup>, A. Rocío Ortiz- M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Atención a la Salud, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco; <sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, D. F., México.

### Resumen

En este trabajo se presenta una revisión documental sobre 2 aspectos relacionados con la desnutrición en México: los programas gubernamentales diseñados para abatir el problema, y los estudios diagnósticos de alcance nacional. Uno de los principales datos que aportan las encuestas es que la desnutrición no se distribuye de manera homogénea en México, las regiones de menor desarrollo en los estados del sur y sureste presentan los índices de mayor prevalencia. La gravedad de la desnutrición en el país influyó en el surgimiento de programas a nivel nacional: SAM, IMSS-COPLAMAR, PRONASOL y PROGRESA principalmente. Los resultados de las encuestas indican que los programas han sido insuficientes para resolver el problema de la desnutrición en México. Se concluye que es necesario continuar en el futuro con las encuestas nacionales sobre desnutrición, las cuales permiten evaluar los programas gubernamentales. Se propone que los programas sean más ambiciosos y apegados a la realidad social de las comunidades que sufren sus efectos.

**Palabras clave.** Desnutrición; encuestas nacionales; programas gubernamentales.

Solicitud de sobretiros: Dra. Oralia Nájera Medina, Departamento de Atención a la Salud, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calz. del Hueso No. 1 100, Col. Villa Quietud, Deleg. Coyoacán, C. P. 04960, México, D. F., México.

Fecha de recepción: 07-08-2000.

Fecha de aprobación: 14-11-2000.



La desnutrición en niños preescolares en México es un problema de salud pública que persiste a pesar de las acciones gubernamentales para combatirla. Resulta paradójico que con la gran cantidad de conocimientos adquiridos en diferentes campos relacionados con el problema, no ocurra una clara disminución de los niveles de desnutrición, los cuales continúan siendo críticos en ciertas regiones del país.

En este trabajo se hace una revisión de los distintos enfoques en las políticas nacionales de alimentación, salud y diagnóstico relacionadas con el problema. En el trabajo no se abordan con detalle los trabajos de carácter clínico, ni los estudios experimentales; esta temática fructífera en resultados, merece otro tipo de análisis y metodología diferente al enfoque histórico-social adoptado en el presente ensayo.

La revisión analiza trabajos con enfoque similar, que centran su atención en la observación de períodos relativamente cortos (sexenios, por ejemplo) o bien estudios diagnósticos basados en encuestas nacionales o regionales. El presente ensayo se propone sintetizar las principales políticas gubernamentales implementadas después del período revolucionario, a fin de contar con un panorama de cómo han evolucionado las tendencias estadísticas nacionales sobre desnutrición.

### Los trabajos pioneros

Antes de la década de los cuarenta, a la desnutrición en la población infantil se le designaba con diferentes términos y cuadros clínicos. Se conocía que su incidencia era alta y que era la responsable directa o indirecta de la morbi-mortalidad infantil, pero no se tenían estadísticas precisas de su magnitud.

Una de las primeras contribuciones encaminadas a comprender el problema de la desnutrición es la de Patrón-Correa, quien en 1930 describió las características clínicas de los niños que presentaban una entidad nosológica que después fue denominada kwashiorkor,<sup>1</sup> haciendo referencia a la dieta como causa de esta enfermedad. Previo a este

trabajo, existe una descripción clínica de este mismo síndrome, realizada en 1865 por Hinojosa F., la cual ofrece una visión de la etiopatogenia y señala las zonas de prevalencia del kwashiorkor en el Distrito Federal (DF).<sup>2</sup>

En 1946 Gómez<sup>3</sup> definió y estableció el término de desnutrición: “para toda pérdida de peso del organismo, desde la más ligera hasta la más grave, sin prejuzgar lo avanzado del mal”. Así mismo simplificó la terminología y fundó las bases de la clasificación clínica de la desnutrición. De esta forma llamó “desnutrición de primer grado a toda pérdida de peso menor de 25% que el paciente debería tener para su edad; segundo grado a la pérdida de peso que fluctúa entre 25 y 40% y tercer grado a la pérdida del peso más allá de 40%”, y además describió el cuadro clínico de cada grado de desnutrición. Por las ventajas de esta clasificación, ha sido utilizada internacionalmente.

Gómez<sup>3</sup> también definió las causas de la desnutrición, señalando que en 90% de los casos se debe a subalimentación del sujeto, bien sea por la calidad o por la cantidad de los alimentos consumidos, donde la pobreza, la ignorancia y el hambre juegan un papel importante y se disputan la primacía de la causalidad. También señaló que “la infección prolongada conduce a la desnutrición y la desnutrición prolongada, por su parte, expone al organismo a la invasión fácil de las infecciones”. Otras de sus contribuciones fueron las bases del tratamiento de estos niños de acuerdo al grado de desnutrición.

Desde finales de los años cuarenta se suscitó interés por conocer el contenido de proteínas de los alimentos más consumidos por la población, sobre todo del medio rural que estaba basada en el maíz y frijol, encontrándose que las proteínas de origen vegetal son deficientes en cuatro aminoácidos esenciales: el triptófano, la metionina, la lisina y la treonina; y en algunas ocasiones también la valina se presenta en cantidades pequeñas, por lo que se les consideró como alimentos de baja calidad proteica.<sup>4,5</sup> También se realizaron estudios bromatológicos de alimentos de uso regional en zonas indígenas, como especies de chapulines,

gusanos como el de maguey, chumiles, etc., que registraron contenidos notables de proteínas, niacina, riboflavina, calcio, fósforo, hierro y otros elementos nutricios que los catalogó como alimentos valiosos.<sup>6</sup>

En investigación básica se estudió la trascendencia biológica de la desnutrición a fin de poder explicar las características clínicas de los pacientes, iniciándose estudios para valorar el sistema inmune de estos enfermos: respuesta a antígenos, niveles de inmunoglobulinas, entre otros;<sup>7,8</sup> también se realizaron trabajos para valorar la actividad enzimática del contenido duodenal,<sup>9</sup> se evaluó el metabolismo de proteínas, de carbohidratos, composición de agua y electrolitos y mecanismos homeostáticos en la desnutrición grave.<sup>10,11</sup>

### Las primeras encuestas sobre desnutrición

Dentro de las grandes acciones del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), destaca la realización de encuestas a nivel nacional con el objetivo de detectar los estados y/o regiones más afectados por la desnutrición y para definir y entender sus causas o detectar la población en riesgo nutricional. Estos trabajos se realizaron con la colaboración de organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro Regional de Educación Fundamental para América Latina (CREFAL) de la UNESCO. Entre 1958 y 1962 se levantaron las primeras encuestas nutricionales en comunidades rurales, semirurales, suburbanas y barrios populares del DF. Dichas encuestas incluyeron datos sobre hábitos de alimentación, factores socioeconómicos y dentro de la evaluación del estado nutricional de preescolares, escolares y adultos se tomaban en cuenta los datos clínicos, medidas antropométricas, exploración física y exámenes de laboratorio, como biometrías hemáticas.<sup>12</sup>

Con las encuestas del INNSZ, en 1960 se logró definir a nivel nacional la disponibilidad de alimentos, la disponibilidad media de alimentos por habitante y la disponibilidad de nutrientes

más consumidos en el país: cereales, granos, raíces, verduras y frutas. Los resultados de estos estudios eran optimistas dado que si se comparaba la disponibilidad de alimentos con las necesidades medias de la población se observaba que la primera superaba ligeramente las segundas; sin embargo, la realidad era otra, mientras que en las ciudades se consumían leche y carne, en el medio rural se carecía de estos productos.<sup>5,13</sup> Una conclusión fundamental fue que los niveles de nutrición se relacionan más con los niveles socioeconómicos que con zonas geográficas, la cultura regional y otros factores que habían sido considerados.

El problema más grave de desnutrición se localizó en el sur y el sureste del país, después en la zona centro y en las costas, mientras que en el norte del país el problema era menor. En las zonas rurales la desnutrición presentaba índices más altos que en las zonas urbanas. Sin embargo fue clara la necesidad de buscar otros indicadores de salud para poder ubicar las áreas con mayor problema de desnutrición, tales como la correlación con el consumo de proteínas, datos de crecimiento físico de la población y algunos datos culturales como los índices de analfabetismo.<sup>12,14</sup>

Dentro de estos estudios se identificaron en general tres dietas predominantes a las cuales se les denominó: a) la indígena (a partir de maíz y frijol); b) la mestiza (además de maíz y frijol se agrega café, pan, pastas o arroz y carne) y c) la dieta de la clase media y alta con influencia de otras culturas, sobre todo la occidental (incluye una gran variedad de alimentos entre verduras, frutas, carne y leche). Los datos sobre las dietas de las zonas semirurales y de las zonas urbanas del DF sirvieron para trazar una curva descendente en el consumo de maíz y frijol, y dibujar una curva ascendente en el consumo de productos de origen animal.<sup>5</sup>

Para mediados de los años sesenta se hablaba de 58 encuestas realizadas en todo el país que habían incluido datos socioeconómicos, clínicos y dietéticos; 14 estudios experimentales y de larga duración que permitieran evaluar programas apli-

cados que se estaban desarrollando como el de prevención de pelagra, seguimiento del crecimiento y desarrollo y determinación por medio de bromatología de los nutrientes de la dieta.<sup>5</sup> Se dividió el país en zonas y se midió el consumo calórico-proteico de cada una y se hicieron estudios de grupos específicos: lactantes, madres lactantes, madres embarazadas, mujeres adultas y hombres adultos. Muchos de estos trabajos fueron enfocados a zonas rurales principalmente indígenas.<sup>15,16</sup>

La cuantificación del consumo calórico en los lactantes incluyó el peso del niño antes y después de cada tetada; la alimentación complementaria pesando el alimento antes de ingerirse y los desperdicios después de consumirse. La leche materna se obtuvo y se remitió al laboratorio para determinar sus nutrientes. Con estos datos se corroboraron los ya señalados anteriormente sobre las zonas más afectadas y de los grupos estudiados, los preescolares resultaron ser los más afectados, el medio rural sólo alcanzó 65% de las proteínas recomendadas para su edad. También se encontró 39% de desnutrición de II y III grado en la zona sureste y de 36% en el sur del país para estos mismos tipos de desnutrición.<sup>5,17</sup>

Paralelamente al desarrollo del mapa de la desnutrición en México elaborado por el INNSZ se iniciaron trabajos comunitarios en materia de nutrición aplicada que tuvieron el objetivo de hacer llegar a las comunidades los beneficios de los nuevos conocimientos logrados en el campo de la nutrición humana. Estas acciones fueron acompañadas de otras políticas en materia de educación, de producción, de caminos, de comercio, etc., donde la tendencia era lograr un mejor desarrollo socioeconómico.<sup>18</sup>

Hasta la década de los sesenta la importancia de la desnutrición como causa de enfermedad y de muerte no había sido bien establecida; algunos estudios mostraban que en algunas áreas de los países pobres, la desnutrición podría ser la primera causa de muerte durante la infancia. En casos de diarrea infantil morían ocho veces más niños desnutridos que bien nutridos; en poblaciones mal alimentadas la mortalidad por sarampión era 30

veces más alta que en una población bien alimentada y en obreros mal alimentados la tuberculosis era cinco veces más frecuente que en obreros bien alimentados.<sup>15</sup>

Desde 1958, Cravioto describió la etapa prepatogénica de la evolución natural de la desnutrición en el medio rural. En ella le confirió importancia a la presencia de enfermedades infecciosas como precipitantes de la desnutrición, así como al destete temprano como productor de la desnutrición tipo marasmo y el destete gradual como generador de la desnutrición tipo kwashiorkor.<sup>19</sup> En México se encontró que entre 1 y 4% de los niños menores de cinco años estaban gravemente desnutridos y en los lactantes en el momento del destete la prevalencia aumentó hasta 10%.<sup>18</sup>

Como respuesta a la pobre alimentación de niños en comunidades rurales, principalmente indígenas, durante los años sesenta se realizaron estudios sobre recuperación nutricional. Se encontró que la atención médica de la desnutrición en consultorio mostraba limitaciones; que la ablactación era necesaria iniciarla a partir del tercer mes de vida, pero la alimentación suplementaria era iniciada tardíamente por la madre, después de los nueve meses de vida. Algunos de los resultados de estas intervenciones después de tres meses de trabajo fueron mejoras en la ablactación de los niños en las comunidades indígenas, suficiente para prevenir la desnutrición y hacerlos más resistentes a la serie de enfermedades que se presentan a esa edad.<sup>20,21</sup>

La alimentación mexicana en la década de los sesenta era pobre en cantidad, de mala calidad y desequilibrada en el contenido de sus nutrientes. Mientras para algunos especialistas el problema de la desnutrición era originado por un factor económico, que limitaba a la colectividad en su capacidad para alimentarse; otros pensaban que las creencias y los valores culturales, así como la falta de educación eran las que se encontraban en el origen de la desnutrición.<sup>18</sup> Un estudio realizado en la Chontalpa (Tabasco), durante el decenio de 1960, el cual valoró el estado nutricional de la

población antes y después de la implementación de un programa de desarrollo agrícola, puso de manifiesto que los recursos económicos de la región se triplicaron y aparentemente la dieta mejoró en 100%; sin embargo, al hacer el análisis alimentario por clase social, se vio que solo una parte de la población había sido beneficiada por el programa, mientras que los trabajadores y campesinos mantuvieron sus mismos problemas, así como las mismas cifras de desnutrición infantil y mortalidad. Esto hizo considerar a la desnutrición como un problema en la producción, distribución y consumo de alimentos.<sup>22</sup>

Una interrogante que se planteó en los primeros trabajos fue la interrelación entre la desnutrición y la infección, se sabe que la desnutrición altera la resistencia del huésped a la infección y las enfermedades infecciosas alteran el metabolismo general del organismo. Varios investigadores se dedicaron al estudio de la influencia de las infecciones sobre el metabolismo de proteínas, grasas, carbohidratos y de vitaminas. Se encontró que las infecciones podían actuar como una causa precipitante de desnutrición grave.<sup>23</sup> Se sabía que entre 76 a 100% de los niños desnutridos del medio rural tenían antecedentes de diarrea intermitente, entre 30 y 35% antecedentes de padecimientos respiratorios y de 13 a 20% de haber padecido enfermedades infecto-contagiosas de la infancia.<sup>24</sup>

Dentro de los aspectos biológicos se realizaron estudios histológicos de la mucosa intestinal para detectar el tipo y extensión del daño que se producía en los niños desnutridos; también trabajos sobre absorción de grasas e hidratos de carbono para definir las causas de asimilación deficiente de alimentos.<sup>25,26</sup> Asimismo se iniciaron los estudios para detectar las posibles alteraciones que la desnutrición pudiera producir a nivel citogenético en niños con desnutrición grave.<sup>27</sup>

El tratamiento de la desnutrición siempre fue objeto de preocupación por lo que fue estudiado, analizado y, probablemente por ser un campo exclusivo del sector salud, es en el que se obtuvo rápidos progresos. El conocimiento de los aspectos

biológicos como el metabolismo de proteínas, grasas y carbohidratos, el funcionamiento renal y los mecanismos homeostáticos de la desnutrición grave, lograron disminuir la letalidad de la desnutrición; antes de 1950, de diez niños hospitalizados con desnutrición grave, morían seis; para 1960 de 100 niños hospitalizados con desnutrición fallecían cinco, lo que evidenciaba los avances en el tratamiento del marasmo y el kwashiorkor.<sup>28</sup>

En el tratamiento no solo ha sido importante la dosificación de la dieta, dependiendo del grado y tipo de desnutrición,<sup>29,30</sup> sino la antibioticoterapia, la rehidratación y la rehabilitación integral de los niños,<sup>31,32</sup> así como la incorporación de acciones no nutricias como la estimulación materna sistemática.<sup>33</sup>

Otro aspecto biológico que ha sido analizado es el retardo en la estatura de niños con desnutrición grave, considerado como un fracaso adaptativo y no como un ajuste favorable, Gómez y Zubirán plantearon la hipótesis de que el mecanismo básico de los trastornos hormonales consistía en un bloqueo de la respuesta hormonal periférica; datos que fueron corroborados posteriormente.<sup>34</sup>

Otra pregunta que inquietaba a la comunidad de especialistas era saber si los niños con desnutrición grave podrían presentar retardo en la evolución de la conducta cognoscitiva, motora, del lenguaje o incluso adaptativas y de tipo personal-social, esto dio origen a una serie de estudios para detectar las posibles alteraciones a nivel del sistema nervioso.<sup>35-37</sup> Los hallazgos obtenidos de estos trabajos mostraron que los niños después de recuperarse de un episodio de desnutrición grave, presentaron valores inferiores en casi todas sus habilidades motoras; sin embargo, se demostró que agregar "factores no nutricios puede ayudar a proteger la capacidad intelectual de los niños en condiciones de privación".<sup>33,38</sup> El incorporar la estimulación sistemática materna, dentro del contexto de una adecuada interacción madre-hijo, junto a la recuperación nutricional, permitió que estos niños recuperaran su capacidad intelectual de acuerdo a lo esperado para su edad cronológica;

de cada diez niños en recuperación nutricional, incluida estimulación materna sistemática, al ser evaluados, entre siete y nueve presentaron la capacidad intelectual esperada para su edad cronológica.<sup>33</sup>

Los trabajos sobre desnutrición mostraron un avance significativo. Las encuestas nacionales, así como los aportes de investigación experimental pusieron de relieve la importancia de la desnutrición infantil. Así, para los años setenta la desnutrición infantil era considerada como la cuarta causa de muerte en la edad preescolar, además de que se asociaba como causa subyacente de otras enfermedades infecciosas. En el medio rural su prevalencia era de 73%, donde 46% correspondía al grado I de desnutrición, 28% al grado II y 3% al grado III; en el área urbana representó 60%, donde 44% era grado I, 15% grado II y 1% grado III.<sup>39</sup>

Al comienzo de la década de los años setenta y de acuerdo a los valores calórico y proteico de la dieta rural, el país fue clasificado en cuatro regiones: a) de buena nutrición: frontera norte, noroeste de Baja California y Sinaloa, aquí no se reportaba desnutrición grave y la mortalidad preescolar era de 5 por 1 000 habitantes; b) nutrición regular: norte del país y ambas zonas costeras, desnutrición grave de 1% y mortalidad preescolar de 10 por 1 000 habitantes; c) nutrición mala: centro del país, desnutrición grave de 4% y mortalidad preescolar de 17 por 1 000 habitantes y d) nutrición muy mala: en los estados de Guerrero, Oaxaca, Chiapas y el resto del sureste, con desnutrición de 4% y mortalidad preescolar de 26 por 1 000 habitantes.<sup>40</sup>

En 1974, el INNSZ aplicó la primera Encuesta Nacional de Alimentación en el Medio Rural Mexicano (ENAL 74), y en 1979 la segunda (ENAL 79), esta última conjuntamente con el Instituto Nacional Indigenista (INI) y la Secretaría de Salud (SSA); sin embargo, la información de estas encuestas sólo se procesó en una mínima parte y permaneció inédita hasta 1990.<sup>41</sup>

En 1982, bajo la cobertura de los servicios médicos del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)-COPLAMAR, se realizó una encuesta del

estado nutricional de la población rural comprendida entre los 2 a 18 años; encontrándose que la población más afectada por la desnutrición de acuerdo al parámetro del peso para la edad, eran los niños menores de dos años y los escolares de 10 a 14 años; en relación al sexo las niñas fueron las que presentaron los índices más altos. En niños menores de dos años con desnutrición grave, los varones mostraron 4.2%, en cambio en las niñas fue de 6.0%; para aquellos de 10 a 14 años fue de 4.2% en los varones y de 12.5% para las niñas. Al comparar el peso y la estatura corporal entre las zonas urbanas y rurales, los varones rurales pesaban en promedio 8.6 kg y median 9 cm menos que los varones urbanos; las mujeres rurales pesaban 5.5 kg y median 5 cm menos que las mujeres de las zonas urbanas. Así mismo, el deterioro grave de la talla esperada para la edad, de acuerdo a las regiones geográficas estudiadas, fue mayor en el sur de las costas del Océano Pacífico y el Golfo de México (12.3%).<sup>42</sup>

En 1988 se realizó la primera Encuesta Nacional de Nutrición (ENN) efectuada por el sistema Nacional de Encuestas de Salud de la Secretaría de Salud, tanto a nivel central, como en las entidades federativas del país. Recabó información sobre varios rubros que pueden ser agrupados en seis capítulos: I) Variables sociales y demográficas; II) Indicadores del estado de salud-enfermedad; III) Variables sobre dieta; IV) Indicadores antropométricos; V) Concentración de hemoglobina y VI) Programas de ayuda alimentaria. Algunos de los datos emanados de esta encuesta demostraron que a nivel nacional en esa época existían aproximadamente 12.6 millones de niños menores de cinco años con algún grado de desnutrición; es decir 30% de la población de este grupo de edad. El tipo de desnutrición con mayor prevalencia era la desnutrición aguda (16%) y el tipo identificado como de más alto riesgo fue la desnutrición crónica agudizada (12%). En los resultados de la talla para la edad se encontró que en la región norte del país, los menores de cinco años alcanzaron en promedio una talla mayor, mientras en el sureste, menos de la mitad de la población

preescolar tuvo una talla adecuada para su edad. En relación al indicador peso para la edad se reportó a nivel nacional, 33.1% desnutrición grado I, 8.1% grado II y 0.7% grado III; siendo la región del Sureste la más afectada con porcentajes mayores al nacional: 39.5% para desnutrición grado I, 12.3% para grado II y 1.3% para el grado III. La zona Norte y la Ciudad de México con los porcentajes de desnutrición más bajos.<sup>43</sup>

### Programas preventivos de la desnutrición a partir de los años sesenta

Los programas para prevenir la desnutrición iniciaron con proyectos asistenciales y continuaron con los llamados integrales de coordinación intersectorial. En los años sesenta se intensificaron y no solo incluían medidas de educación para la salud como tiempo correcto de destete, alimentación complementaria, control de enfermedades infecciosas y mejoramiento de la habitación, sino también se señalaba la necesidad de distribuir alimentos entre las clases populares a precios subsidiados, enriquecimiento de alimentos para aumentar su aporte de proteínas,<sup>43,44</sup> así como planificar las cosechas para mejorar la disponibilidad de alimentos.<sup>40</sup> Sin embargo, en los años setenta el país vivió una crisis de alimentos, generando en 1974 la pérdida de autosuficiencia en maíz y comenzó el déficit en la producción de otros granos, la cual fue rápidamente corregida con la importación de alimentos.

En 1973 se publicó en el Código Sanitario del Diario Oficial, un Programa Nacional de Nutrición que debería ser aplicado por la SSA. No solo incluyó un diagnóstico sino también un pronóstico sobre el problema de la desnutrición, abordándola desde el punto de vista de la salud pública. También se iniciaron estudios experimentales para aumentar el poder nutritivo de la tortilla. La Compañía Nacional de Subsistencias Populares (CONASUPO, 1965) fue creada junto con una planta rehidratadora de leche (que en 1972 se convierte en LICONSA) y una compañía distribuidora de alimentos (DICONSA), estos organismos comenzaron a distribuir alimento

infantil a precios bajos como el Soyacyt y leche a nivel urbano. Participaron además de las instituciones ya mencionadas el Instituto de Seguridad Social al Servicio de Trabajadores del Estado (ISSSTE), el IMSS, la Secretaría de Agricultura y Educación Pública, la acción prioritaria era llevar alimentos básicos a todos los mexicanos.<sup>43</sup>

Como resultado de la Conferencia Mundial de la Alimentación realizada en Roma en 1974 con participación de la OMS, de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y de la Organización de Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), en 1980 el INNSZ diseñó un Sistema de Vigilancia de la Nutrición (SIVIN) que integraba a todas las unidades de primer contacto de las instituciones de salud del país, con el objeto de establecer “una metodología de vigilancia epidemiológica de la nutrición”. Dicho sistema fue implementado en tres niveles: el primero pretendía llevar a cabo una serie de acciones de diagnóstico y medidas preventivas y correctivas a las que se denominaba paquete de “detección-atención”, para lograr a corto plazo una reducción de la morbi-mortalidad por desnutrición y a largo plazo, determinar los patrones de crecimiento de la población infantil, así como identificar las zonas del país más afectadas por la desnutrición y poder realizar su seguimiento longitudinal; el segundo nivel consistió de una muestra a nivel nacional, la cual generaría información sobre el panorama de la situación alimentaria y de nutrición del país, para conocer su tendencia, medir sus cambios y evaluar el impacto de los programas gubernamentales; el tercer nivel, estuvo orientado a una serie de investigaciones y estudios de problemas detectados en los otros niveles.<sup>45</sup> En los estados donde se encontraron datos sobre la puesta en marcha del SIVIN fue en Chiapas y Puebla, posteriormente en San Luis Potosí. En Chiapas se aplicó el sistema de vigilancia en 39 comunidades muy pobres, como un paquete de diez acciones a cada niño y a su familia, de las cuales cinco fueron de nutrición y cinco de salud: 1. Vigilancia periódica del crecimiento por medio de la cartilla; 2. Vitamina A en megadosis anual; 3. Inmunización de acuerdo al programa; 4. Desparasitación de

protozoarios y nemátodos; 5. Alimentación a los tres meses; 6. Papilla proteica a los tres y a los ocho meses; 7. Alimentación materna: un plato más a las embarazadas y dos a las lactantes; 8. Desarrollo comunal, para la autosuficiencia alimentaria en nutrición infantil; 9. Rehidratación oral con suero casero o el de la SSA; 10. Educación sobre higiene personal y de los alimentos. Esta acción permitió una disminución de la desnutrición en la zona de 60%.<sup>46</sup>

Otro tipo de investigación que realizó el INNSZ, fue el que se denominó programas de intervención, algunas llevadas a cabo en Chiapas y en el Estado de México. Se estudió el desarrollo de los niños nacidos antes del inicio del programa (alimentados de acuerdo a sus costumbres) en comparación con niños nacidos después (alimentados de acuerdo a las recomendaciones del Instituto). De acuerdo con los resultados publicados, las diferencias encontradas entre ambos grupos fueron considerables, los niños con la alimentación tradicional se enfermaron mucho, su desarrollo mental fue deficiente y su comportamiento fue pasivo, tímido e inseguro; en cambio los niños alimentados de acuerdo al Instituto, se enfermaron menos, su desarrollo mental fue más adecuado, y fueron activos y seguros.<sup>46</sup>

Como parte de los programas encaminados a resolver el problema de la desnutrición y marginalización que existían en el país, entre 1976-1983, el gobierno impulsó el Sistema Alimentario Mexicano (SAM). Su objetivo era estimular la producción de alimentos básicos, facilitando el acceso a créditos y mejorando los precios de garantía, como principales estrategias. Aunque tenía una orientación predominantemente productiva, se le concebía como parte de una estrategia en la cual el logro de la autosuficiencia se asociaba a la superación de la pobreza rural. El SAM se transformó en 1983 en el Programa Nacional de Alimentación (PRONAL), cuyo objetivo fue orientar y canalizar las políticas sectoriales para satisfacer las necesidades básicas de la población más desfavorecida, aumentando el consumo de alimentos en zonas vulnerables.<sup>47</sup>

Una acción gubernamental que tuvo un gran impacto a nivel nacional desde finales de los años setenta fue el Programa Nacional de Solidaridad Social por Cooperación Comunitaria (IMSS-COPLAMAR), el cual se sumó a las actividades dirigidas a mejorar el estado nutricional de la población rural. Buscaba una mayor participación de la comunidad y un involucramiento más a fondo de los campesinos en la gestión, diseño y aplicación de los programas en su propio beneficio. Sus acciones en cuestión de desnutrición fueron: a) la detección de casos de desnutrición entre los menores de cinco años; b) tratamiento y control de los casos confirmados de desnutrición, y c) la capacitación de la comunidad sobre la manera de alimentarse mejor e impulsar la producción de alimentos. Este programa manejó el término de marginación para designar las zonas de mayor pobreza, y se establecieron cuatro niveles: muy alta, alta, media y media baja. De acuerdo a sus estadísticas de los casos de desnutrición diagnosticadas en su población atendida para 1985, 72% correspondía a desnutrición grado I, 23% al grado II y 5% al grado III.<sup>48</sup> Posteriormente, en 1989 este programa se transformó en IMSS-Solidaridad.

En 1989 el INNSZ realizó la Tercera Encuesta Nacional de Alimentación en el Medio Rural (ENAL 89) con el apoyo de la Comisión Nacional de Alimentación y el Sistema Nacional para el Desarrollo Integral de la Familia (DIF). La operación en campo fue ejecutada por el INI y por los servicios estatales de salud de la SSA, mediante el Programa de Nutrición y Salud de la Dirección General de Salud Materno-Infantil y por el IMSS-Solidaridad. Esta encuesta permitió comparar los resultados con los datos generados por las encuestas nacionales de 1974 y de 1979 (cada ENAL se aplicó en las mismas regiones seleccionadas y a la vez cada una ampliaba su muestra de estudio), que por cuestiones diversas no habían sido publicados.<sup>49</sup> Un resultado significativo de la comparación histórica de los niveles de desnutrición fue la poca variación observada durante el período de 15 años cubierto por las

encuestas. Otro resultado de gran relevancia fue la estimación de la mortalidad infantil en el medio rural, la cual era de 90 de cada 1 000 niños nacidos vivos en las comunidades menores de 2 500 habitantes. Estas cifras se ubican 50 puntos por arriba del promedio nacional, y más de 70 con relación al DF. La encuesta reforzó información cuyas tendencias ya habían sido reveladas por las encuestas anteriores, por ejemplo, la zona norte fue la que mostró los niveles de desnutrición más bajos. Un dato nuevo fue que también la zona norte exhibió la mayor mejoría en la prevalencia de la desnutrición; de presentar 12% de desnutrición moderada pasó a 5%. La zona del centro del país también presentó cierta mejoría pero con alto porcentaje de desnutrición moderada (14%). Los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas que han manifestado siempre niveles de desnutrición alta, presentaron un mayor deterioro de 1974 a 1989, al pasar de 28% en desnutrición moderada y grave a 34%.<sup>49</sup> La Península de Yucatán que en 1979 había mejorado en relación a las encuestas de 1974, ahora presentaba un retroceso junto con todas las regiones indígenas tropicales de la vertiente del golfo de la Sierra Madre Oriental (sobre todo la Huasteca y la Sierra de Puebla) y las áreas indígenas centrales como la zona Mazahua, el Mezquital y parte de Tlaxcala y Puebla.<sup>46</sup>

Los resultados de la ENAL-89 difieren en forma importante en las cifras proporcionadas por la ENN, siendo esta última la que reporta porcentajes de desnutrición más bajos; en lo que sí concuerdan es en considerar al sureste del país como la zona más afectada por el problema y al norte como la menos afectada. Un dato importante es que la ENAL valora 15 años de investigación sobre desnutrición en las mismas regiones geográficas.

En la década de los años noventa se hablaba mucho entre los especialistas mexicanos de la transición epidemiológica que vivía el país, estableciendo que las enfermedades crónico-degenerativas y cardiovasculares desplazaban a las enfermedades infecciosas para ocupar los primeros lugares de las causas de morbi-mortalidad en la

población mexicana. Sin embargo, las enfermedades infecciosas en realidad no han desaparecido y en ocasiones tienden a incrementarse, tal es el caso del cólera, del que aparecieron los primeros casos en 1991.

En 1993 se realizaron en la Cámara de Diputados (LV Legislatura) una serie de audiencias públicas denominadas "El Problema de la Alimentación en México, Dr. Salvador Zubirán". En ese foro se analizó el problema de la alimentación, con el objetivo de proponer la creación de un marco legal que garantice el derecho de los mexicanos a alimentarse sana y suficientemente. Las audiencias se llevaron a cabo en las ciudades de México, Oaxaca, Torreón y Gómez Palacios. Algunas de las coincidencias entre los participantes fueron: 1. Que el problema nutricional en nuestro país es lo suficientemente grave como para ser incorporado entre las más urgentes prioridades nacionales; 2. Es necesario reforzar y mejorar la eficacia de los programas y políticas oficiales dirigidos a atender el problema alimentario y nutricional del país; 3. Se insistió en la necesidad de mejorar la coordinación entre las diversas instancias oficiales que atienden la problemática, tanto en el ámbito federal como a nivel estatal y municipal.<sup>50</sup>

En años más recientes se realizaron estudios regionales sobre desnutrición; por ejemplo, en Tabasco se evaluó la prevalencia de la desnutrición durante cinco años, de 1991 a 1996.<sup>51</sup> También se elaboraron evaluaciones nutricionales en comunidades rurales en donde se efectuaron cambios en la producción agrícola, encontrándose cambios favorables en sus condiciones nutricias, pero relacionadas con una mejor disponibilidad de alimentos.<sup>52</sup> El DIF realizó en dos ocasiones (1993 y 1994) el censo Nacional de Talla, con cooperación de la Secretaría de Educación Pública (SEP) con niños del primer año de primaria en el país. Posteriormente, la Dirección de Asistencia Alimentaria del DIF informó que de acuerdo con sus estadísticas, Chiapas ocupa el primer lugar en el déficit de talla dado que 44% de los menores de primer año de primaria presentan disminución en

sus medidas, después le siguen Oaxaca, Yucatán, Guerrero y Puebla (43, 37, 34 y 31%, respectivamente) y constituyen los cinco estados con mayor retardo en el crecimiento.<sup>33</sup>

En 1995 el INNSZ realizó la Encuesta Urbana de Alimentación en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, la cual volvió a confirmar que la desnutrición en la capital no es tan grave como en el medio rural, aunque se detectó un importante número de niños preescolares desnutridos. En 1996 se elaboró la Cuarta Encuesta Nacional de Alimentación en el Medio Rural Mexicano (ENAL 96) cuyo objetivo fue conocer la situación alimentaria y nutricional en el medio rural e identificar factores de riesgo asociados con desnutrición infantil en las comunidades.<sup>41</sup>

Los datos obtenidos de esta encuesta muestran que la prevalencia de desnutrición en el medio rural fue de 43% de acuerdo con el indicador peso/edad: 26% para desnutrición leve, de 13% para la forma moderada y 4% para la forma grave; sin embargo, los estados de Guerrero, Yucatán, Puebla, Oaxaca y Chiapas presentan una prevalencia de desnutrición moderada y grave superior a 20%, mientras que en Tamaulipas, Sinaloa, Jalisco, Durango, Coahuila, Baja California y Sonora la prevalencia de la desnutrición moderada y grave fue inferior a 8%. En poblaciones indígenas el porcentaje del indicador peso/edad de desnutrición grave se elevó hasta 8%; además en algunas zonas como Guerrero, Michoacán, Tlaxcala y sur de Puebla se detectó un deterioro entre 1989 y 1996, pues la desnutrición fue superior a 55% y las formas moderada y grave se incrementaron de 16 a 25%.<sup>41</sup>

Los programas que surgen durante la década de los noventa para combatir la pobreza y la desnutrición fueron el Programa Nacional de Solidaridad (PRONASOL) con áreas de prioridad en la alimentación, la regularización de tenencia de la tierra, la vivienda y el agua potable. Sus actividades (1990-1995) se centraron en la ampliación de infraestructura de salud y educación así como en la dotación de servicios urbanos básicos, apoyos a la producción y acciones

de desarrollo regional.<sup>47</sup> Posteriormente surge el Programa de Alimentación y Nutrición Familiar que fue sustituido por el Programa de Educación, Salud y Alimentación (PROGRESA) en 1998, el cual se integraba por tres componentes vinculados entre sí: 1. Apoyo educativo mediante becas y útiles escolares; 2. Atención básica de salud de todos los miembros de la familia y dotación gratuita de suplemento alimenticio a las madres embarazadas y lactantes y a niños menores de dos años y 3. Transferencia monetaria base para apoyar el consumo alimentario y el estado nutricional familiar. La SSA es responsable de la totalidad de las familias inscritas en el programa en 13 estados de la República y en los otros 17 comparte responsabilidad con el IMSS-Solidaridad.<sup>54</sup>

En el componente salud y alimentación del PROGRESA tenía como objetivo mejorar la cobertura en las unidades de atención primaria para disminuir la incidencia de enfermedades en familias de bajos ingresos. Las principales acciones estaban dirigidas a los grupos más vulnerables como los niños menores de cinco años, mujeres embarazadas y mujeres que se encontraban lactando. Las estrategias del programa en estos puntos fueron: 1. Proporcionar un paquete básico de atención primaria en los servicios de salud; 2. Prevenir la desnutrición desde la edad prenatal y 3. Promover y mejorar el cuidado a la salud y la atención en los servicios de salud. El apartado sobre nutrición del programa incluye el otorgamiento de recursos a la familia seleccionada (para contribuir a mejorar la cantidad y diversidad del consumo de alimentos), además del suplemento alimenticio. Con este último se estimaba que en promedio aportarían 20% de los requerimientos calóricos y 100% de los micronutrientes necesarios, promoviendo así un mejor estado nutricional desde la gestación y en las primeras etapas de la vida del niño.<sup>54</sup>

En la primera evaluación del PROGRESA realizada en 1999, se habló de cómo el programa había ido ampliando su cobertura en el país, tanto en el número de familias beneficiadas, como el logro de asistencia a las escuelas primarias, telese-

cundarias, servicios de salud a través de consultas otorgadas y el número de alimentos distribuidos. Así, de 1.2 millones de familias atendidas en 1998 ascendió a 2.16 millones para 1999; el número de unidades médicas participantes pasó de 3 021 a 8 370; prestadores de servicios institucionales de 28 179 a 39 000; el número de consultas en el caso de niños menores de cinco años aumentó 30%, en relación a las unidades que no participan en el programa, y 16% para el caso de atención prenatal; la distribución de alimento pasó de 153 a 207 millones de dosis de suplemento a niños y de 101 a 103 millones de suplemento a mujeres embarazadas o en período de lactancia. En el rubro escolar el mayor efecto del programa se observó en la secundaria, con un incremento relativo de 17% en el número de jóvenes que entran a primero de secundaria.<sup>55</sup> Estos datos se refieren a un amplio grupo de acciones de desarrollo. Su impacto en la desnutrición requiere de una evaluación específica cuyos resultados permitirán establecer lo que es PROGRESA en el problema de la desnutrición o en el abatimiento de la pobreza extrema.

### Reflexiones finales

El panorama hasta ahora descrito permite constatar la importancia de las encuestas a nivel nacional en el medio rural, las cuales se han realizado durante más de 15 años y permite valorar la acción de los programas gubernamentales, dejando ver que estos últimos han sido insuficientes para abatir el problema, dado que la desnutrición se ha incrementado en algunos estados del país, principalmente en las regiones más pobres del sur y sureste. Para algunos investigadores queda claro que se cuentan con los recursos técnicos para virtualmente hacerla desaparecer; sin embargo, esto no ha sucedido así.

Es posible que entre las causas de la persistencia de la desnutrición en México se deba al carácter no infeccioso de la enfermedad, lo cual no implica riesgo de contagio ni de propagación de la misma. Así, la desnutrición es una enfermedad silenciosa y su latencia es tolerada socialmente. También es un padecimiento que en los últimos

50 años se ha presentado en nuestro país como una entidad principalmente crónica.

Enseguida se aportan algunas ideas que pueden servir para profundizar en la lucha contra la desnutrición en México, teniendo como eje la participación del Estado y la promoción del desarrollo regional. Considerando que la disminución de la desnutrición requiere de acciones radicales de desarrollo comunitario, regional y humano lo que supone medidas económicas, sociales y políticas encabezadas por el Estado; dentro de las medidas económicas es importante garantizar ingresos suficientes a las familias rurales y urbanas de escasos recursos.

La desnutrición está fuertemente ligada al retardo de la economía regional, lo que explicaría que en los estados del norte del país no ha sido ni es un problema representativo de salud pública; en otros estados, cuando mejora la situación económica (gracias a la migración, por ejemplo) también mejoran sus condiciones de salud; pero regiones donde no hay progreso económico como es el caso de las zonas de predominancia rural y en las comunidades indígenas, se han presentado niveles de desnutrición más altos que los que presentaban las encuestas realizadas antes de 1996.

La solución es difícil y no involucran solamente acciones económicas sino también de otra índole que tienen que ver con el desarrollo del país. Para algunos estudiosos la solución se encuentra en el apoyo al campo para incrementar el empleo y los ingresos aunque han existido diversos programas enfocados a este problema, siendo el BANRURAL el más ambicioso, cuyo objetivo fue proporcionar créditos para mejorar la producción además de incorporar tecnología al campo mexicano, el cual tampoco produjo los resultados esperados, y la política de créditos se restringió fuertemente, desapareciendo en los años noventa.

La desnutrición debe ser abatida del ámbito nacional con medidas económicas, sociales y políticas que estén relacionadas con las características propias de cada región que la padece, no de políticas nacionales que en la mayoría de los casos no toman en cuenta las encuestas y los datos

nacionales ya existentes de cada región. Esto ayudaría a que las instituciones participantes no dupliquen funciones y por lo tanto los recursos humanos y económicos no se desperdicien. El Estado puede combatir la desnutrición a través de garantizar a todo niño nacido en territorio nacional su educación y alimentación. Ello implicaría un reforzamiento de programas mucho más amplios de educación, que incorporen desayunos y comida al interior de los planteles escolares. Esto implicaría dotar a todas las comunidades de servicios públicos, donde además de carreteras y otros servicios como drenaje y agua potable, existan centros educativos y de salud.

Por otro lado, los centros de salud de la SSA junto con el IMSS, ISSSTE y DIF entre otros, podrían ser los encargados durante la edad preescolar de distribuir los alimentos, además de proporcionar los cuidados en salud que requieren los infantes. En este programa quedarían incluidas

las mujeres embarazadas y en proceso de lactancia. Durante la edad escolar la SEP sería la institución encargada de proporcionar la alimentación a los niños. Es claro que el PROGRESA contempla los rubros de educación, salud y alimentación para las zonas rurales de extrema pobreza, pero la propuesta es que estos programas deben de ampliarse a todo el país. Este es un programa ambicioso que necesitaría una gran voluntad política, aunada a un programa de incremento del empleo y los ingresos familiares, así se garantizaría la erradicación de la desnutrición en México. Así mismo, es necesario continuar con las encuestas nacionales a nivel rural y urbano para valorar la evolución de la desnutrición en México.

#### **Agradecimientos**

Agradecimiento por el apoyo parcial de CONACyT y a Oralia Nájera, beca 114128/114816.

### *MALNUTRITION IN MEXICO*

A review of malnutrition in Mexico, focused in 2 topics: the government programs conceived to solve the problem, and the national surveys designed to evaluate it, are presented in this work. Malnutrition has not an homogeneous distribution in Mexico, as has been shown by national surveys: a highest prevalence of malnutrition was found in the south and southeast states of the country, regions with the lowest economical and social development. National government programs such as SAM, IMSS-COPLAMAR, PRONASOL, and PROGRESA, have been created due to the severity of malnutrition as a public health problem in Mexico. The results of those programs were not sufficed to solve the problem in Mexico, at national and regional levels, as has also been shown by surveys. In the future is necessary to continue with national surveys on malnutrition in order to evaluate government programs. We propose that the government programs should take in account the social and cultural uniqueness of each region suffering malnutrition and other poverty effects.

**Key words.** Malnutrition; Mexico; government programs.

## Referencias

1. Cravioto J, Vega-Franco L. Historical highlights of Mexican contributions to human nutrition. *Arch Med Res* 1995; 26: 133-7.
2. Hinojosa F. Apuntes sobre una enfermedad del pueblo de la Magdalena. *Gac Med Mex* 1865; 1: 256-8.
3. Gómez F. Desnutrición. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1946; 3: 543-51.
4. Massieu G, Guzmán JG, Cravioto OR, Calvo J. Contenido de aminoácidos indispensables en algunas semillas mexicanas 1950; 10: 142-59.
5. Chávez A, Balan G, Rodríguez J. Estudios clínicos. En: *Estudios sobre nutrición*. No. 16. México: División de Nutrición INN; 1962. p. 1-20.
6. Cravioto OR, Massieu G, Guzmán JG, Calvo J. Composición de alimentos mexicanos. *Nutriología* 1955; 2: 1-24.
7. Olarte J, Cravioto J, Campos B. Inmunidad en niños desnutridos. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1956; 13: 467-72.
8. Kumate J, Mariscal C, Hikimura J, Yoshida P. Desnutrición e inmunidad. I. Complemento hemolítico en niños desnutridos. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1964; 21: 427-32.
9. Gómez F, Ramos-Galván R, Cravioto J, Frenk S. Enzymatic activity of the duodenal contents in children affected with third degree malnutrition. *Pediatrics* 1954; 13: 548-55.
10. Gitlin D, Cravioto J, Frenk S, López ME, Ramos-Galván R, Gómez F, et al. Albumin metabolism in children with protein malnutrition (Kwashiorkor). *J Clin Invest* 1958; 37: 682-6.
11. Frenk S, Metcalf J, Gómez F, Ramos-Galván R, Cravioto J, et al. Intracellular composition and homeostatic mechanisms in chronic infantile malnutrition. *Pediatrics* 1957; 20: 105-20.
12. Balan G, Chávez A, Fajardo LJ. Las zonas del país con mayores problemas nutricionales. *Encuestas Nutricionales en México*. México: División de Nutrición INN; 1967. p. 17-27.
13. Chávez A. La alimentación de los niños en México y su relación con los signos clínicos de malnutrición. *Rev Invest Clin Mex* 1963; 15: 103-13.
14. Zubirán S, Chávez A. Algunos datos sobre la situación nutricional en México. *Encuestas nutricionales en México*. México: División de Nutrición INN; 1962. p. 7-14.
15. Hernández M, Pérez GSE, Aguirre J, Madrigal H, García T, Escobar BI, et al. Las prácticas de alimentación infantil en el medio rural mexicano. México: División de Nutrición L-24 INN; 1975. p. 1-47.
16. Cifuentes GE, Pérez-Gil RSE. Factores socioeconómicos y estado nutricional de los niños en una comunidad rural. México: División de Nutrición L-53 INN; 1982. p. 1-83.
17. Pérez HC, Chávez VA, Madrigal H. Recopilación sobre el consumo de nutrientes en diferentes zonas de México. *Encuestas Nutricionales en México*. México: División de Nutrición INN; 1970. p. 41-54.
18. Chávez A. Manual de administración de programas de nutrición. México: División de Nutrición L-6 INN; 1966. p. 4-17.
19. Vega-Franco L. La desnutrición como expresión de enfermedad social. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1977; 6: 1215-27.
20. Martínez C, Chávez A. Estudio sobre la recuperación de niños desnutridos en comunidades rurales. *Encuestas Nutricionales en México*. México: División de Nutrición INN; 1967. p. 697-716.
21. Chávez A, Iñiguez G. Estudio sobre la recuperación de niños desnutridos en comunidades rurales. II. La importancia de una auxiliar adiestrada. *Arch Latin Nutr* 1968; 18: 149-64.
22. Chávez A. La alimentación y los problemas nutricionales. En: Ortiz-Quezada F, editor. *Vida y muerte del mexicano*. México: Folios Ediciones; 1982. p. 59-87.
23. Vega-Franco L. Diarreas y desnutrición. En: *Enfermedades diarreicas en el niño*. México: Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México; 1973. p. 253-8.
24. Chávez A. La prevención de la desnutrición infantil. México: División de Nutrición INN; 1967. p. 727-35.
25. Vega-Franco L, del Carmen A, Toca T, Bautista B. Absorción facilitada de grasas mediante el uso de enzimas pancreáticas en niños desnutridos. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1974; 31: 873-8.
26. Vega-Franco L, Jiménez E, Vega-Martínez C. Absorción facilitada de lactosa mediante beta-galactosidasa de *Aspergillus*. *Rev Mex Pediatr* 1975; 44: 137-47.
27. Betancourt M, de la Roca JM, Saénz ME, Díaz R, Cravioto J. Aberraciones cromosómicas en desnutrición proteico-calórica avanzada. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1972; 29: 517-24.
28. Cravioto J. Malnutrition in context. *World Med* 1976; 11: 57-60.
29. Gómez F, Ramos-Galván R, Cravioto J, Frenk S. Prevention and treatment of chronic severe infantile malnutrition (kwashiorkor). *Ann NY Acad Sci* 1958; 69: 969-88.
30. Ramos-Galván R. Tratamiento de la desnutrición (con especial referencia a grado). *Bol Med Hosp Infant Mex* 1958; 15: 941-63.

31. Vega-Franco L. Tratamiento integral de la desnutrición en el niño. Cuadernos de Nutrición 1979; 4: 51-4.
32. Luengas J, Flores HS, Esquivel HS. Sala de rehabilitación nutricional. Recuperación integral del niño desnutrido. Cuadernos de Nutrición 1980; 5: 349-63.
33. Cravioto J, Arrieta R. Stimulation and mental development of malnourished infants. Lancet 1979; 2: 899.
34. Frenk S. Adaptación metabólica en la desnutrición. Cuadernos de Nutrición 1989; 12: 17-33.
35. Robles B, Ramos-Galván R, Cravioto J. Valoración de la conducta del niño con desnutrición avanzada y de sus modificaciones durante la recuperación. Bol Med Hosp Infant Mex 1959; 16: 317-41.
36. Cravioto J, Arrieta R. Malnutrition, infant stimulation and mental development. Children Today 1981; July-august: 35-8.
37. Cravioto J. Nutrition, stimulation, mental development and learning. Nutrition Today 1981; sep-oct: 4-15.
38. Cravioto J, Cravioto P. Some long-term psychobiologic consequences of malnutrition. Ann Nestle 1990; 48: 93-102.
39. Pérez HC. Diagnóstico precoz y tratamiento temprano de la mala nutrición. En: La desnutrición y la salud en México. México: División de Nutrición INN; 1976. p. 309-14.
40. Zubirán S, Chávez A, Bonfil G, Aguirre BG, Cravioto J, de la Vega DJ. La desnutrición del mexicano. México: Testimonios del Fondo de Cultura Económica; 1974. p. 64.
41. Avila CA, Shamah LT, Galindo GC, Rodríguez HG, Barragán HLM. La desnutrición infantil en el medio rural mexicano. Salud Publica Mex 1998; 40: 150-60.
42. Villalpando S, Flores-Huerta S, Hernández-Beltrán MJ, Ramírez-Grande ME. Nutritional status of nationwide sample of rural Mexican populations. Rev Invest Clin Mex 1992; 44: 21-30.
43. Sepúlveda-Amor J, Lezana MA, Tapia-Conyer R, Valdespino JL, Madrigal H, Kumate J. Estado nutricional de preescolares y mujeres en México: resultados de una encuesta probabilística nacional. Gac Med Mex 1990; 126: 207-24.
44. Chávez M, Chávez A, Díaz MC. Los programas de educación nutricional en el medio rural. Salud Publica Mex 1969; 11: 83-92.
45. Madrigal FH. Vigilancia de la nutrición en México. Cuadernos de Nutrición 1986; 1: 33-41.
46. Chávez A, Martínez C, Martínez H. El impacto de la desnutrición en el desarrollo individual y colectivo. México: Nutrición y Comunidad INNSZ; 1990. p. 1-9.
47. Barquera S, Rivera DJ. Políticas y programas de alimentación y nutrición en México. Documento otorgado por el autor; 1999. p. 26.
48. Flores AA, Gómez CG, Suárez CJ. Desnutrición en áreas rurales marginadas de la República Mexicana: epidemiología y programa de control. Salud Publica Mex 1987; 29: 293-8.
49. Avila CA, Chávez VA, Shamah LT, Madrigal FH. La desnutrición infantil en el medio rural mexicano: análisis de las encuestas nacionales de alimentación. Salud Publica Mex 1993; 35: 658-66.
50. Comisión de Distribución y Manejo de Bienes de Consumo y Servicios de la Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Audiencias Públicas sobre El Problema de la Alimentación en México, Dr. Salvador Zubirán. México: H. Cámara de Diputados LV Legislatura; 1993. p. 25-7.
51. Lastra ELG, Roldan FSG, Hernández ME, Hernández TAP, Lechuga PFG. Prevalencia de desnutrición en menores de cinco años de Tabasco. Salud Publica Mex 1998; 40: 408-14.
52. Aguirre AJ, Escobar PM, Chávez VA. Evaluación de los patrones alimentarios y la nutrición en cuatro comunidades rurales. Salud Publica Mex 1998; 40: 398-407.
53. Sistema Nacional para el Desarrollo Integral de la Familia. II Censo Nacional de Talla, 1994. México, DF: DIF/SEP; 1997.
54. Poder Ejecutivo Federal. México: Programa de educación, salud y alimentación (Progresá); 1997. p. 68.
55. Secretaría de Desarrollo Social. Progresá. Más oportunidades para familias pobres. México: Evaluación de resultados del programa de educación, salud y alimentación; 1999. p. 267-98.