

Impacto de la biología molecular y las nuevas tecnologías en el conocimiento de la función celular y sus aplicaciones



Coordinadores:
Francisco Fierro Fierro
Marcela Onofre Vergara



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo UNIDAD XOCHIMILCO División de Ciencias Biológicas y de la Salud



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Rector General

Dr. Enrique Fernández Fassnacht

Secretaria General

Mtra. Iris Edith Santacruz Fabila

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-XOCHIMILCO

Rector

Dr. Salvador Vega y León

Secretaria

Dra. Beatriz Araceli García Fernández

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Director

Dr. Fernando de León González

Secretaria Académica

M. en C. Georgina Urbán Carrillo

Responsable del Programa Editorial

Lic. Zyanya Patricia Ruiz Chapoy

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL

Jefa del Departamento

Dra. Ana María Rosales Torres

Coordinadora de Tronco Divisional

M. en S. Nora Rojas Serrania

Revisores externos

Dra. Florina Ramírez Vives

Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell

"Impacto de la biología molecular y las nuevas tecnologías en el conocimiento de la función celular y sus aplicaciones"

Primera edición: 2012

ISBN: 978-607-477-560-0

D.R. © UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

Calzada Del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Del. Coyoacán

C.P. 04960, México, D.F., Tel.: 54 83 70 00 ext. 3783

© Derechos Reservados por los autores

Impreso y hecho en México

Alteraciones a nivel celular e inmunofenotipo en niños desnutridos

*Dra. Oralia Nájera Medina
Dra. María Cristina González Torres*

Introducción

La desnutrición calórico-proteica es un problema de Salud Pública que afecta principalmente a niños preescolares haciéndolos más susceptibles a las infecciones por eso a estos niños se les considera como inmunodeprimidos (Chandra, 1991).

Con el interés de dilucidar algunos de los factores que intervienen en la inmuno-supresión de los niños desnutridos, se han desarrollado diversos trabajos de investigación para explorar diferentes aspectos a nivel celular que puedan explicar sus efectos en estos niños. Para el desarrollo de estos trabajos se han utilizando varias técnicas de laboratorio como son:

- A.** Citometría de flujo, para la caracterización del inmunofenotipo y detección de células CD4 con funciones de memoria (células que han entrado en contacto con los antígenos) y linfocitos con funciones efectoras (células encargadas de la defensa del organismo ante un agente infeccioso).
- B.** Ensayo del cometa, técnica que permite indagar sobre los posibles daños que puede presentar el material genético.
- C.** Técnicas de biología molecular para estudiar algunos aspectos moleculares, como son la expresión de genes en estos niños.

A. Inmunofenotipo en niños desnutridos

Desde hace varios años se ha venido trabajando sobre el tema de la inmunidad mediada por células en niños desnutridos. La investigación se ha centrado principalmente en el estudio de las subpoblaciones de linfocitos en niños desnutridos infectados; lo que ha permitido estudiar también estas subpoblaciones en niños bien nutridos con infecciones y en niños bien nutridos sin infección; estos grupos de estudio permiten, por un lado analizar los cambios que propicia

la presencia de la infección en las subpoblaciones de linfocitos, y por otro, las diferencias que se pueden encontrar por la presencia de la desnutrición. Además ha sido necesario para la realización de este trabajo, definir los parámetros de referencia de estas subpoblaciones en niños sanos.

Este trabajo se ha realizado con la ayuda de técnicas de laboratorio como la citometría de flujo (CF), la que gracias al empleo de anticuerpos monoclonales de diferente especificidad conjugados con fluorocromos, permite identificar varias características a nivel celular: tamaño, forma y complejidad interna, así como características funcionales. Su eficacia y precisión ha incrementado el uso de esta técnica tanto en los laboratorios de investigación básica como en los laboratorios clínicos (Barrera et al., 2004).

La citometría constituye un complemento valioso de las técnicas clásicas utilizadas para el estudio de la morfología, biología y bioquímica celular. Además, en comparación con los métodos bioquímicos de análisis celular, en los que se obtiene un resultado promedio para toda la muestra, la CF es capaz de proporcionar información cuantitativa sobre cada célula en particular y permite identificar en una muestra subpoblaciones de células diferentes, incluso cuando están escasamente representadas. Además la citometría ha demostrado tener muchas diversas aplicaciones en el área de la genética (Ortiz et al., 2006a).

Para que el citómetro pueda medir las diferentes características de la célula requiere de los siguientes sistemas:

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.

Para la interpretación de los datos se obtienen gráficas de puntos, a través de las cuales primero se regionaliza, para que a partir de la región se adquieran los datos de las diferentes subpoblaciones. Las regiones pueden ser del total de los linfocitos o de una subpoblación específica (Figura 1).

A partir de la regionalización se pueden analizar las subpoblaciones de linfocitos con las gráficas de puntos que se muestran en la Figura 2.

Los principales hallazgos derivados del estudio en los grupos de trabajo se señalan considerando primero los encontrados en el grupo testigo, posteriormente a los niños con infecciones para terminar con los hallazgos en los niños desnutridos infectados.

1. Grupo testigo (niños bien nutridos)

a) Se encontró a nivel de leucocitos (linfocitos, granulocitos y monocitos) que los niños recién nacidos y hasta la edad de 4 años presentan variaciones en su porcentaje, de tal manera

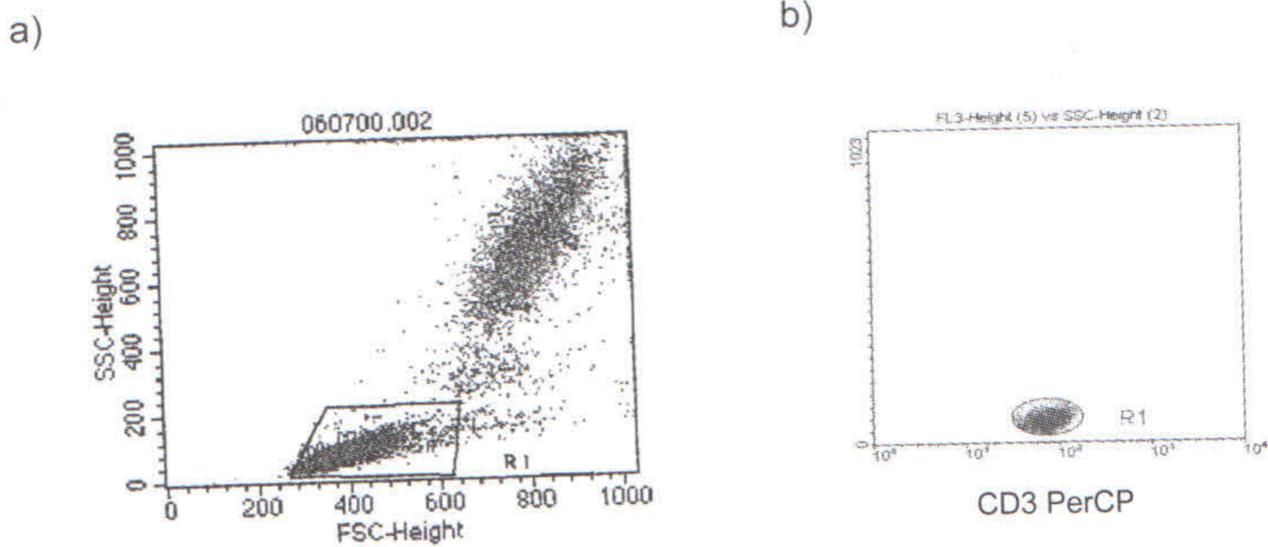


Figura 1. a) Gráfica de puntos (FSC contra SSC) para definir la región R1 (total de linfocitos); b) gráfica de puntos (FL-3 contra SSC) para definir subpoblaciones específicas (linfocitos CD3⁺, CD4⁺ etc.).

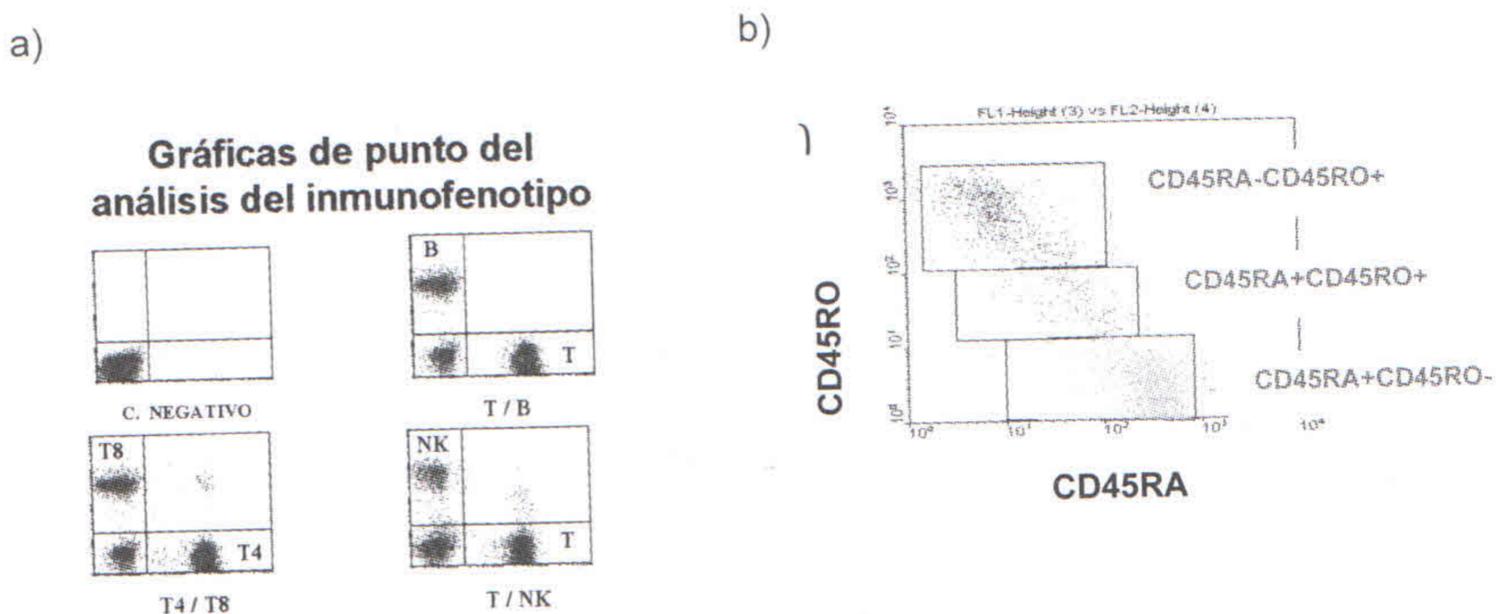


Figura 2. a) Gráficas de puntos con las diferentes subpoblaciones linfocitarias, por medio de cuadrantes y b) gráficas de puntos con las células vírgenes (CD45RA) y de memoria (CD45RO).

que a los 4 años se podría considerar que alcanzan su madurez, dado que sus valores se acercan al de los adultos. En los niños estudiados se observaron diferencias relacionadas con el sexo sólo en los granulocitos (Nájera et al., 2003).

b) En las subpoblaciones 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, asiáticos ni en otros grupos raciales (Huenecke et al., 2008; Ilkincioğullari et al., 2004; Llovera y Solano, 2004). Asimismo, se consideró que el grupo control alcanzó la madurez y la expansión de sus subpoblaciones 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 (Nájera et al., 2003).

c) En las células vírgenes y de memoria a nivel del total de linfocitos y dentro de las células CD4⁺ se encontraron diferencias de acuerdo a la edad, conforme los niños son de mayor edad, las células vírgenes disminuyen y las células de memoria aumentan. Además se encontraron diferencias vinculadas a la edad en las células CD4⁺CD45RA⁺/CD45RO⁺ (dobles positivas) (Nájera et al., 2003), considerando este dato como otra probable relación con la raza, dado que tampoco ha sido señalado para asiáticos y caucásicos (Osugi et al., 1995; Huenecke et al., 2008).

d) En la activación *in vitro* de las subpoblaciones de linfocitos T CD3⁺ se observaron claras diferencias en la capacidad de respuesta ante la presencia del mitógeno, entre niños menores y mayores de tres años. Los niños menores de tres años presentaron una menor proporción de células activas (Nájera et al., 2003). En la figura 4 se muestran los anticuerpos utilizados para el estudio de estas células.

Los hallazgos antes mencionados en subpoblaciones de linfocitos y en el ámbito de leucocitos confirman que los niños menores de tres años presentan rasgos de inmadurez de su sistema inmunológico tanto a nivel celular como funcional. Los rasgos más evidentes de inmadurez funcional fueron la baja proporción de células activadas aunada a la baja proporción de células de memoria con relación a los niños mayores de tres años (Nájera et al., 2003).

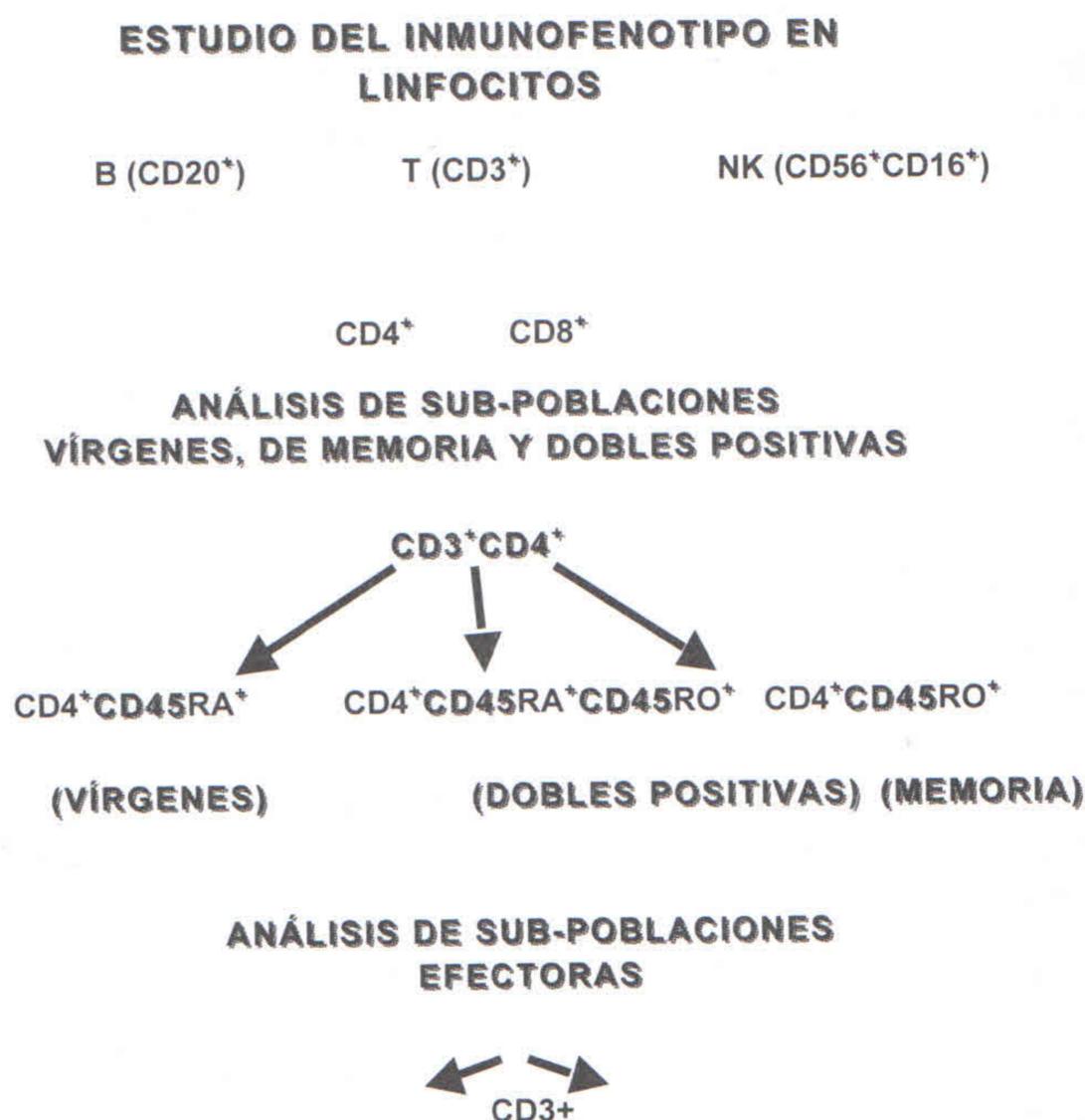


Figura 3. Principales fenotipos de linfocitos determinados en los grupos de estudio en sangre periférica.

2. Grupo de niños bien nutridos infectados

a) En los niños bien nutridos infectados (BNI), se observó que ante la presencia de infección, en sangre periférica tienden a disminuir los linfocitos $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ y aumentar las células $CD19^+$ y/o $CD20^+$ (linfocitos B) con relación a niños sanos. La disminución de los linfocitos T y el incremento de los linfocitos B son hallazgos importantes que muestran los cambios a nivel periférico de las subpoblaciones de linfocitos como respuesta ante la infección (Nájera et al., 2004). En pacientes pediátricos con infecciones respiratorias recurrentes también se ha encontrado porcentaje alto de linfocitos B ($CD5^+/CD20^+$) y disminución de monocitos ($CD11c^+/CD18^+$) (Wasik et al., 2005).

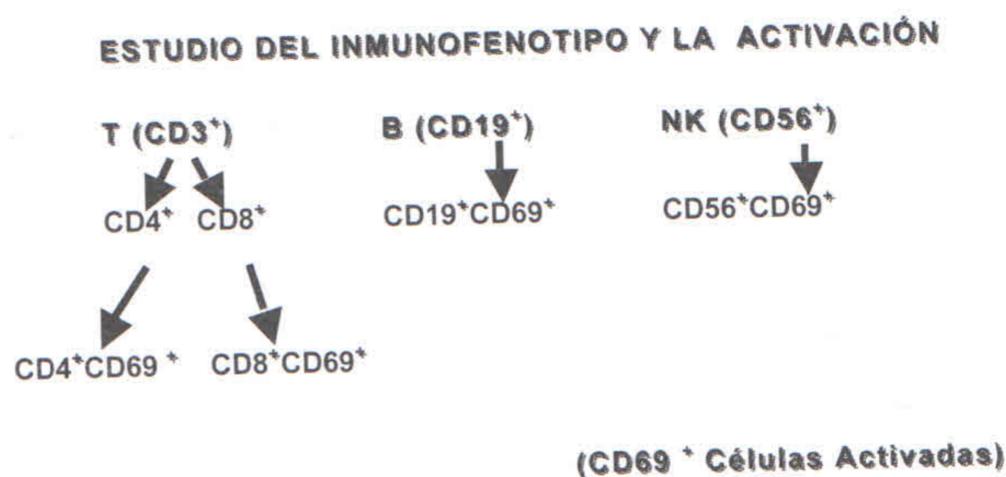


Figura 4. Inmunofenotipo de linfocitos activados

b) Los niños bien nutridos infectados presentaron en las células $CD4^+CD45RO^+$ (memoria) un aumento y una disminución de las células $CD4^+CD45RA^+$ (vírgenes) con relación a niños sanos, que orientan sobre un buen funcionamiento de la capacidad de los linfocitos T $CD4^+$ para diferenciarse de células vírgenes a células de memoria, como un mecanismo de defensa del organismo ante la infección (Nájera et al., 2001b). Así mismo, al analizar células con funciones efectoras de tipo ayudadoras ($CD4^+CD62L^-$) y citotóxicas ($CD8^+CD28^-$) se encontró que estas células se encuentran aumentadas con relación a niños sanos, evidenciando en estos niños que ante la presencia de una infección la presencia de estas células son necesarias para la defensa del organismo ante agentes patógenos (Nájera et al., 2007). Las células efectoras son capaces de producir citocinas y de generar mecanismos inmunológicos necesarios para la defensa del organismo (Williams and Bevan, 2007).

c) En el caso de la activación *in vitro*, se observó un aumento significativo de respuesta a los mitógenos en el total de los linfocitos T ($CD3^+$) y en los $CD8^+$ con relación a niños sanos. Este dato puede orientar al aumento de respuesta celular ante la infección (Nájera et al., 2001a).

De acuerdo a la información antes mencionada, la presencia de infecciones desarrolla cambios en las subpoblaciones de linfocitos que permiten al sistema inmunológico reaccionar ante el daño. Una subpoblación importante fue la presencia de altos porcentajes de células de

memoria ($CD4^+CD45RO^+$), células que son capaces de producir citocinas y ejercer funciones efectoras (Lanzavecchia and Sallusto, 2005). Al indagar la presencia de células con funciones efectoras ($CD4^+CD62L^-$ y $CD8^+CD28^-$) se encontró que se encuentran aumentadas en niños infectados en comparación a niños sanos, evidenciando lo que podríamos considerar como un buen funcionamiento del sistema inmunológico. Además, estas células se encuentran "sensibilizadas", dado que pueden reaccionar rápidamente ante cualquier estímulo, en este caso se utilizó un mitógeno, observando que un mayor porcentaje de células se activaron en los niños infectados en comparación a los niños sanos. Estos datos orientan a la movilización y acción que desarrolla el sistema inmunológico ante una infección. Es importante señalar que estos datos (sobre células de memoria, efectoras y la capacidad de activación) no habían sido reportados en la literatura internacional.

3. Grupo de niños desnutridos infectados

a) En los niños desnutridos ante la presencia de infecciones sus subpoblaciones 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 no descrito previamente con relación a la desnutrición (Nájera et al., 2004).

b) Los niños desnutridos infectados mostraron una disminución significativa en las células de memoria ($CD4^+CD45RO^+$), con aumento de la fracción de células dobles positivas ($CD4^+CD45RA^+/CD45RO^+$) con relación a los niños bien nutridos infectados, lo que fue interpretado como una alteración o retardo en la funcionalidad (diferenciación) de estas células (Nájera et al., 2001b). Además al estudiar la presencia de células con funciones efectoras ($CD4^+CD62L^-$ y $CD8^+CD28^-$) éstas se encontraron disminuidas con relación a niños bien nutridos infectados (Nájera et al., 2007).

c) Además, se encontró una importante disminución en la activación/ funcionalidad de las subpoblaciones de linfocitos T ($CD3^+$, $CD4^+$ y $CD8^+$), en los niños con desnutrición ante la presencia de un mitógeno *in vitro*, ya que no son capaces de responder ante el estímulo, comparada con la respuesta de los niños bien nutridos con infección, se comportan como los niños sanos (Nájera et al., 2001a).

Los cambios encontrados en los linfocitos B ($CD19^+$ y/o $CD20^+$), en las células de memoria, las dobles positivas, en células con funciones efectoras y en la activación, son hallazgos importantes que pueden contribuir a entender la causa de la inmunodepresión observada en los niños desnutridos. Además se pudo constatar estas mismas alteraciones tanto en niños con desnutrición de tercer grado como de segundo grado; esto último no se había señalado en la literatura internacional, dado que se señalan alteraciones solo en niños desnutridos de tercer grado.

Así mismo, se encontraron diferencias de acuerdo al grado y tipo de desnutrición: En los niños con desnutrición tipo kwashiorkor, las células que mostraron más dificultad en la activación

fueron en los linfocitos totales (CD3⁺) y los CD8⁺; en cambio, los niños con segundo grado de desnutrición presentaron mayor dificultad en el cambio de células CD4⁺ de vírgenes a células de memoria al presentar el porcentaje más alto de células dobles positivas (CD4⁺ CD45RA⁺ /CD45RO⁺). 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, el análisis de los isotipos CD45RO (memoria) y CD45RA/CD45RO (dobles positivas) en los linfocitos CD4⁺, y el de células efectoras (CD4+CD62L- y CD8+CD28-) podrían ser las causas de la inmunosupresión en los desnutridos.

B. Daños en el material genético de niños desnutridos

Otros estudios que se han realizado tratando de entender la inmunodeficiencia que presentan los niños desnutridos, fue evaluar si la desnutrición podría estar relacionada con un incremento en la cantidad de rompimientos de cadena doble y de cadena sencilla de las moléculas de ADN, dado que ya había antecedentes de que la desnutrición induce daño al ADN, lo que se determinó por la presencia en linfocitos de estos niños de aberraciones cromosómicas y de intercambio de cromátidas hermanas (Betancourt et al., 1979; Ortiz et al., 2004). Para poder trabajar en esta parte de la investigación se utilizó el ensayo cometa.

El ensayo cometa o electroforesis unicelular detecta fundamentalmente rompimientos de cadena sencilla inducidos en la molécula de ADN y ha mostrado ser sensible para evaluar el daño al ADN causado por diversos agentes (Tice, 1995). Con esta técnica también se detectan rompimientos de cadena doble, así como daños en regiones sensibles al álcali, y sitios incompletamente reparados por escisión de bases o de nucleótidos, en estos dos últimos casos un nivel alto de rompimientos puede indicar, tanto daño como reparación eficiente. Esta metodología tiene diversas ventajas: se requiere una cantidad pequeña de muestra para realizarse, es factible evaluar el daño al ADN en células no proliferantes, el análisis se efectúa en células individuales, se puede realizar en diferentes tipos celulares, en diversas especies y es además relativamente simple y rápida (Ortiz et al., 2006b).

En esta técnica las células se colocan dentro de un gel de agarosa sobre un portaobjetos, posteriormente son sometidas a un campo eléctrico, en una cámara de electroforesis horizontal, por poco tiempo bajo condiciones alcalinas. Los núcleos son teñidos con bromuro de etidio para medir la longitud de migración del ADN en el microscopio de fluorescencia utilizando el analizador de imágenes. En la Figura 5 se muestran las imágenes que se pueden observar en el microscopio de fluorescencia.

Dentro de la línea de investigación de “Efectos de la desnutrición a nivel celular” los principales hallazgos que se detectaron fueron:

a). En leucocitos de niños desnutridos se observó un incremento en los niveles de daño y además por primera vez se señaló que las infecciones graves y los medicamentos podrían influir en el

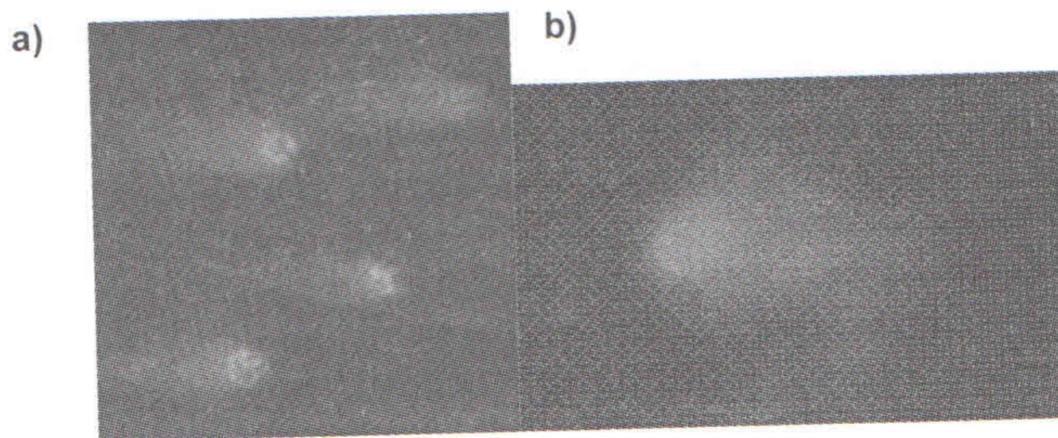


Figura 5. Cometa donde la longitud de la cauda evidencia daño al ADN.

incremento de los niveles de daño al ADN en niños sanos y desnutridos ambos con infección (Betancourt et al., 1995; González et al., 2002a).

b) Con el mismo método se determinó que los linfocitos de niños desnutridos después de la inducción de daño al ADN con peróxido de hidrógeno, tienen una menor capacidad para repararlo comparados con los niños bien nutridos con infección (González et al., 2002b).

La mayor cantidad de daño en la molécula de ADN y la incapacidad para reparar este daño, en los linfocitos de niños desnutridos podría relacionarse con la deficiente respuesta inmunológica observada en ellos, ya que los linfocitos son células que tienen una función primordial en la respuesta inmunológica de tipo específica. El alto nivel de daño en el ADN podría interferir con la correcta expresión de los genes de los niños desnutridos.

C. Estudios a nivel molecular en niños desnutridos

El siguiente nivel de estudio se derivó de los resultados del incremento de daño al ADN, ya que se consideró importante evaluar si la expresión génica se encontraba alterada en los niños con desnutrición.

Para estudiar la expresión de genes en linfocitos de niños desnutridos se han utilizado dos estrategias experimentales:

- a) Análisis diferenciales.
- b) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

a) Para los análisis diferenciales se trabajó con la siguiente metodología: 1) Se aislaron linfocitos de sangre periférica usando Linfograd (Microlab, México); 2) Los linfocitos fueron lisados mediante la técnica de congelación-descongelación, la que se aplicó dos veces; 3) El RNA mensajero fue retrotranscrito (RT), para producir cDNA; 4) Posteriormente los cDNAs fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* y fueron ligados al vector Lambda Zap III (Stratagene, La Jolla, CA); 5) El primer análisis de expresión diferencial fue realizado con

autoradiografía y la confirmación de la identidad de los clones fue obtenida por Southern blot. 4) Las clonas de cDNA fueron secuenciadas usando el secuenciador Perkin Elmer (Wellesley), la base de datos usada fue la de la National Center for Biotechnology Information, usando el servidor BLAST algorithm [Glitschul et al., 1990].

Los resultados fueron: Después de analizar 12,000 clonas, se encontraron 16 genes en los linfocitos de los niños desnutridos con expresión claramente diferencial, de los cuales 15 estaban sub-expresados y uno sobre-expresado con relación a niños bien nutridos infectados. Los genes fueron secuenciados e identificados, observando que nueve de los 16 genes sub-expresados, correspondían a una proteína relacionada con el metabolismo mitocondrial (metaxina) y uno más a la proteína 451 con estructura de dedos de zinc que al parecer está relacionada con el control de la transcripción (González et al., 2006).

Estos datos fueron interpretados como que la desnutrición calórico-proteica está relacionada con la sub-expresión o sobre-expresión de los genes relacionados con la función mitocondrial, y con el desarrollo y diferenciación celular.

b) La PCR en tiempo real se ha realizado utilizando sondas TaqMan en un termociclador de tiempo real (marca Light Cycler). Para hacer el ensayo se obtuvieron muestras de cDNA con la misma metodología descrita previamente. Se diseñaron los oligonucleótidos para evaluar la expresión de los genes de Interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10, Factor de Necrosis Tumoral (TNF) e Interferón gama (IFN γ).

Los resultados mostraron que hay disminución en los linfocitos de los niños desnutridos infectados de la expresión de los genes de IL-2, IL-6, e IFN y un aumento en la expresión de IL-4, IL-10 y TNF con relación a niños bien nutridos infectados (González-Martínez et al., 2008). Estos resultados claramente están relacionados con alteraciones en la respuesta inmunológica de los niños desnutridos. La disminución de la expresión de dos genes relacionados con la respuesta T1 (IL-2 e IFN γ), evidencia una alteración en la respuesta T1/T2 y puede explicar las alteraciones observadas en la respuesta celular de los niños desnutridos y su dificultad para erradicar infecciones.

Cabría señalar que nuestros estudios sobre la expresión de genes en niños desnutridos con infección, son los primeros de este tipo que se publican a nivel internacional.

Referencias

- Barrera RLM, Drago SME, Pérez RJ, Zamora A C, Gómez F, Sainz TR, Mendoza F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 17: 42-55.
- Betancourt M, Hernández G, Cravioto J. (1979). Essential aminoacids deficiency and the production of chromosomal anomalies. *Rev Invest Clin;* 31: 45-52.
- Betancourt M, Ortiz R, González C, Pérez P, Cortés L, Rodríguez L, Villaseñor L. (1995). Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutation Res* 331:65-77.

- Chandra RK. (1991). Nutrition and immunity: lesson from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr*; 53: 1087-101.
- Gltschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- González C, Nájera O, Cortés E, Toledo G, López L, Betancourt M, Ortiz R. (2002a). Susceptibility to DNA damage induced by antibiotics in lymphocytes from malnourished children. *Teratog Carcinog Mutagen* 22: 147-158.
- González C, Nájera O, Cortés E, Toledo G, López L, Betancourt M, Ortiz R. (2002b). "Hydrogen peroxide-induced DNA damage and DNA repair in lymphocytes from malnourished children". *Environ Mol Mutagen* 39: 33-42.
- González MH, Rodríguez L, Nájera O, Cruz D, Miliar A, Domínguez A, Sánchez F, Granel J, González TMC. (2008). Expression of cytokine mRNA lymphocytes of malnourished children. *J Clin Immunol*: (en prensa)
- González TMC, González MH, Rodríguez CL, Cortés ML, Nájera MO, De la Cruz HF, Flores NRL, Bonilla GE. (2006). Differential gene expression in lymphocytes from malnourished children. *Cell Biol International*; 30: 610-614.
- Huenecke S, Behl M, Fadler C, Zimmermann SY, Bochnnek K, Tramsen L, Esser R, Klarmann D, Kamper M, Sattler A, von Laer D, Klingebiel T, Lehrnbecher T, Koehl U. (2008). Age-matched lymphocyte subpopulation reference values in childhood and adolescence: application of exponential regression analysis. *Eur J Haematol*; 80 (6): 532-539.
- Ikinciogullari A, Kendirli T, Dogu F, Egin Y, Reisli I, Cin S, Babacan E. (2004). Peripheral blood lymphocyte subsets in healthy Turkish children. *Turk J Pediatr*; 46 (2): 125-30.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. (2005). Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*; 17: 326-332.
- Llovera D, Solano RL. (2004). Lymphocyte subpopulations in preschool Venezuelan children of high socioeconomic status. *Arch Latinoam Nutr*; 54 (2):196-202.
- Nájera O, González C, Toledo G, Cortés E, López L, Betancourt M, Ortiz R. (2001a). Early activation of T, B and NK lymphocytes in infected malnourished and infected well-nourished children. *J Nutri Immunol*; 5 (3/4): 85-97.
- Nájera O., González C., Toledo G., Cortés E., López L., Betancourt M, Ortiz R. (2001b). CD45RA and CD45RO isoforms in infected malnourished and infected well-nourished children. *Clin Exp Immunol*; 126: 461-465.
- Nájera O, González C, Cortés L, Toledo G, Preciado A, Ortiz R. (2003). Cambios de las subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica y de su capacidad de activación en niños preescolares sanos. Estudio por medio de citometría de flujo. *Bol Med Hosp Infant Mex*; 60: 145-157.
- Nájera O, González C, Toledo G, López L, Ortiz R. Flow cytometry study of lymphocyte subsets in malnourished and well nourished children with bacterial infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 577-580.
- Nájera O, González C, Cortés E, Toledo G, Ortiz R. (2007). Effector lymphocyte in well-nourished and malnourished infected children. *Clin Exp Immunol*; 148: 501-506.
- Ortiz R, Medina H, Rodríguez, González MH, Cortés E. (2004). Spontaneous and Mitomycin C-induced micronuclei in peripheral blood reticulocytes from severely malnourished rats. *Environ Mol Mutagen* 43:179-185.

- Ortiz R, Cortés L, Rodríguez L, Rodríguez E, Nájera O, Cortés E. (2006a). Estudios con Citometría de Flujo: Inmunofenotipo, Proliferación, Diferenciación, Muerte Celular y Análisis de ADN. En: Pimentel P.A.E., Ortiz M.A.R. Breña V.M. Tópicos de Genética. Publicado por la Universidad Autónoma del Estado de México y la Sociedad Mexicana de Genética. México, D. F., pp. 345-366.
- Ortiz R, Rodríguez L, Cortés E, Nájera O, Medina H, González CE. (2006b). Estudios Citogenéticos y sobre el material Genético en Desnutrición En: Pimentel P.A.E., Ortiz M.A.R. Breña V.M. Tópicos de Genética. Publicado por la Universidad Autónoma del Estado de México y la Sociedad Mexicana de Genética. México, D. F., pp. .
- Osugi Y, Hara J, Kurahashi H, Sakata N, Inoue M, Yumura YK, Kawa HK, Okada S, Tawa A. (1995). Age-related changes in surface antigens on peripheral lymphocytes of healthy children. *Clin Exp Immunol*; 100: 543-548.
- Tice RR. (1995). The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. En: Phillips D.H., Vennit S. *Environ Mutagen*: 312-339.
- Wasik M, Kaczorowska M, Demkow U. (2005). Altered expression of immune surface markers in children with recurrent infections of respiratory tract. *J Physiol Pharmacol*; 56 (4): 237-243.
- Williams MA, Bevan MJ. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol*; 25: 171-192.