

6 / 2EJEM

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

*“Efecto de una desnutrición proteica
en la respuesta inmune durante la infección
murina de *Taenia crassiceps*”*

TESIS

*que para obtener el grado académico de Licenciada en
Investigación Biomédica Básica*

Presenta:

AMARANTA RIVAS CARVALHO

Director de Tesis: DR. MARCO ANTONIO JOSÉ VALENZUELA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

275551

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

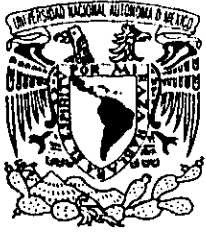


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
APARTADO POSTAL 70228
CIUDAD UNIVERSITARIA
04510 MEXICO, D.F.

Marzo 25, 1999.

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA
P R E S E N T E .

Por medio de la presente le informamos que la tesis "Efecto de una desnutrición protéica en la respuesta inmune durante la infección murina de *Taenia crassiceps*", que presenta la alumna AMARANTA RIVAS CARVALHO con número de cta. 9352551-0, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado damos nuestro voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

Atentamente,

Dr. Carlos Rosales Ledezma

Dr. Armando Tovar Palacios

Dr. Marco Antonio José Valenzuela

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Dra. Gladis Frago González

GRACIAS!

Al Dr. Marco José, por su dirección en el desarrollo de éste trabajo.

A mis sinodales: Dr. Carlos Rosales, Dr. Armando Tovar, Dra. Leticia Rocha y Dra. Gladis Fragoso, por sus valiosas aportaciones y sugerencias a éste trabajo.

A Nanda y a Nachito, por su muy importante participación en los experimentos.

A Tzipe, por su excelente ayuda en el análisis estadístico.

A la Lic. Chancla, por el zorro.

Al Dr. Jorge Calderón, mi primer formador en el camino de la ciencia y un gran "papá académico".

A la Dra. Yankelevich, la mejor maestra en éste arte.

A Tellez, por la amistad franca y honesta que tantas veces me a demostrado.

A Mayito, quien tantas veces me ha ayudado a desenredar mis embrollos.

Al Puchunguito, quien me ha acompañado, apoyado y ayudado en todo éste tiempo como mi mejor equipo, compañero y amigo, desde el primer día en la UNAM, hasta el último.

A todos los compañeros y amigos, que de una u otra manera han sido parte de este logro.

A la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas por toda su ayuda.

Al bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas por las facilidades prestadas.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

MUCHAS GRACIAS!

***A Marthita y a Chemo
quienes con su infinito amor
me han dado la vida
y todo lo que en ella tengo
sin ustedes esto no sería posible
Los Amo Mucho.***

***A mis hermanos, Pepe y Carla
parte importante de mi espacio y de mi
tiempo.***

INDICE

TABLA DE ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
▪ Los Céstodos y <i>Taenia crassiceps</i>	5
▪ El sistema Inmune.....	7
▪ La Nutrición y la Respuesta Inmune.....	11
OBJETIVOS.....	14
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	15
▪ Diseño de los Grupos Experimentales.....	15
▪ Inoculación.....	15
▪ Evaluación de la Carga Parasitaria.....	16
▪ Obtención de las Células del Bazo.....	16
▪ Ensayos ELISAs.....	18
▪ Soluciones Utilizadas.....	21
RESULTADOS.....	22
▪ Efecto de la Dieta Hipoproteica sobre el Peso Corporal.....	22
▪ Efecto de la Dieta Hipoproteica sobre la Carga Parasitaria.....	23
▪ Efecto de la Dieta Hipoproteica sobre la Proliferación Celular.....	27
▪ Efecto de la Dieta Hipoproteica sobre los Niveles de Citocinas.....	33
▪ Citocinas de la Respuesta TH1.....	33
▪ IL-2.....	33
▪ IFN- γ	36
▪ IL-12.....	39
▪ Citocinas de la Respuesta TH2.....	42
▪ IL-4.....	42

▪ IL-6.....	44
▪ IL-10.....	46
▪ Citocina Indicadora de Nutrición.....	49
▪ TNF- α	49
▪ Análisis Estadístico.....	51
▪ Cargas Parasitarias.....	52
▪ Proliferación Celular.....	54
▪ Citocinas de la Respuesta TH1.....	57
▪ Citocinas de la Respuesta TH2.....	62
▪ Citocina Indicadora de Nutrición.....	67
▪ Peso Corporal de los Animales.....	68
▪ Resumen de Resultados.....	69
 DISCUSIÓN.....	 71
 CONCLUSIONES.....	 77
 APÉNDICE.....	 78
▪ Estadística.....	78
▪ Análisis de Varianza.....	79
▪ Análisis de Tukey.....	84
▪ Prueba de X^2 -cuadrada.....	85
 BIBLIOGRAFÍA.....	 87

TABLA DE ABREVIATURAS

<i>Células asesinas naturales</i>	NK
<i>Cuadrado medio de los tratamientos</i>	MST
<i>Cuadrado medio del error</i>	MSE
<i>Cuentas por minuto</i>	cpm
<i>Diferencia mínima significativa honesta</i>	DMSH
<i>Etcétera</i>	etc.
<i>Factor de necrosis tumoral</i>	TNF
<i>Figura</i>	Fig.
<i>Grado Centígrado</i>	°C
<i>Grados de libertad</i>	df
<i>Inmunoglobulina</i>	Ig
<i>Tamaño del inóculo inicial</i>	λ
<i>Interferón</i>	IFN
<i>Interleucina</i>	IL
<i>Linfocitos T ayudadores tipo 1</i>	TH1
<i>Linfocitos T ayudadores tipo 2</i>	TH2
<i>Linfocitos T vírgenes periféricos</i>	TH0
<i>MicroCurie</i>	μ Ci
<i>microgramo</i>	μ g
<i>microlitro</i>	μ l
<i>mililitro</i>	ml
<i>minuto</i>	min.
<i>nanómetro</i>	nm
<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
<i>Página</i>	Pag.
<i>picogramo</i>	pg
<i>Semana</i>	sem.
<i>Suma de cuadrados de los tratamientos</i>	SST
<i>Suma de cuadrados del error</i>	SSE
<i>Taenia crassiceps</i>	<i>T. crassiceps</i>

RESUMEN

Históricamente, las enfermedades parasitarias han sido uno de los grandes problemas de la salud humana. En la actualidad alrededor del 30% de la población mundial se encuentra infectada por algún parásito. De hecho, las enfermedades respiratorias y las diarreas son las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, seguidas por las parasitosis causadas por protozoarios y helmintos.

En los países en vías de desarrollo, el problema de las parasitosis se agrava por la ausencia de una buena nutrición; desarrollándose de esta manera un sinergismo entre la malnutrición y las infecciones parasitarias (Keymer, 1983).

Durante las infecciones por helmintos el huésped monta una respuesta inmune celular (Bojalil, 1993). Así dado que la desnutrición proteica afecta principalmente la inmunidad celular (Chandra, 1991), es de esperarse que una desnutrición proteica tenga un efecto en el desarrollo de las infecciones helmínticas.

*Para evaluar el efecto de la desnutrición proteica en la respuesta inmune durante una infección helmíntica, se escogió como modelo experimental la infección murina de *Taenia crassiceps*. A la infección se le dió un seguimiento de doce semanas, en las cuales se midió la carga parasitaria, se midió la proliferación de células de bazo bajo dos diferentes estimulaciones (concanavalina A y extracto de antígenos totales del cisticerco de *Taenia crassiceps*), y se midió la concentración de citocinas relacionadas tanto con la respuesta inmune tipo TH1, como con la respuesta inmune tipo TH2.*

*Se encontró que la deficiencia proteica tiene un efecto en la infección, disminuyendo la carga parasitaria de los animales mal nutridos. Disminuye también la proliferación de células del bazo bajo la estimulación con concanavalina-A. No se encontró efecto de la dieta hipoproteica cuando la estimulación era con el extracto de antígenos totales del cisticerco de *Taenia crassiceps*. La dieta tampoco tiene efecto en el tipo de respuesta inmune, encontrándose una respuesta tipo TH2 en todos los animales infectados, pero la deficiencia proteica reduce la concentración de citocinas, siendo ésta menor en los animales mal nutridos que en los animales normal nutridos.*

INTRODUCCIÓN

LOS CÉSTODOS

Los céstodos, también llamados taenias son parásitos con forma de gusanos aplanados que viven en el intestino de sus huéspedes (Schmidt, 1989). Los céstodos son una clase del phylum Platyhelminthes. Sus cuerpos se caracterizan por ser aplanados y en forma de listón. Vivos son de color blanco o amarillento. Su cuerpo está formado por un órgano anterior de adhesión ó escólex, seguido de una cadena de segmentos o proglótidos llamada estróbilo. El estróbilo crece durante toda la vida de la taenia mediante la proliferación de nuevos proglótidos en la región inmediatamente posterior al escólex. El escólex posee en su posición central una estructura que se alarga llamada rostelo. Los nuevos

Taenia crassiceps.

La *Taenia crassiceps*, es un céstodo que pertenece al phylum Platyhelminthes y a la clase Cestoidea. La *T. crassiceps* es del orden Cyclophyllidea y de la familia Taeniidae. Como su nombre lo indica, pertenece al género *Taenia* y a la especie *crassiceps*.

segmentos son inmaduros, los segmentos maduros son más grandes que los inmaduros y están cerca de la mitad de la cadena; cada segmento maduro contiene uno o dos órganos reproductores femeninos y/o masculinos. La porción terminal del estróbilo, contiene segmentos maduros o grávidos que suelen estar llenos de huevos; éstos se encuentran dentro del útero del céstodo.

Los gusanos adultos viven en el intestino delgado de sus huéspedes, adheridos a la mucosa, carecen de aparato digestivo, se alimentan por absorción mediante un órgano con cuatro ventosas musculares en forma de copa en el escólex (Markell, 1981).

En su etapa adulta, *T. crassiceps* parasita en forma natural a zorros y otros cánidos y en su etapa larvaria tiene como huéspedes intermediarios a los roedores. Su ciclo biológico (Fig. 1) comienza con la ingestión de los huevecillos liberados (Fig. 1-a) en las

heces de los cánidos infectados, por roedores y pequeños mamíferos, que son los huéspedes intermediarios. Los huevecillos al llegar al intestino delgado, liberan las oncosferas, las cuales con ayuda de sus ganchos, penetran la pared intestinal y se alojan ya sea en sitios subcutáneos, en la cavidad pleural y/o abdominal, donde se transforman en cisticercos ó metacéstodos (Fig. 1-b). Estos cisticercos desarrollan gemaciones exógenas en el polo que carece de escólex, y en ese momento se inicia la

reproducción asexual. Finalmente el ciclo biológico se completa por la ingestión de los roedores infectados, por zorros u otros cánidos, que son el huésped definitivo y es en el intestino de ellos que se desarrolla el gusano adulto (Fig. 1-c), que es el que libera los proglótidos ó huevecillos al medio externo (Fragoso, 1988).

Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*

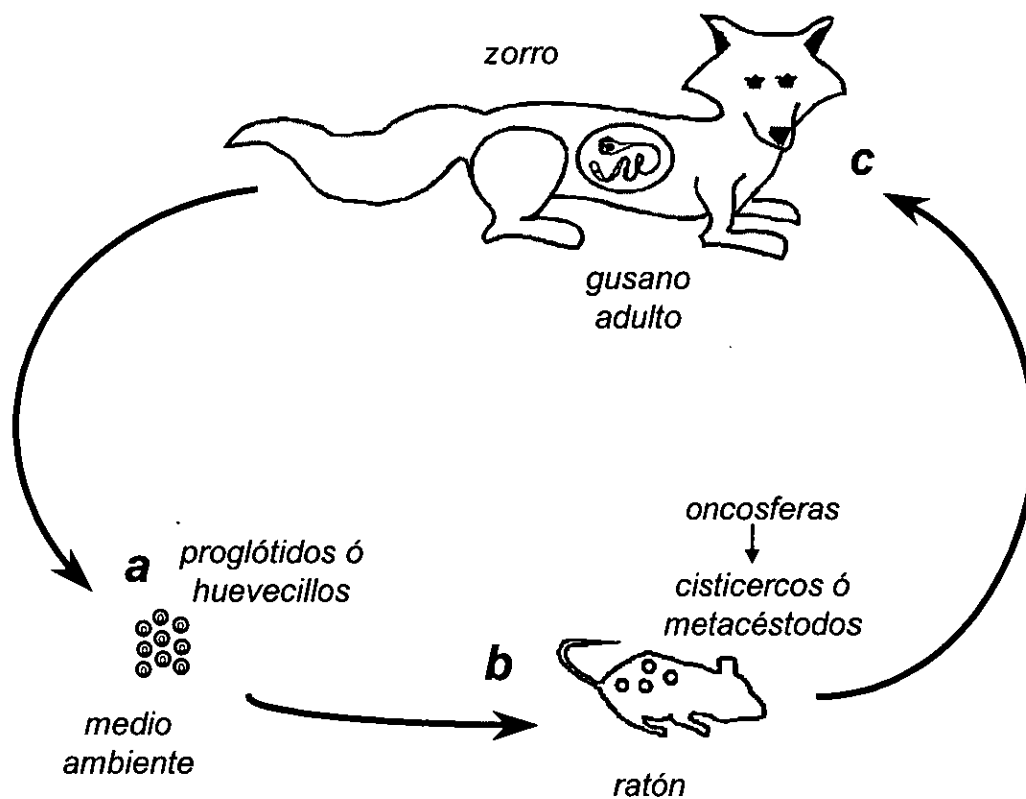


Figura 1 Ciclo biológico de *T. crassiceps*.

La *T. crassiceps*, se ha utilizado para el estudio de la relación céstodo-huésped y como modelo experimental de otras enfermedades por céstodos. Sus larvas ofrecen varias ventajas, pues a pesar de que la mayoría de los helmintos se reproducen pero no se multiplican dentro de sus huéspedes, en el caso de *T. crassiceps* sus formas larvarias se reproducen asexualmente por gemaciones exógenas, lo que permite que se mantengan en ratones por pases intraperitoneales sucesivos. Así cada nuevo cisticercos desarrolla un escólex, por lo que puede llegar a ser un gusano adulto (Schmidt, 1989).

La adquisición de nutrimentos por los cisticercos de *T. crassiceps*, cuando se encuentran en el interior del huésped es vía pinocitosis, y el proceso es

EL SISTEMA INMUNE

Todos los seres vivos, al encontrarse en contacto con un medio externo que continuamente los ataca y en muchos casos los invade, se han visto en la necesidad de desarrollar un sistema de defensa, el cual les permite sobrevivir en un medio hostil que de otra manera quizá los superaría.

A partir de los vertebrados el sistema de defensa que se ha

estimulado por la presencia de glucosa, extracto de levadura o albúmina sérica bovina en el medio (Schmidt, 1989).

En el modelo experimental, se ha observado que la infección en ratones en la cavidad peritoneal ha tenido mejores resultados que la infección tanto en la cavidad pleural como en regiones subcutáneas. Aparentemente las infecciones subcutáneas no prosperan debido a que la larva se rodea de una pared delgada del tejido del huésped lo que afecta su potencial de reproducción asexual (Fragoso, 1988).

desarrollado, es el Sistema Inmune, el cual se encuentra organizado de una manera lo suficientemente eficiente para vencer en la mayoría de los casos a las agresiones a las que se enfrenta.

La mayor parte de las veces, en un individuo sano, no son perceptibles la presencia de diversos microorganismos con los que se enfrenta. Sólo

ocasionalmente éstos causan enfermedades.

A pesar del sistema inmune, las infecciones parasitarias son un problema de salud pública a nivel mundial ya que se estima que alrededor del 30% de la población del mundo está infectada con alguno de los diversos parásitos que pueden colonizar al hombre. Las enfermedades respiratorias y las diarreas son las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, seguidas por las parasitosis causadas por protozoarios y helmintos. Las infecciones causadas por helmintos, generalmente son crónicas y persisten en el individuo durante largos periodos, siendo el huésped incapaz de generar una inmunidad protectora perene y por lo tanto puede sufrir de reinfecciones continuas.

Se sabe que en el caso de los parásitos helmintos, la respuesta humoral no parece participar de manera importante en el control de la parasitosis (Sciutto, 1989), mientras que la respuesta de tipo celular es la que parece estar involucrada en la eliminación del parásito ya que la timentomía neonatal hace más susceptibles a los animales y la transferencia pasiva de células T inmunes les confiere resistencia (Bojalil et al., 1993). Además se ha encontrado

una correlación negativa entre la intensidad de la respuesta de hipersensibilidad retardada y el número de parásitos instalados (Terrazas et al, 1994).

Las células T se dividen de acuerdo al receptor que expresan y a su función en dos grandes grupos: CD4⁺ y CD8⁺ (Janeway-Travers, 1997). Las células CD8⁺, también son llamadas células T citotóxicas expresan el receptor CD8 y su función es la de matar a las células infectadas ya sea por virus o bacterias.

Las clonas de células CD4⁺, también llamadas T ayudadoras, expresan el receptor CD4 y participan en la respuesta a infecciones por protozoarios y helmintos. Se subdividen de acuerdo al patrón característico de citocinas que secretan después de ser estimuladas (Mosmann et al., 1989) (Fig.2). Se han descrito dos tipos de células T ayudadoras o T_H (T helper).

- Células TH1, que participan principalmente en la respuesta inmune a patógenos intracelulares como virus y bacterias y que producen interferón- γ (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) e interleucina-12 (IL-12) y son responsables de la inmunidad mediada por células, es

decir, de la activación de macrófagos y de la hipersensibilidad retardada.

- Células TH2, que participan en la respuesta inmune a patógenos extracelulares como protozoarios y helmintos y que producen interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-9 (IL-9), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), y son responsables de generar y mantener las respuestas inmunes humorales

entre las que están: proliferación y diferenciación de linfocitos B, elevación en la producción de inmunoglobulina G-1 (IgG1) e inmunoglobulina E (IgE), la inmunidad de las mucosas a través de la activación de las células cebadas y de la producción de inmunoglobulina A (IgA), y la proliferación y diferenciación de eosinófilos.

Regulación cruzada en TH1-TH2

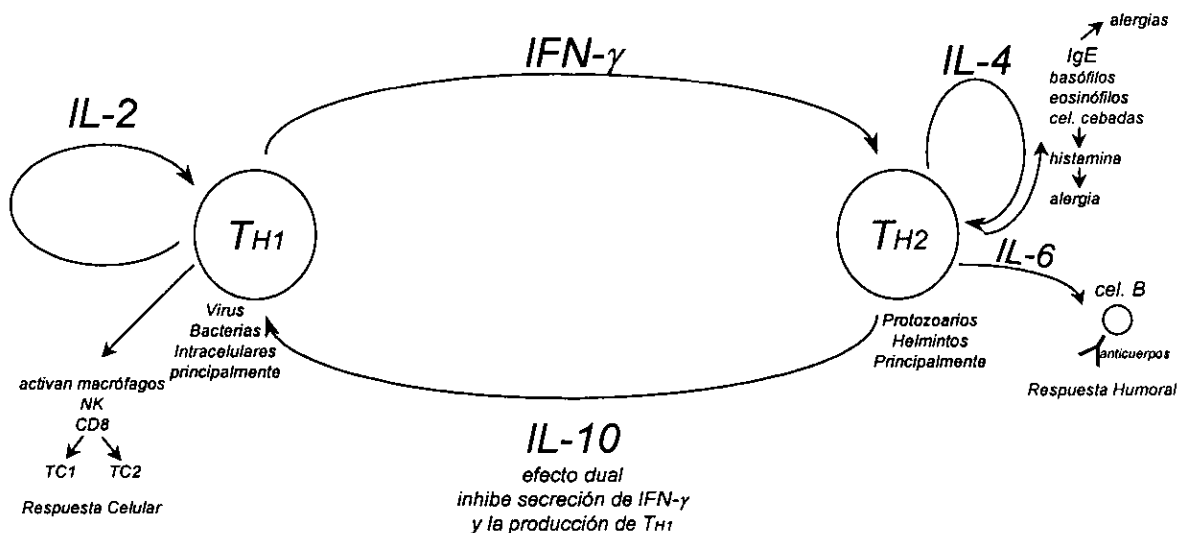


Figura 2. Interregulación negativa entre los grupos celulares TH1-TH2, por medio de citocinas.

Una vez que se ha definido alguno de ambos tipos celulares, se regulan negativamente uno al otro, a través de diversas citocinas, de la siguiente manera: El IFN-γ que es secretado por las células TH1, inhibe la

proliferación de las células TH2, inhibe la producción de IL-10, y el reclutamiento de eosinófilos, todas ellas parte de la respuesta TH2. La IL-2, secretada también por células TH1, estimula la proliferación de células TH1. Las células

TH1, también activan a los macrófagos, a las células asesinas naturales y a las células CD8⁺; es decir la respuesta celular (Romagnani, 1997).

Por otra parte la IL-10 que es secretada por células TH2, inhibe la proliferación de las células TH1, evita la secreción de IFN- γ , y disminuye indirectamente la producción de IL-2 por las células TH1. La IL-4, secretada por las células TH2, estimula la proliferación de las mismas células (TH2). La IL-6, que es secretada por las células TH2, estimula la proliferación de las células B, las cuales participan en la respuesta humoral con la producción de anticuerpos. Las células TH2 activan las respuestas de tipo alergia al inducir la secreción de IgE, y la proliferación de basófilos, eosinófilos y células cebadas que secretan histamina (Romagnani, 1997).

Hay evidencias que sugieren que los fenotipos maduros TH1 y TH2 no están presentes entre la población de linfocitos CD4⁺ vírgenes periféricos, sino que se diferencian de una población común TH0, después del evento primario de activación. La hipótesis más aceptada en cuanto al desarrollo de una respuesta tipo TH1 o TH2 es que la proporción relativa de cada tipo celular depende del perfil de citocinas que están presentes durante los eventos de activación y del tipo de células presentadoras de

antígeno que se encuentran activas (Swain, 1995). La citocina que favorece una respuesta tipo TH1 es IL-12 y la que favorece una respuesta tipo TH2 es IL-4. Aunque recientemente se ha dado gran importancia a la IL-6 como favorecedora de una respuesta tipo TH2 (Rincón et. al., 1997).

La respuesta inmune frente a infecciones por helmintos se caracteriza por una alta producción de IgE, IgG1, IgG4, eosinofilia localizada y periférica así como por la participación de basófilos, todas éstas respuestas son reguladas principalmente por citocinas TH2. Dado que dicha respuesta (TH2) no es exitosa en la eliminación del parásito, existe la posibilidad que ésta sea inducida por los helmintos para inhibir la respuesta TH1 que pudiese ser protectora, ó por el propio huésped para evitar reacciones inmunopatológicas relacionadas con una fuerte y persistente respuesta tipo TH1 (Romagnani, 1994).

Se tiene evidencia experimental (Terrazas et al, 1998) que al inicio de la infección con el cisticerco de *Taenia crassiceps*, se observó una respuesta tipo TH1 (con alta proliferación a la estimulación tanto con Con-A, como con un homogenado de antígeno, altos niveles de IL-2 e IFN- γ y muy altos niveles de anticuerpos de la subclase

IgG2a específicos contra los cisticercos de T. crassiceps), la cual fué asociada a un crecimiento parasitario restringido. Al avanzar el tiempo de infección la respuesta inmune empieza a polarizarse hacia una respuesta de tipo TH2 (altos niveles de IL-4, IL-6 e IL-10, aumento en

los anticuerpos específicos contra los cisticercos de T. crassiceps de las subclases IgG1 e IgG2b) y paralelamente a esta respuesta se observó un mayor crecimiento parasitario y una respuesta tipo TH1 totalmente abatida.

LA NUTRICIÓN Y LA RESPUESTA INMUNE

La noción de que la nutrición afecta la respuesta inmune, es intuitivamente común, dado que en la respuesta inmune, como en cualquier otra reacción del organismo, intervienen proteínas, células, y varios compuestos químicos y biológicos que pueden ser alterados por una mala reserva nutricional en el organismo.

Se ha demostrado que la desnutrición energético-protéica ocasiona aumento en la incidencia de infecciones gastrointestinales y respiratorias con una disminución importante de la inmunidad celular; en criterios clínicos y epidemiológicos se ha encontrado una asociación entre el estado nutricional y las enfermedades infecciosas (Valdés-Ramos, 1994).

Las enfermedades infecciosas y la malnutrición, son problemas que afectan a gran parte de la población mundial, sobre todo en los países en

vías de desarrollo. Se sabe que la malnutrición induce un estado de inmunodeficiencia y hay evidencia experimental que sugiere que puede provocar una inmunodeficiencia secundaria que incrementa la susceptibilidad del huésped a la infección (Chandra, 1991). Se ha observado una disminución en la producción de varias citocinas asociada a la malnutrición (Chan, 1996). La inmunidad celular disminuye en la malnutrición proteica y los ratones con dicha deficiencia en ocasiones forman granulomas pobremente estructurados y con componentes celulares poco organizados, en comparación con los controles con una dieta normal (Chan, 1996).

Recientemente, se ha observado una relación altamente sinérgica entre la desnutrición en diversos grados y la presencia de infecciones. Además se

tienen evidencias que la desnutrición ejerce mayor efecto sobre la inmunidad celular que sobre la inmunidad humoral (Chandra, 1991). El efecto de la desnutrición se encuentra a nivel de la maduración de linfocitos T diferenciados, alterando la relación entre los linfocitos T de ayuda (CD4⁺) y los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺), la cual en condiciones normales es 2:1 (CD4/CD8) (Chandra, 1991).

La desnutrición energético-protéica, tiene otros efectos en la respuesta inmune como son: la atrofia del timo, la reducción de la hipersensibilidad retardada, una menor transformación de linfocitos en su reacción a mitógenos, una disminución de la actividad del complemento, en particular de la proteína C3, y una disminución en la producción de citocinas como son: IFN- γ , IL-1 e IL-2. (Chandra, 1992)

Los efectos patológicos de una infección parasitaria se exacerban cuando se desarrolla una relación sinérgica entre una deficiencia nutricional del huésped y una enfermedad infecciosa. Este efecto es mayor en términos de la morbilidad esperada en base a la medida hecha cuando un animal enfrenta una agresión a la vez (Keymer, 1983).

En el caso de las ratas, se ha observado que cuando no están infectadas y son sometidas a una dieta hipoproteica, usan sus limitados nutrimentos más eficientemente que las ratas infectadas con *Nocardia brasiliensis*. (Keymer, 1983). Además se observaron diferencias altamente significativas en el cambio de masa corporal entre ratas infectadas y no infectadas. Después de nueve semanas de infección con *N. brasiliensis*, las ratas mal nutridas presentaban otros efectos, como son: tener menos pelo, ser menos activas, y una tendencia a tener los ojos cerrados, o a la mitad. A pesar de esto, los efectos patológicos se vieron disminuidos al cambiar la dieta de 1% a 20% ya que se incrementó el consumo de alimento y la masa corporal se igualó a la de las no infectadas (Keymer, 1983).

RESPUESTA DE FASE AGUDA.

Cuando el huésped que sufre una mala nutrición, se expone a agentes infecciosos, además de montar una respuesta inmune específica y una no específica, inicia también una serie de ajustes metabólicos llamados: Respuesta de fase aguda (Santos, J.I., 1994).

Durante la respuesta de fase aguda, los mayores mediadores del

metabolismo secundario son IL-1, IL-6 y TNF- α .

El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) es el indicador clásico de nutrición. También se le llama caquectina, por que inicialmente se describió como uno de los factores que causan la caquexia (Sherry B. y Cerami A., 1988; Beutler B. y Cerami A., 1988).

La naturaleza exacta de la respuesta de fase aguda y su intensidad, depende de la cantidad y el tipo de citocina secretada en la respuesta a un inmunógeno determinado.

Respuestas intensas y de larga duración, resultan en caquexias, representando los extremos de las alteraciones metabólicas y nutricionales.

En el caso particular del metabolismo proteico, durante una infección o una respuesta de fase aguda, hay un incremento en la excreción de nitrógeno, lo que es debido a un catabolismo neto de proteínas, que provienen del músculo esquelético. Dichos aminoácidos, son usados para síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, oxidados para la obtención de energía, usados como substratos gluconeogénicos, o usados para mantener la proliferación clonal de leucocitos, la secreción de inmunoglobulinas y de proteínas

regulatorias. La degradación de músculo esquelético, es inducida por IL-1, pero inyecciones diarias de TNF- α durante ocho días resultan en un decremento del 15% de la proteína total del cuerpo (Klasing, 1988).

Durante esta fase sucede un cambio importante en las concentraciones de diversos minerales en el cuerpo (Valdés-Ramos, 1994).

La nutrición tiene una marcada influencia en la cantidad de citocina secretada durante la respuesta inmune y por lo tanto influye también en los resultados de los cambios infecciosos. Se ha observado que en ratas, la secreción de IL-1 por macrófagos peritoneales estimulados se ve disminuída por deficiencias proteicas (Klasing, 1988).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

*Evaluar el efecto de una desnutrición proteica en la repuesta inmune durante la infección murina de *Taenia crassiceps*.*

OBJETIVOS PARTICULARES

- ⇒ Medir las cargas parasitarias en cavidad peritoneal a lo largo del tiempo de infección, con tres diferentes inóculos de *Taenia crassiceps* (λ_5 , λ_{15} y λ_{25}), en los ratones hembras con dieta hipoproteica y en los ratones hembras con dieta normal.*
- ⇒ Evaluar el efecto que tiene la dieta hipoproteica durante el tiempo de infección en la secreción de las citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ y TNF- α , en cultivos *in vitro* de células del bazo, extraídas de los animales parasitados con tres diferentes inóculos de *Taenia crassiceps* (λ_5 , λ_{15} y λ_{25}).*
- ⇒ Analizar la proliferación de células de bazo *in vitro*, aisladas de ratones hembras alimentados con dieta normal y ratones hembras alimentados con dieta hipoproteica, con tres diferentes inóculos de *Taenia crassiceps*; bajo dos condiciones de estimulación: 1) concanavalina A y 2) extracto de antígenos totales del cisticerco de *Taenia crassiceps*.*
- ⇒ Analizar las diferencias entre los tres inóculos de *Taenia crassiceps* (λ_5 , λ_{15} y λ_{25}), en cuanto a la respuesta inmune y a la carga parasitaria.*

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

*¿Acaso una desnutrición proteica afectará la respuesta inmune de ratones hembras en contra de la infección con *Taenia crassiceps* ?*

DISEÑO EXPERIMENTAL

DISEÑO DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

Se usaron 288 ratones hembras de la cepa BALB/c entre 4 y 5 semanas de edad (Fig. 3-1), y se dividieron en dos grupos, cada uno de 144 ratones. Un grupo se mantuvo con la dieta que se usa normalmente en el bioterio, la cual

es isocalórica con 23% de caseína (marca Harlan Teklad 7004), la otra mitad se sometió a un régimen con una dieta también isocalórica pero de 6% de caseína (marca Harlan Teklad 90016), es decir hipoproteica (Fig.3-2).

INOCULACIÓN

Los ratones (hembras) se alimentaron con éstas dietas durante 3 semanas, al cabo de las cuales, cada uno de los grupos, a su vez se dividió en cuatro subgrupos, que fueron inoculados con diferente carga parasitaria de cisticercos de la cepa ORF por la vía intraperitoneal.

Para la inoculación, se seleccionaron cisticercos de entre 2 y 5 mm de tamaño, previamente lavados tres veces con PBS, se colocaron en 5 ml de PBS y se inoculan usando jeringas para insulina.

Se inocularon los ratones, formando los siguientes grupos: λ_5 , con 5 cisticercos iniciales, λ_{15} con 15

cisticercos iniciales, λ_{25} con 25 cisticercos iniciales y un grupo control λ_0 sin cisticercos (Fig. 3-3).

El momento en el que se inocularon los ratones se tomó como la semana cero, a partir de entonces se empezó a contar el tiempo de infección. La infección se prolongó por doce semanas, cada una de las cuales se sacrificaron 24 ratones, tres ratones de cada uno de los subgrupos.

Los animales fueron pesados (Fig. 3-4) semanalmente para evaluar las diferencias debidas a la dieta. A los ratones sacrificados se les contaron los cisticercos de la cavidad peritoneal, para ver el desarrollo de la infección.

EVALUACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA

Para la cuenta de cisticercos, los animales fueron anestesiados con éter, y sacrificados por dislocación cervical, los cisticercos fueron extraídos de la cavidad

OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS DEL BAZO

En las semanas pares, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron las células del bazo en condiciones de esterilidad para hacer cultivos celulares de la siguiente forma (Fig. 3-6):

En cajas de Petri estériles se colocaron 5 ml de solución salina de Hanks y cada bazo en una caja. Por otro lado, se prepararon jeringas de 5 ml (con aguja para insulina), con 5 ml de solución salina de Hanks y se tomó el bazo con unas pinzas, y se rasgó por la parte más delgada y por la parte más gruesa se inyectó la solución salina de Hanks para extraer las células.

Se pasaron 10 ml de la solución salina de Hanks con las células, con la menor cantidad de tejido posible a tubos estériles de 15 ml para centrifuga. Se centrifugaron 10 min. a 447.6 g, se decantaron, y se resuspendió el pellet en la gota que quedaba. Se agregó 1 ml de solución hemolizante, se agitó y se dejó reposar por 3 min. Se agregaron 5 ml de solución salina de Hanks y se centrifugó

peritoneal mediante lavados con PBS. Se pusieron los cisticercos en una caja de Petri para su conteo visual (Fig. 3-5).

durante 10 min. a 447.6 g, se decantó y se resuspendió el precipitado en la gota que quedaba y se agregaron 2 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL).

Se pusieron en un tubo Eppendorf una alícuota de 20 μ l de células y se les agregó 20 μ l de azul de tripano. Las células se contaron en una cámara de Newbawer con el microscopio. Se calculó la cantidad de medio que hay que agregar a cada tubo para que la concentración celular sea siempre la misma. Se agregó el medio necesario y se prepararon las cajas de cultivo de la siguiente manera:

- Las cajas de 24 pozos (Fig. 3-7) se prepararon para que con su sobrenadante se hicieran ELISAS (Fig. 3-8). Se prepararon agregando 1 ml de células más 1 ml de concanavalina-A (ConA, en una concentración de 2 μ g/ml) que es un mitógeno que estimula la proliferación celular, posteriormente se congeló el sobrenadante

- Las cajas de 96 pozos (Fig. 3-9) se usaron para medir la proliferación celular, por lo que se tienen algunas células estimuladas y otras no estimuladas (controles). Todo se hizo por triplicado. La estimulación de la proliferación celular se midió, con dos tipos de estimulaciones diferentes:

- A) Con un mitógeno general, concanavalina-A, para lo que las cajas se prepararon de la siguiente forma: para las células estimuladas, se agregaron 100 μ l de células mas 100 μ l de ConA (a una concentración de 2 μ g/ml) y para las células no estimuladas (controles) se agregaron 100 μ l de células mas 100 μ l de medio de cultivo.
- B) Con un homogenado de antígeno, el cuál (homogenado de antígeno) se obtiene ultracentrifugando los cisticercos y extrayendo todo el sobrenadante. Las cajas se prepararon de la siguiente forma: para las células estimuladas, se agregaron 100 μ l de células mas 100 μ l de homogenado de antígeno (a una concentración de 100 μ g/ml) y para las células no estimuladas (controles) se agregaron 100 μ l de células mas 100 μ l de medio de cultivo.

A las 48 horas, se obtuvo el sobrenadante de las células en cajas de 24 pozos, se pasó a tubos eppendorf estériles de 1.5 ml, y se congeló.

También a las 48 horas, se les agregaron 0.5 μ Ci de 3 H-timidina (con una actividad específica de 1 mCi/ml) (Fig. 3-10) a las cajas de 96 pozos estimuladas con ConA y a sus controles. La 3 H-timidina sirve para medir proliferación celular, pues en caso de haber proliferación celular, habrá incorporación de timidina al núcleo, y dicha incorporación, depende de la proliferación. Por lo que 24 horas después de agregar la 3 H-timidina, se cosecharon las células.

A las 120 horas de sembradas se les agregan 0.5 μ Ci de 3 H-timidina a las cajas de 96 pozos estimuladas con el antígeno y a sus controles; 24 horas después se cosecharon las células. (Fig. 3-11).

Posteriormente, se contaron las cuentas por minuto (cpm) de 3 H-timidina en las células, y se determinó si hubo o no proliferación celular, al comparar las células estimuladas con sus controles. La radioactividad se midió en contador de centelleo (Fig. 3-12).

Para la interpretación, se promediaron los triplicados y a los valores de las células estimuladas se les

restaron los valores de los controles, lo que permitió determinar la proliferación celular bajo la estimulación tanto de un mitógeno general (ConA), como bajo la estimulación de antígenos totales.

Con los sobrenadantes de los cultivos celulares de las placas de 24 pozos que se congelaron, se determinó por el método de ELISA la concentración de: TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12.

Los datos obtenidos de las cuentas de cisticercos, de las proliferaciones celulares, y las concentraciones de citocinas, se

ENSAYOS ELISAS

Los ELISAs se hicieron por duplicado, a todas las placas se les agregó una curva patron con la que se obtuvo la fórmula para calcular la concentración de la citocina. También se agregó a cada placa un blanco para la calibración del espectrofotómetro. El método de ELISA utilizado se describe a continuación:

DIA 1. Se sensibiliza la placa: Se agregan 100 μ l a cada pozo de una solución de 10 μ g/ml del primer anticuerpo (marca Zymed) en un buffer de carbonato con pH 9.6. Al primer anticuerpo se se unirá la citocina que se

analizaron estadísticamente (Apéndice pag. 78) por un análisis de varianza y para cada variable independiente se hicieron dos análisis, uno general que dió indicaciones de las significancias estadísticas y uno para cada tiempo en el que se hicieron los experimentos. Con la ayuda del análisis estadístico se pueden conocer los efectos que son significativos, y en base a eso, explicar lo que en términos generales estaba sucediendo.

desea medir, al agregar la muestra. El anticuerpo específico para cada citocina (ej. Para medir IL-2, se sensibiliza con anti-IL-2). Se incuba toda la noche a 4 °C.

DIA 2. Se lavan las placas 2 veces con 100 μ l de PBS-Tween 0.5% y se agrega a cada placa 100 μ l PBS-BSA 3%. Se incuban las placas durante 2 horas a temperatura ambiente, tapadas. Posteriormente, se lavan las placas 2 veces con 100 μ l de PBS-Tween 0.5%. Se agregan las muestras, por triplicado, diluyéndose el sobrenadante 1/2 en 100 μ l de PBS-BSA.

El blanco se prepara con 100 μ l de PBS-BSA y la curva patrón se prepara con extracto puro de la citocina que se va a medir (marca Zymed), se pone inicialmente a una concentración de 400 pg/ml con un volumen final de 100 μ l y se va diluyendo a la mitad en los pozos subsecuentes.

Se incuba toda la noche a 4°C, tapado con papel aluminio.

DIA 3. Se lavan las placas 4 veces con 100 μ l de PBS-Tween 0.5% y se agregan 100 μ l a cada pozo del segundo anticuerpo biotinilado (marca Zymed) a 1 μ g/ml en PBS-BSA y se incuba durante 1 hora tapado a temperatura ambiente. El segundo anticuerpo biotinilado, es un anticuerpo que se une a la citocina de interés, en un sitio distinto al sitio del primer anticuerpo. Una vez más se lavan 4 veces las placas con 100 μ l de PBS-Tween 0.5%.

Se agregan 100 μ l de Estreptoavidina-Peroxidasa, diluído 1:1500 en PBS-BSA, y se incuba durante 45 minutos tapado a temperatura ambiente.

Se lavan las placas 6 veces con 100 μ l de PBS-Tween 0.5% y se agregan 100 μ l de ABTS (marca Zymed) por pozo para revelar. El ABTS es el sustrato que reacciona dando color. Se espera de 15 a 30 min. para que los pozos se colorean.

Finalmente se lee la absorbancia a 405 nm, calibrando el espectofotómetro con el blanco

Se promedia la lectura obtenida de los duplicados, lo cual permite reducir el error del trabajo manual.

Con los valores de la curva patrón se calcula la concentración en pg/ml de la citocina en las muestras. Se grafican los valores de la curva patrón (en el eje de las x la concentración y en el eje de las y la absorbancia). Se calcula la ecuación de la recta que le ajusta más adecuadamente, se despeja de la ecuación de la recta la concentración (x), ya que conocemos la absorbancia (y), y se calcula la concentración (en pg/ml) de la citocina de interés en las muestras.

Diseño Experimental

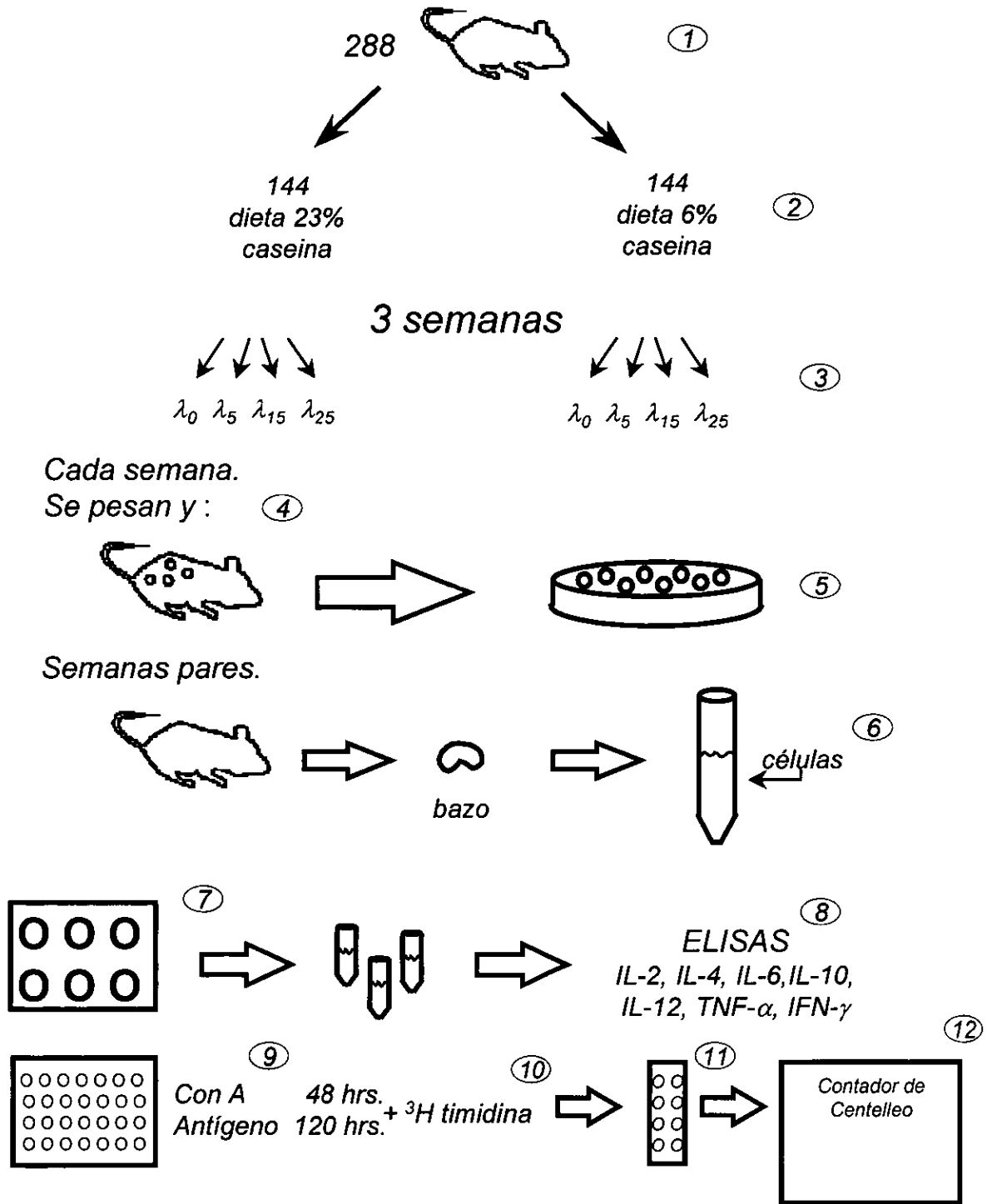


Figura 3. Diseño experimental utilizado para la evaluación del efecto de una desnutrición proteica en la respuesta inmune durante la infección murina de *T. crassiceps*.

SOLUCIONES UTILIZADAS:

- **PBS.**

80.0 g de NaCl

11.6 g Na_2HPO_4

2.0 g KH_2PO_4

2.0 g KCl

Se ajusta el pH a 7.0 y se afora a 10 litros.

- **SOLUCION DE HANKS**

Solución A

Solución 1

80 g de NaCl

4 g de KCl

2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

400 ml de H_2O

Se juntan las dos soluciones y se afora a 500 ml.

Solución B

1.5 g de $\text{HNa}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

0.6 g de H_2KPO_4

10 g de glucosa anhidra

400 ml de H_2O

Se agregan 50 ml de rojo de fenol al 0.4%, se ajusta a pH 7.2 y se afora a un volumen final de 500 ml

Se esterilizan por filtración las soluciones A y B y ya frías, se mezclan ambas en una proporción 1 a 1 y se guardan.

Solución 2

1.4 g de CaCl_2

50 ml de H_2O

- **BUFFER DE BICARBONATOS**

0.1 M. NaHCO_3

Se ajusta el pH a 8.2

- **PBS-BSA**

Se prepara una solución al 3% de BSA en PBS

- **PBS-TWEEN 0.5%**

Se agrega. 0.5 ml de Tween-20 a 1 litro de PBS

- **SOLUCIÓN DE ABTS**

150 mg de 2,2'-Azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico)

500 ml de ácido cítrico 0.1 M.

Se ajusta a pH 4.35 con pellets de NaOH, se alicuota en viales de 11 ml y se almacena a -20°C . Antes de usarse, se le agregan 10 μl de H_2O_2 30%.

- **SOLUCIÓN HEMOLIZANTE**

Solución A

0.16 M de Cloruro de Amonio

Solución B

0.17 M de Tris-Base

Se toman 8 partes de A por 2 partes de B, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza por filtración con filtros de $0.45 \mu\text{m}$

RESULTADOS

EFFECTO DE LA DIETA HIPOPROTEICA SOBRE EL PESO CORPORAL

Los pesos promedios en gramos de los ratones mal y normal nutridos en el transcurso de la infección se

encuentran en la tabla 1 y se ilustran gráficamente en la figura 4.

Tabla 1. Pesos promedios, en gramos, de los ratones mal nutridos y normal nutridos en el transcurso de las doce semanas de infección.

Tiempo	Mal Nutridas	Normal Nutridas
0 semanas	16.7 g	18.5 g
1 semanas	16.9 g	18.9 g
2 semanas	17.7 g	20.1 g
3 semanas	17.0 g	19.8 g
4 semanas	18.4 g	21.0 g
5 semanas	19.6 g	20.8 g
6 semanas	19.2 g	21.6 g
7 semanas	20.1 g	21.7 g
8 semanas	20.8 g	23.0 g
9 semanas	21.0 g	24.3 g
10 semanas	21.4 g	25.0 g
11 semanas	21.1 g	24.2 g
12 semanas	21.6 g	25.2 g

Al pesar a los animales, se cometió un error de diseño, ya que se pesaron por grupo y no uno por uno, por ésta razón no es posible obtener la desviación estándar, ni saber la variabilidad de la muestra. Además, se pesaron juntos los tres diferentes

inóculos, y los controles, por lo que tampoco se puede distinguir el peso de los cisticercos. Es importante que en el futuro, no se vuelva a cometer errores de éste tipo; para lo cual es aconsejable que los ratones se pesen uno por uno y distinguiendo por separado los inóculos.

Peso corporal de los ratones

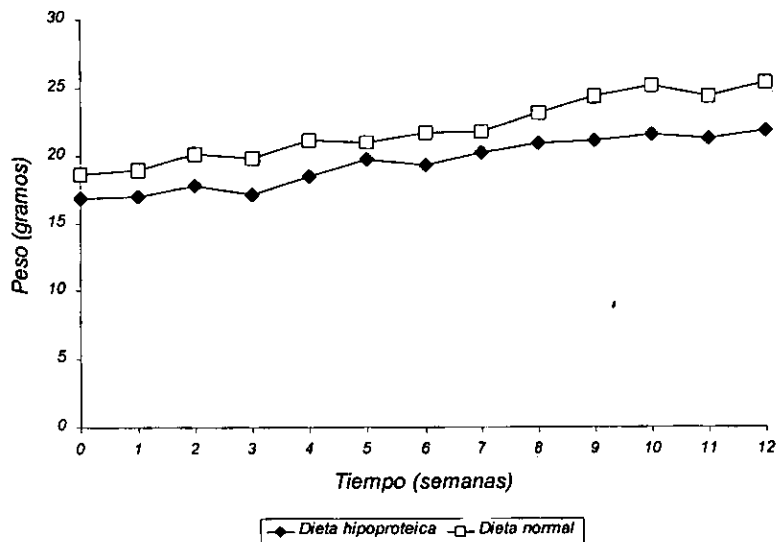


Figura 4 Peso promedio en gramos de los ratones, en el transcurso de las doce semanas de infección.

Se observa que en general el peso promedio de los ratones alimentados con una dieta hipoproteica, es menor que el de los ratones sometidos a una dieta normal. Los pesos de ambos grupos se van incrementando en el tiempo casi paralelamente.

Durante el desarrollo del experimento, se pudo observar también que los ratones mal nutridos, además de ser más pequeños, eran más débiles y

menos activos, lo cuál era de esperarse debido a su mala nutrición.

El análisis estadístico (pag. 68) que se les aplicó a éstos datos, es el de χ^2 -cuadrada (Apéndice, pag. 85), y se obtuvo una $P = 0.98$, lo que nos dice que no hay diferencias significativas entre ambos grupos. Era de esperarse, ya que al mezclar los ratones, se pierden las diferencias entre ellos.

EFFECTO DE LA DIETA HIPOPROTEICA SOBRE LA CARGAS PARASITARIAS

Cada semana se sacrificaron 3 ratones de cada subgrupo (24 ratones) para establecer la carga parasitaria y

poder evaluar el desarrollo de la infección. Lo que nos permitió conocer el efecto de la dieta hipoproteica en el

establecimiento y en el desarrollo de la infección.

A los ratones que fueron inoculados con cisticercos, como ya se explicó en la metodología, se les abrió la cavidad peritoneal y se contaron visualmente los cisticercos. Se promedió el número de cisticercos de cada subgrupo y se calculó la desviación estándar para cada promedio, lo que nos permitió conocer la variabilidad de la

muestra. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 2.

Para observar más claramente las diferencias de la carga parasitaria, se hicieron tres gráficas, una para cada uno de los inóculos, donde se compara la carga parasitaria de los animales alimentados con la dieta hipoproteica, con la carga parasitaria de los animales alimentados con dieta normal. (Fig. 5). Se muestra también la desviación estándar para cada punto.

Tabla 2. Determinación del número de cisticercos, en los distintos tiempos de infección. Los valores que se muestran, son el promedio de los obtenidos en 3 animales, se muestra también la desviación estándar.

Tiempo	Dieta Hipoproteica		
	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
0 semanas	5	15	25
1 semana	1 \pm 0.8	14 \pm 0.5	20 \pm 2.2
2 semanas	2 \pm 0.5	12 \pm 2.2	18 \pm 6.2
3 semanas	3 \pm 0.5	7 \pm 0.2	23 \pm 4.6
4 semanas	18 \pm 4.9	46 \pm 3.5	49 \pm 7.9
5 semanas	43 \pm 12.8	73 \pm 35.3	165 \pm 22.7
6 semanas	34 \pm 12.0	86 \pm 37.8	127 \pm 37.0
7 semanas	69 \pm 20.3	279 \pm 15.20	570 \pm 142.9
8 semanas	277 \pm 64.4	623 \pm 29.3	683 \pm 175.0
9 semanas	400 \pm 47.7	756 \pm 70.9	1130 \pm 50.7
10 semanas	443 \pm 199.7	665 \pm 193.9	1156 \pm 78.4
11 semanas	1285 \pm 258.1	930 \pm 27.8	1206 \pm 10.4
12 semanas	763 \pm 207.5	936 \pm 175.1	1103 \pm 16.0
Tiempo	Dieta Normal		
	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
0 semanas	5	15	25
1 semana	3 \pm 0.5	14 \pm 1.0	14 \pm 0.7
2 semanas	4 \pm 0.5	14 \pm 3.2	14 \pm 2.3
3 semanas	6 \pm 1.5	26 \pm 2.3	26 \pm 10.2
4 semanas	17 \pm 5.0	101 \pm 20.2	101 \pm 14.3
5 semanas	35 \pm 15.6	186 \pm 47.3	186 \pm 32.7
6 semanas	5 \pm 12.0	493 \pm 37.8	493 \pm 37.0
7 semanas	197 \pm 129.1	842 \pm 212.4	842 \pm 57.3
8 semanas	513 \pm 255.0	1323 \pm 153.3	1323 \pm 23.6
9 semanas	676 \pm 133.6	1506 \pm 25.6	1506 \pm 82.8
10 semanas	1266 \pm 248.3	1800 \pm 122.7	1800 \pm 282.4
11 semanas	1310 \pm 215.7	1773 \pm 35.0	1773 \pm 112.4
12 semanas	1470 \pm 134.5	1746 \pm 544.3	1746 \pm 306.7

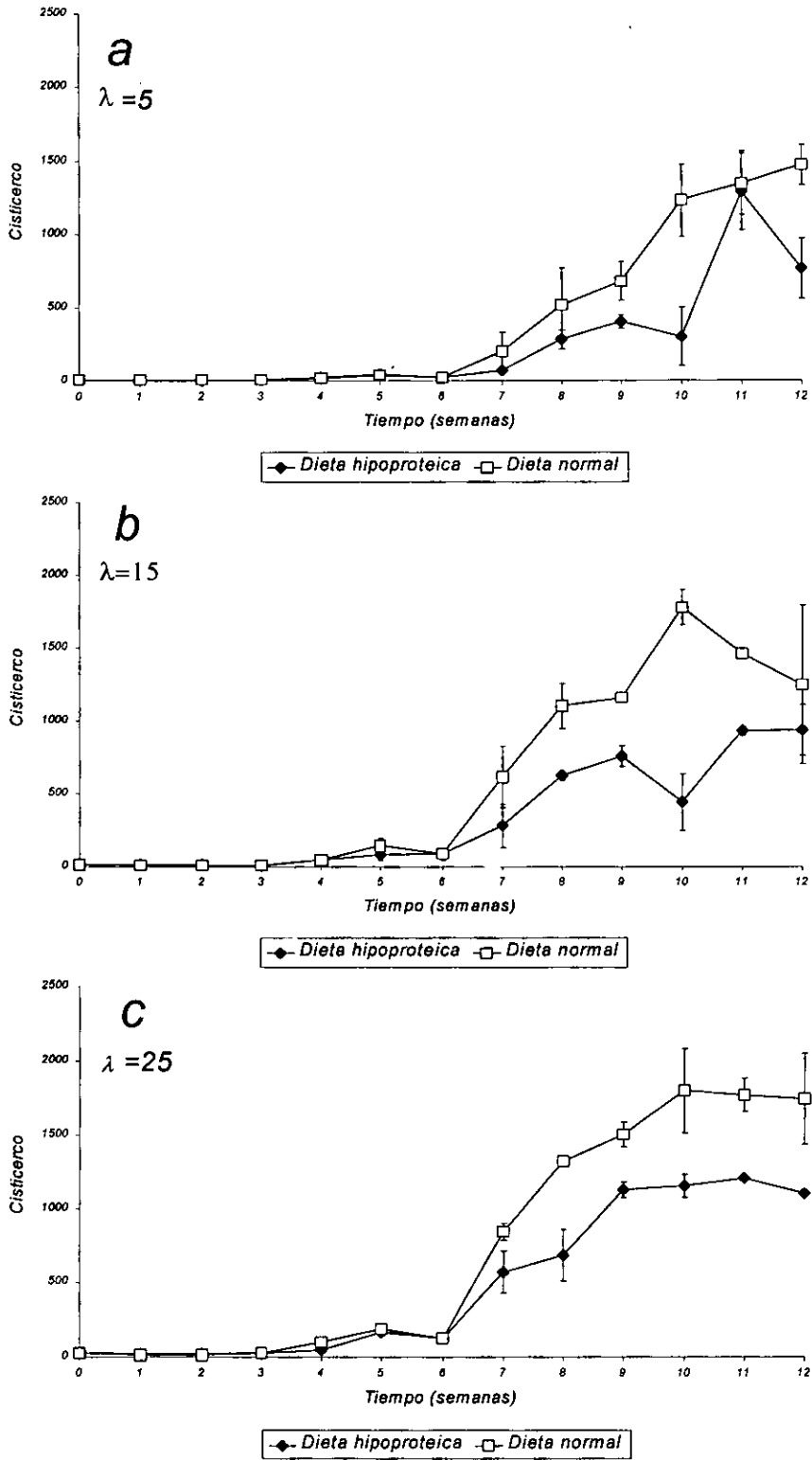


Figura 5. Carga parasitaria de cisticercos en función del tiempo, donde podemos comparar la carga parasitaria de los animales con la dieta hipoproteica, con la de los animales con la dieta normal. Para el inóculo λ_5 (a), para el inóculo λ_{15} (b) y para el inóculo λ_{25} (c).

En el caso de la cuenta de cisticercos (Fig. 5), podemos dividir las observaciones en dos partes, ya que en la primera mitad del tiempo, las cuentas de cisticercos son bajas para ambas dietas, lo cual cambia en la segunda mitad del experimento en la que el número de cisticercos encontrados es mayor y se va incrementando con el tiempo.

El sistema inmune debería funcionar mejor en los ratones con dieta normal, por lo que se esperaría que hubiera menos cisticercos en los ratones normal nutridos que en las ratones mal nutridos. Sin embargo el número de cisticercos en los ratones con la dieta normal fue más alto que el de los ratones con dieta hipoproteica. Esto puede deberse a que los cisticercos utilizan los recursos disponibles en el huésped para

proliferar, de modo tal que a mayores recursos, mayor es la carga parasitaria y es claro que el hecho que el huésped se encuentre mal nutrido, afecta la colonización del parásito.

De acuerdo al análisis estadístico (pag. 52) se encontró que el efecto general que se observa, se debe al inóculo y a la interacción de la dieta con el tiempo. La primera parte del tiempo de infección (semanas 1,3,4,5,7), el efecto está dado por el inóculo. Era de esperarse que el inóculo inicial influyera directamente en la carga parasitaria. Las siguientes semanas (8,9,10) el efecto está dado por el inóculo y por la dieta. Es decir, no es sino hasta la octava semana en la que el efecto de la dieta es estadísticamente significativo. Al final del tiempo de infección (semana 11), el efecto está dado solo por la dieta.

EFFECTO DE LA DIETA HIPOPROTEICA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Después de medir la proliferación celular de cultivos de células del bazo estimuladas tanto con ConA como con el homogenado de antígeno, se promediaron los duplicados y se restaron al valor de la proliferación de las células no estimuladas (basales) y se

promediaron por grupo. Así se obtuvieron los valores promedio de proliferación celular en el tiempo de infección (semanas pares) de las células de los diferentes subgrupos. Para cada promedio, se calculó la desviación

estándar, lo que nos permitió conocer la dispersión de la muestra.

Para las células estimuladas con ConA, se hicieron ensayos de proliferación tanto para las células de ratones inoculados como para las de los controles (sanos).

Para la estimulación con antígeno, solo se hizo el ensayo con las células de ratones infectadas mal y normal nutridas, es decir, no se hizo ensayo para los ratones no inoculados (sanos), esto debido a un mal entendido durante el diseño del experimento, pues se debió medir también la proliferación de las células de los animales sanos.

Cabe notar que tampoco se midió la proliferación celular en el tiempo cero, por lo que desconocemos la proliferación celular al momento de infectar

Los valores de cuentas por minuto de timidina tritiada de la proliferación celular de células estimuladas con Con A se reportan en la tabla 3 y la gráfica correspondiente en la figura 6. Los datos de la proliferación de las células estimuladas con el homogenado de antígeno están en la tabla 4 y en la figura 7.

Tabla 3. Cuentas por minuto de Timidina tritiada incorporada por células del bazo estimuladas con ConA. Cada valor, es el promedio de tres animales, se muestra también el valor de la desviación estándar.

Tiempo	Dieta Hipoproteica			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	56222 ± 28111	31116 ± 15558	32375 ± 16187	17124 ± 8562
4 semanas	6413 ± 3206	20781 ± 10390	21687 ± 10843	33064 ± 16532
6 semanas	131274 ± 65637	160902 ± 80451	136759 ± 68379	129779 ± 648889
8 semanas	321 ± 160	1569 ± 784	254 ± 127	2265 ± 1132
10 semanas	195.43 ± 293	527 ± 223	376 ± 185	309 ± 154
12 semanas	32311 ± 16155	16 ± 7	142 ± 71	325 ± 162
Tiempo	Dieta Normal			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	45827 ± 22913	4562 ± 2281	1826 ± 913	2046 ± 1023
4 semanas	1090 ± 320	27832 ± 13916	34389 ± 17194	16245 ± 8122
6 semanas	177618 ± 88809	161480 ± 80740	197510 ± 98755	254459 ± 127229
8 semanas	153 ± 76	23246 ± 11623	20387 ± 10193	34724 ± 17362
10 semanas	2855 ± 1427	1031 ± 515	1807 ± 903	637 ± 318
12 semanas	15025 ± 7512	465 ± 232	0	430 ± 215

En la figura 6 se observa que en la semana 6 la proliferación de los cultivos de las células del bazo de los

ratones con la dieta hipoproteica (a) es más baja que la proliferación de las células de los ratones con dieta normal

(b). *En los ratones de ambas dietas, se observa una estimulación ligera en la semana 4 y un pico alto en la semana 6, que después vuelve a disminuir, para permanecer con una estimulación baja el resto del tiempo.*

De acuerdo al análisis estadístico (pag. 54) el efecto que se observa está dado por la interacción de la dieta con el tiempo, lo que indica que sí hay efecto de la dieta en el tiempo. El efecto de la dieta, es que la proliferación es mayor en los animales con una dieta normal, que en los animales con una dieta hipoproteica.

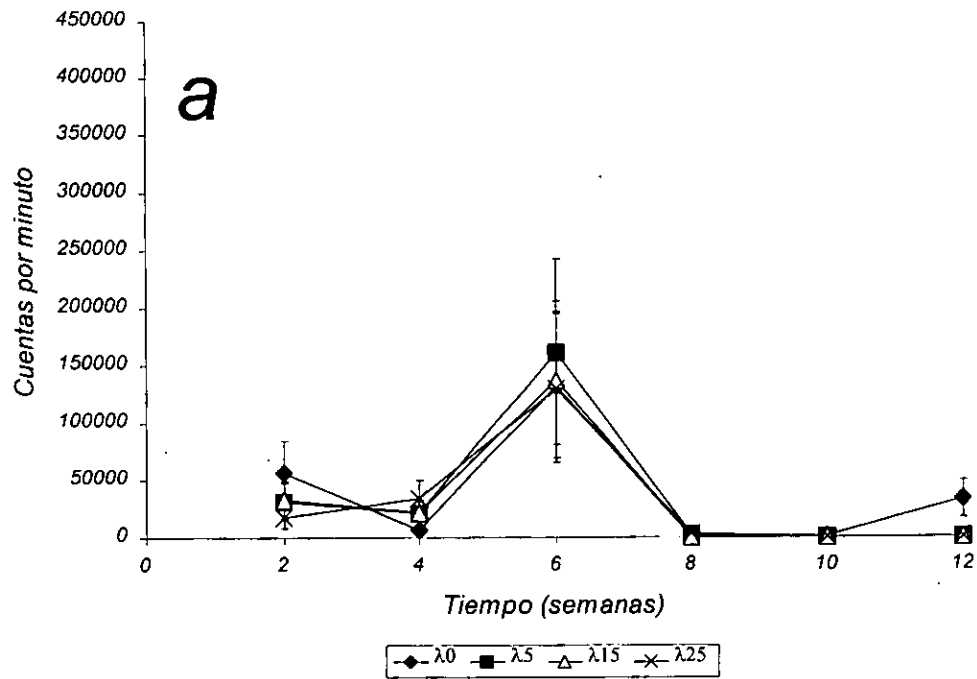
Con mayor detalle, en el análisis por tiempo, encontramos significancia en tres tiempos (semana 2, 8, 12). En la semana 2, de los animales con dieta normal hay diferencias estadísticamente significativas entre la proliferación de los animales sanos y la de los parasitados, siendo mayor la proliferación de las

células de los animales sanos que la de los parasitados. En la semana 8, la proliferación de las células de los animales con dieta normal es mayor que la proliferación de las células de los animales con dieta hipoproteica. En la semana 12 el efecto está dado por la interacción de la dieta con el inóculo, siendo mayor la proliferación de las células de los animales sanos que la de los animales parasitados.

Podemos decir, entonces, que aparentemente las células de los animales con dieta normal reaccionan mejor a la estimulación con ConA. En cuanto al efecto de la infección, las células de los animales sanos reaccionan mejor a la estimulación con ConA que las células de los animales parasitados.

La proliferación celular se ve afectada tanto por la dieta hipoproteica como por la infección.

Proliferación celular estimulada con ConA en ratones con una dieta hipoprotéica



Proliferación celular estimulada con ConA en ratones con una dieta normal

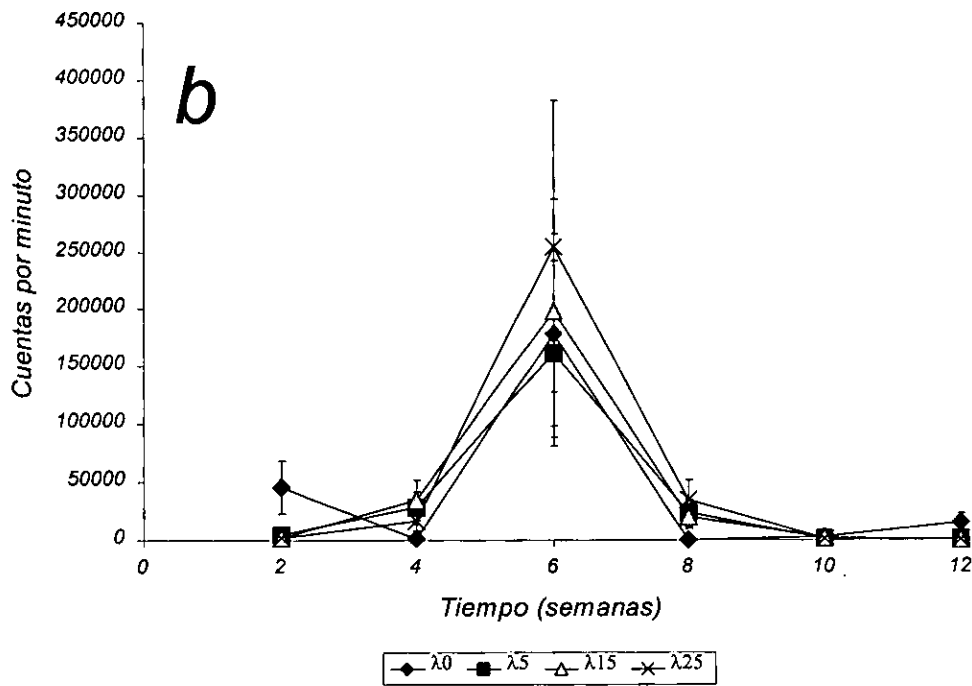


Figura 6 Proliferación celular de células del bazo estimuladas con ConA, para los animales mal nutridos (a) y para los normal nutridos (b).

Tabla 4. Cuentas por minuto de Timidina tritiada incorporada por células del bazo estimuladas con un homogenado de antígeno. Cada valor es el promedio de tres animales, se muestra también el valor de la desviación estándar para cada promedio.

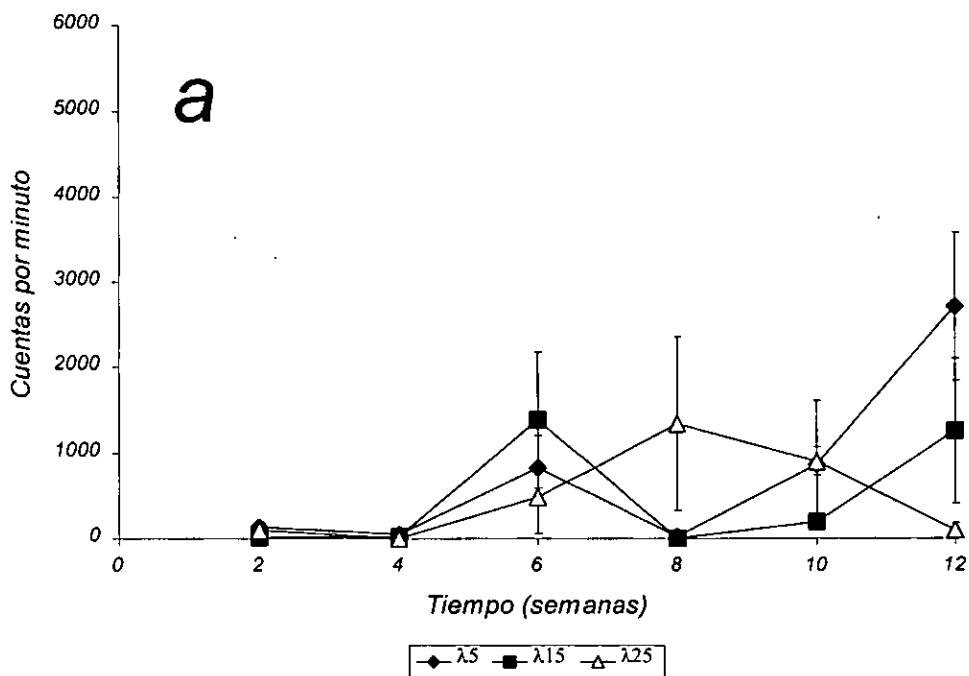
Tiempo	Dieta Hipoproteica		
	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	136 ± 59	15 ± 12	93 ± 65
4 semanas	43 ± 37	26 ± 15	0
6 semanas	826 ± 374	1383 ± 789	482 ± 418
8 semanas	29 ± 16	2 ± 1	1333 ± 1006
10 semanas	859 ± 744	188 ± 88	904 ± 168
12 semanas	2699 ± 870	1251 ± 842	99 ± 85
Tiempo	Dieta Normal		
	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	0	0	0
4 semanas	21 ± 18	150 ± 130	3121 ± 1950
6 semanas	1951 ± 745	3873 ± 1213	728 ± 389
8 semanas	19 ± 16	32 ± 28	836 ± 708
10 semanas	319 ± 276	850 ± 700	571 ± 495
12 semanas	648 ± 561	0	0.66 ± 0.3

En la Fig. 7, podemos observar que al igual que en la estimulación con ConA, la estimulación es mayor en los ratones con la dieta normal (b) que en los ratones mal nutridos (a). En el caso de los ratones con la dieta hipoproteica (a), aparentemente la estimulación no es buena en los tiempos iniciales y aumenta en los tiempos finales. Al contrario en los ratones con dieta normal (b), la estimulación es alta en los tiempos intermedios y disminuye un poco en los

tiempos finales, sin desaparecer del todo.

En el análisis estadístico (pag.56), se encontró que el efecto está dado por la interacción de la dieta con el tiempo, y del inóculo con el tiempo, por lo que se procedió a hacer el análisis por tiempo. En el análisis por tiempo, no se encontró efecto significativo en ningún tiempo, lo que nos dice que las diferencias aparentes que se observan en la figura 7, no son estadísticamente significativas.

Proliferación celular estimulada con antígeno en ratones con una dieta hipoprotéica



Proliferación celular estimulada con antígeno en ratones con una dieta normal

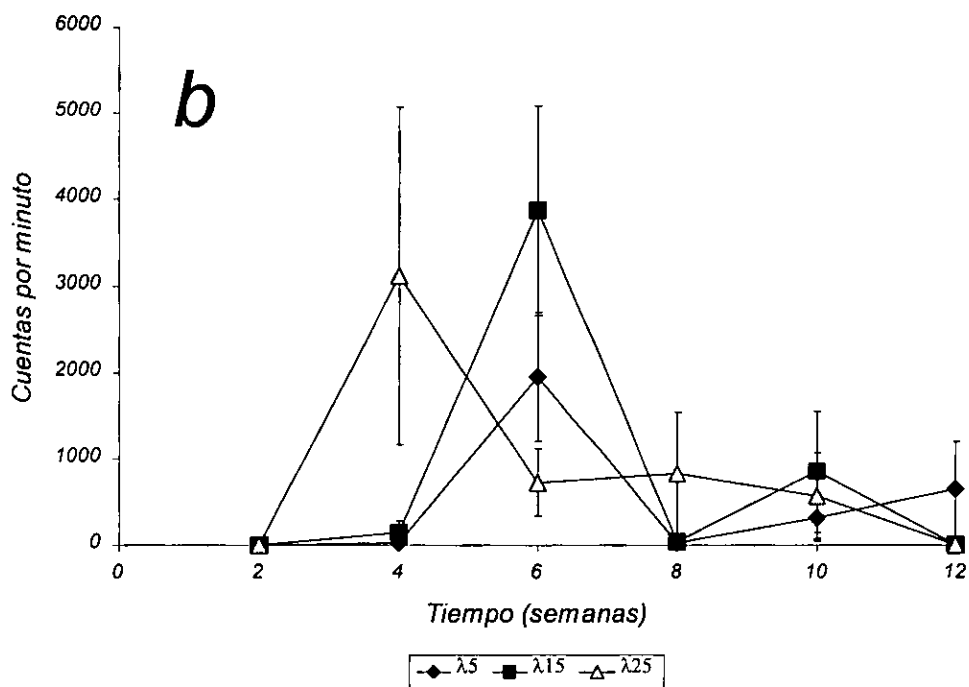


Figura 7 Proliferación celular de células del bazo estimuladas con homogenado de antígeno, para los animales mal nutridos (a) y para los normal nutridos (b).

EFFECTO DE LA DIETA HIPOPROTEICA SOBRE LOS NIVELES DE CITOCINAS

Para evaluar la respuesta inmune durante el desarrollo de la infección, como ya se dijo en la metodología, se midieron los niveles de diversas citocinas en los sobrenadantes de los cultivos de células del bazo durante el desarrollo de la infección. Los valores obtenidos se muestran en tablas. En base a los

valores presentados en cada tabla se realizó la gráfica correspondiente para facilitar su comparación.

Las citocinas se clasificaron en tres grupos diferentes: Las de la respuesta TH1 (IL-2, IFN- γ , IL-12) las de la respuesta TH2 (IL-4, IL-6, IL-10) y la citocina indicadora de nutrición (TNF- α).

CITOCINAS DE LA RESPUESTA TH1

IL-2

En la Tabla 5 se muestran los datos obtenidos de la concentración de IL-2 y dichos datos se observan en la Fig. 8. En el análisis estadístico (pag. 57), se encontró que el efecto está dado por la triple interacción de la dieta, el tiempo y el inóculo, lo que nos dice que los tres factores están ejerciendo efecto en la concentración de IL-2. En el análisis por tiempo, se encontró significancia en cuatro tiempos (semanas 2, 4, 8, 12). En tres de éstos cuatro tiempos (semanas 2, 8, 12) la concentración de IL-2 es mayor en los animales sanos que en los parasitados. En el otro tiempo (4) no se

encontraron diferencias significativas entre los animales sanos y los parasitados, pero sí se encontró que la concentración de IL-2 es mayor en los animales sanos que en los parasitados.

Podemos decir entonces que en general, en los tiempos estadísticamente significativos, la concentración de IL-2 es mayor en los animales sanos que en los parasitados, lo cuál nos habla de una respuesta tipo TH2. Dado que ésta citocina de la respuesta tipo TH1 está baja respecto a la concentración normal (sanos).

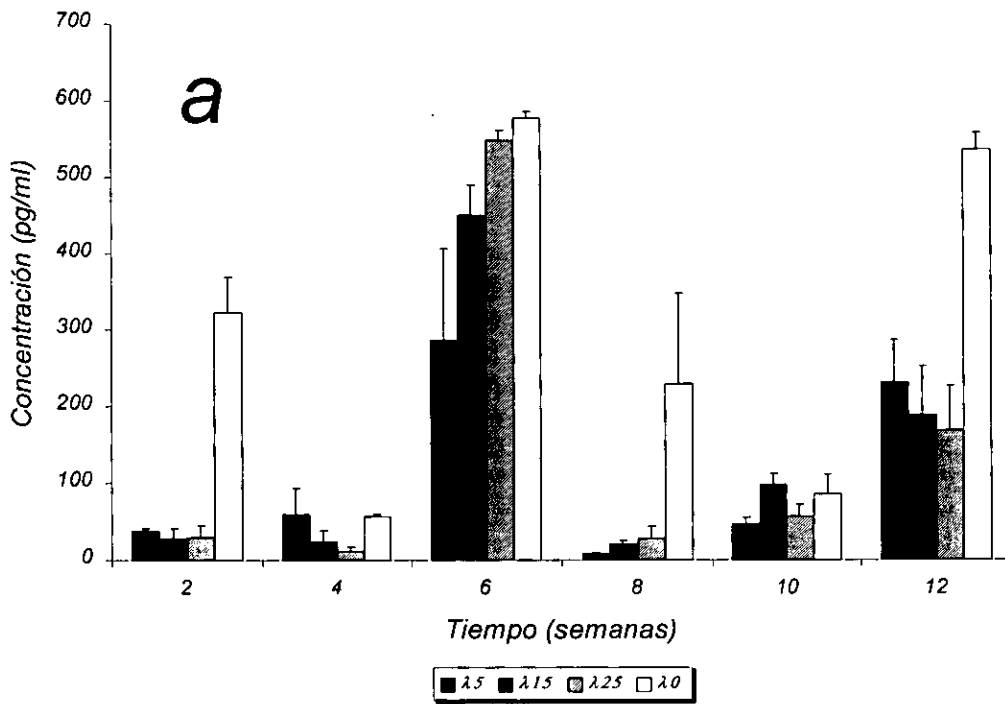
Tabla 5. Concentración de IL-2 en pg/ml del sobrenadante de los cultivos de células del bazo. Los valores que se presentan, son promedios de tres animales, cada prueba por duplicado. Se presenta también la desviación estándar de las medias.

Tiempo	Dieta Hipoproteica			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	322 ± 46	37 ± 3	27 ± 13	29 ± 16
4 semanas	56 ± 3	58 ± 33	24 ± 13	11 ± 5
6 semanas	575 ± 9	286 ± 119	449 ± 39	547 ± 12
8 semanas	228 ± 118	8 ± 1	21 ± 3	28 ± 15
10 semanas	85 ± 24	46 ± 8	97 ± 13	56 ± 15
12 semanas	533 ± 21	229 ± 55	186 ± 63	166 ± 59
Tiempo	Dieta Normal			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	441 ± 34	75 ± 14	27 ± 20	11 ± 3
4 semanas	155 ± 36	46 ± 11	162 ± 13	79 ± 21
6 semanas	452 ± 39	432 ± 27	503 ± 5	408 ± 21
8 semanas	445 ± 78	63 ± 20	95 ± 24	129 ± 23
10 semanas	44 ± 15	47 ± 18	78 ± 8	159 ± 43
12 semanas	501 ± 26	94 ± 10	138 ± 50	141 ± 49

En la figura 8, se observa una oscilación en los valores de la concentración de IL-2. Dicha oscilación es normal y se observa en otros

experimentos, puede deberse al hecho que el sistema inmune es dinámico y por lo mismo sus indicadores no se mantienen constantes en el tiempo.

Concentración de IL-2 en ratones con una dieta hipoprotéica



Concentración de IL-2 en ratones con una dieta normal

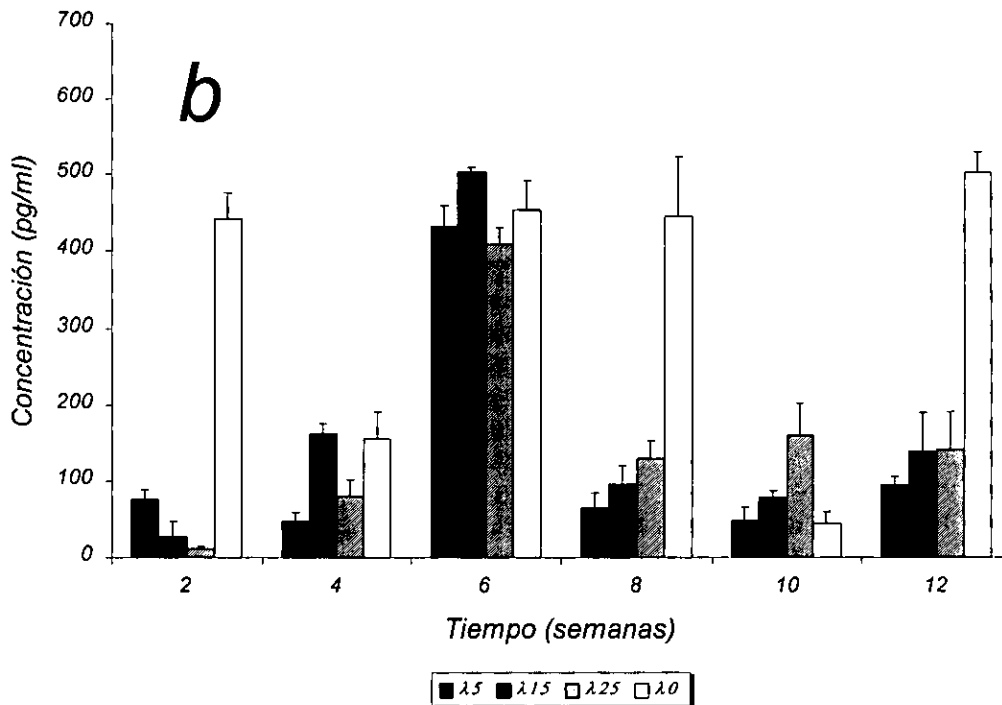


Figura 8. Concentración de IL-2 en pg/ml del sobrenadante de los cultivos de células del bazo en ratones mal nutridas (a) y en las normal nutridas (b).

IFN- γ

La concentración de IFN- γ en el desarrollo del experimento es más alta en los ratones sanos que en los ratones parasitados. En el análisis estadístico (pag. 59) se encontró que el efecto estaba dado por la triple interacción de la dieta, el inóculo y el tiempo. En el análisis por tiempo, se encontró significancia en cinco tiempos (semanas 2, 4, 6, 8, 12). En las semanas 2, 4, 6 y 12, la concentración de IFN- γ en los ratones mal nutridos es significativamente mayor que la de los normal nutridos.

En cuanto a las diferencias entre los animales sanos y los parasitados, en la semana 4, en los ratones con dieta baja en proteínas, la concentración de IFN- γ , es mayor en los animales sanos

que en los parasitados, no tenemos el valor de los animales sanos con dieta normal, por lo que no podemos hacer observaciones en ese punto. En la semana 8, en los ratones con dieta normal, la concentración de IFN- γ es mayor en los animales sanos que en los parasitados.

Podemos decir entonces, que la concentración de IFN- γ es mayor en los animales sanos que en los parasitados, lo que nos habla de una respuesta TH2.

En cuanto a la dieta, la concentración de IFN- γ es mayor en los animales mal nutridos que en los animales normal nutridos.

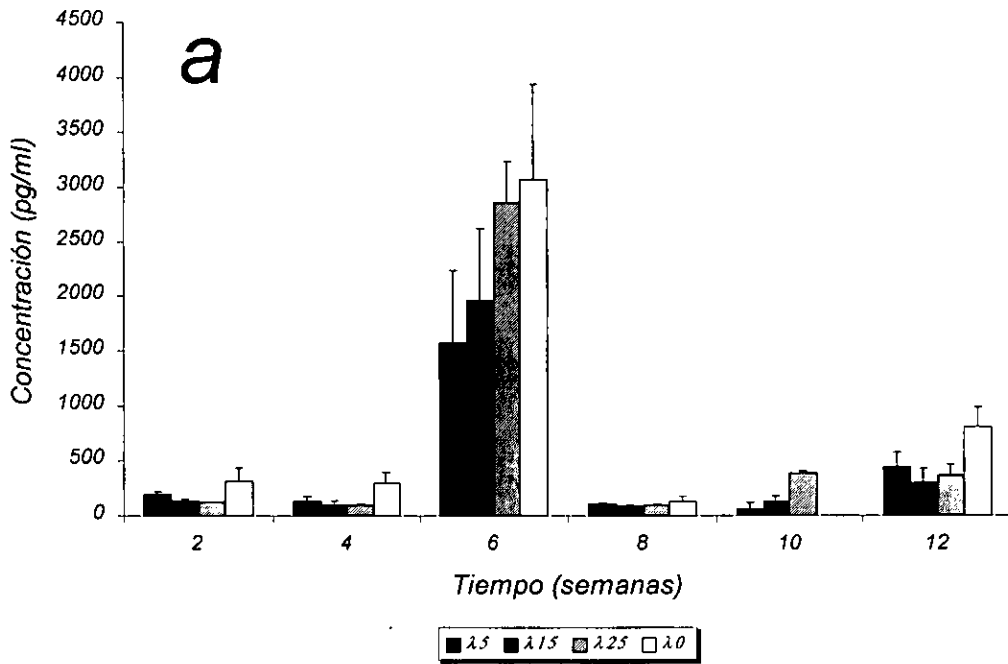
Tabla 6. Concentración de IFN- γ en pg/ml en el sobrenadante de los cultivos de células del bazo. Cada valor es el promedio para tres animales, cada uno de ellos por duplicado. Se muestra también la desviación estándar para cada promedio.

Tiempo	Dieta Hipoproteica			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	311 \pm 123	194 \pm 23	136 \pm 18	128 \pm 4
4 semanas	299 \pm 96	141 \pm 39	93 \pm 39	98 \pm 6
6 semanas	3059 \pm 864	1569 \pm 657	1955 \pm 657	2852 \pm 371
8 semanas	126 \pm 48	109 \pm 9	91 \pm 9	99 \pm 6
10 semanas		62 \pm 54	127 \pm 54	385 \pm 20
12 semanas	799 \pm 179	446 \pm 121	300 \pm 121	368 \pm 96
Tiempo	Dieta Normal			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	92 \pm 34	18 \pm 9	45 \pm 10	73 \pm 34
4 semanas		115 \pm 11	177 \pm 63	97 \pm 0
6 semanas	242 \pm 34	1335 \pm 235	261 \pm 22	151 \pm 34
8 semanas	633 \pm 87	88 \pm 8	101 \pm 6	59 \pm 87
10 semanas				
12 semanas	397 \pm 91	179 \pm 76	243 \pm 63	183 \pm 76

En el tiempo 6, se observa que los valores de la concentración de IFN- γ , para los animales mal nutridos se disparan, esto probablemente se debe a

en ese momento algún factor externo influyó en los ratones, haciendo que aumentara la producción de ésta citocina.

Concentración de IFN- γ en ratones con una dieta hipoprotéica



Concentración de IFN- γ en ratones con una dieta normal

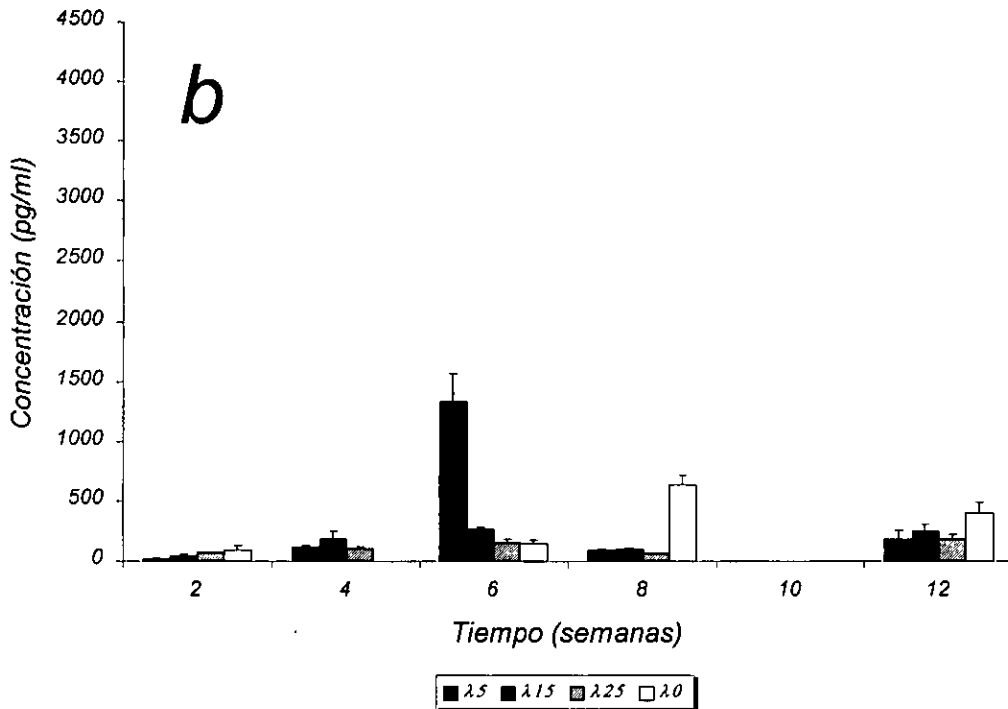


Figura 9. Concentración de IFN- γ en pg/ml del sobrenadante de los cultivos de células del bazo en los animales con dieta hipoproteica (a) y en los animales con dieta normal (b).

IL-12

En la figura 10, se observa que aparentemente la concentración de IL-12, es oscilatoria y en ocasiones es más alta en los parasitados que en los sanos y en otros casos es lo contrario, por lo que se recurrirá a la estadística para describir lo que sucede, y en que momentos las diferencias aparentes en la concentración de IL-12 son estadísticamente significativas y en que momentos no.

En los animales mal nutridos, la concentración de IL-12 es menor en los animales infectados que en los sanos (excepto semanas 4 y 10). En los animales normal nutridos esto ocurre en las semanas 2 y 8.

En el análisis estadístico (pag. 60) se encontró que el efecto está dado por la triple interacción entre la dieta, el inóculo y el tiempo. En el análisis por tiempo, se encontró significancia en tres tiempos (semanas 2, 8, 12). En las semanas 2 y 8, la concentración de IL-12 es mayor en los animales sanos que en los parasitados. Respecto al efecto de la dieta, en la semana 8, la concentración de IL-12 es mayor en los animales

normal nutridos que en los mal nutridos. En el tiempo 12, se encontró que de los animales mal nutridos, la concentración de IL-12 es mayor en los sanos que en los parasitados. En los animales normal nutridos, no se observaron diferencias significativas en éste tiempo (semana 12).

Podemos decir entonces, que en los tiempos en que hay diferencias estadísticamente significativas, la concentración de IL-12 es mayor en los animales sanos que en los parasitados, lo cuál nos habla de una respuesta tipo TH2.

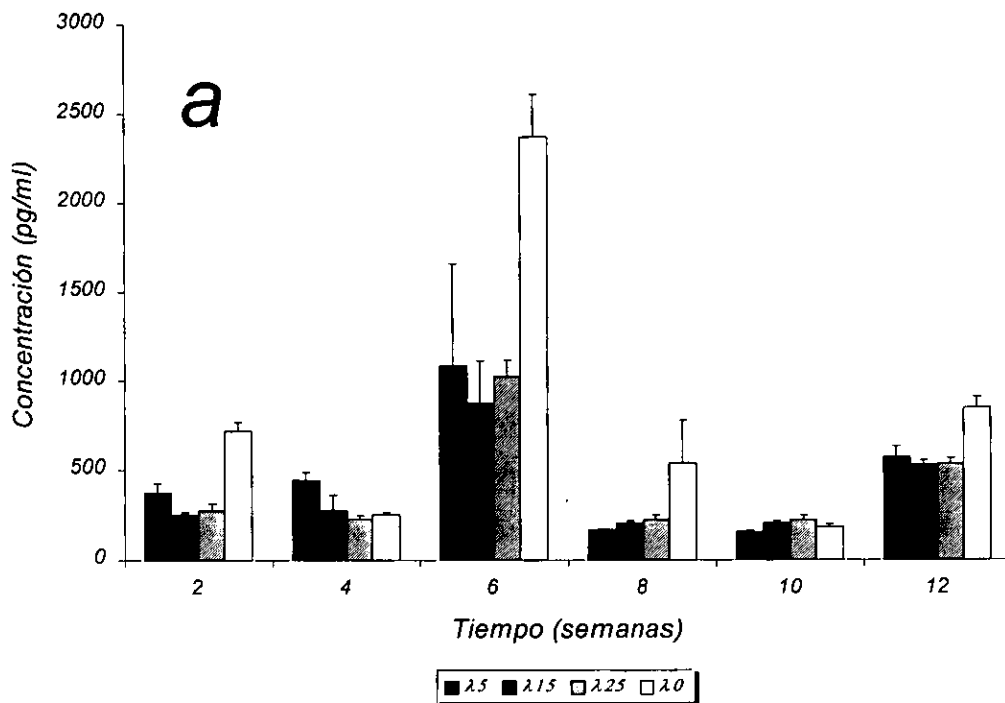
Los tiempos en los que aparentemente la concentración de IL-12 es mayor en los animales parasitados que en los sanos, no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la dieta, la concentración de IL-12 es mayor en los animales con dieta normal que en los animales con dieta hipoproteica.

Tabla 7. Concentración de IL-12 en pg/ml en el sobrenadante de los cultivos de células del bazo. Cada valor es el promedio de tres animales, cada uno de ellos por duplicado. Se muestran también las desviaciones estándar para cada promedio.

Tiempo	Dieta Hipoproteica			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	721 ± 49	373 ± 53	252 ± 10	280 ± 35
4 semanas	255 ± 11	449 ± 43	279 ± 84	229 ± 16
6 semanas	2361 ± 237	1084 ± 572	869 ± 238	1019 ± 95
8 semanas	540 ± 234	167 ± 10	207 ± 11	221 ± 25
10 semanas	180 ± 21	158 ± 2	207 ± 11	221 ± 25
12 semanas	839 ± 63	567 ± 63	529 ± 18	530 ± 29
Tiempo	Dieta Normal			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	749 ± 188	368 ± 85	257 ± 72	184 ± 6
4 semanas	383 ± 9	283 ± 13	475 ± 61	326 ± 95
6 semanas	1067 ± 339	1281 ± 31	1261 ± 44	686 ± 42
8 semanas	791 ± 8	291 ± 48	397 ± 34	472 ± 35
10 semanas	220 ± 6	443 ± 173	279 ± 36	343 ± 40
12 semanas	428 ± 58	423 ± 39	624 ± 40	567 ± 25

Concentración de IL-12 en ratones con una dieta hipoprotéica



Concentración de IL-12 en ratones con una dieta normal

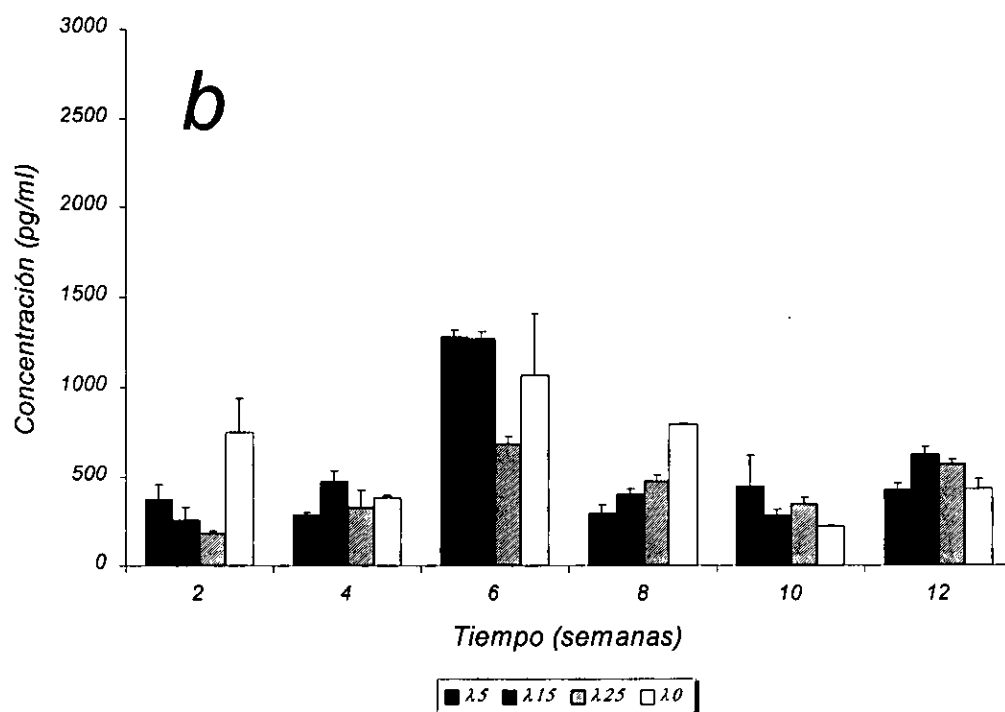


Figura 10. Concentración de IL-12 en pg/ml del sobrenadante de los cultivos de células del bazo en las ratones mal nutridas (a) y en las normal nutridas (b).

CITOCINAS DE LA RESPUESTA TH2

IL-4

En la Figura 11 se observa que en los ratones con dieta hipoproteica la concentración de IL-4 es mayor en los ratones parasitados que en los sanos. En los ratones con dieta normal, la concentración de IL-4 en los tiempos iniciales es mayor en los ratones sanos que en los parasitados y en los tiempos finales la concentración de IL-4 es mayor en los ratones parasitados que en los sanos.

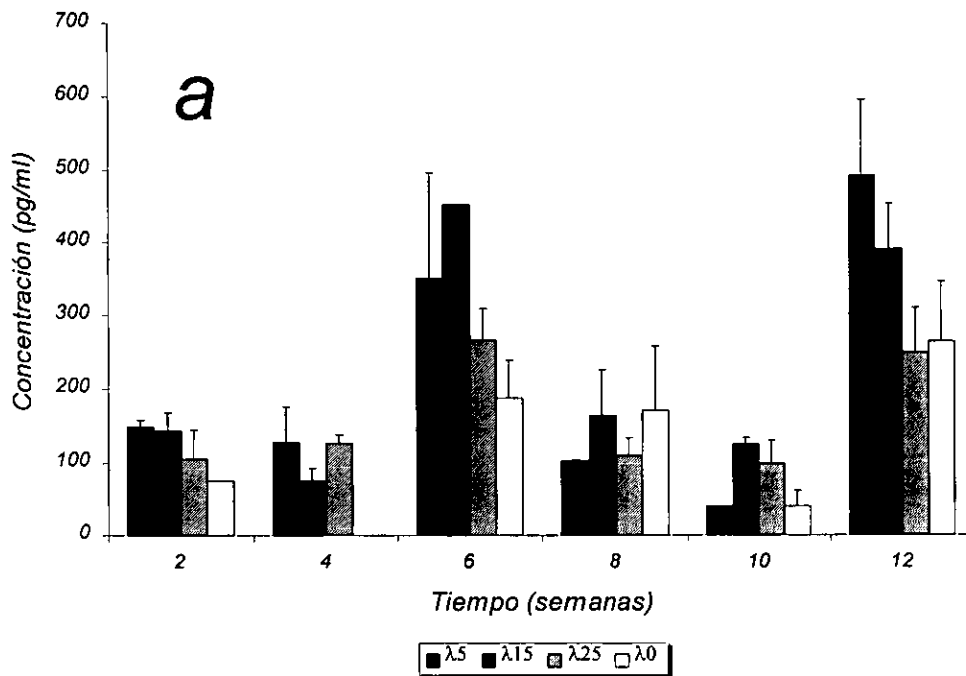
De acuerdo al análisis estadístico (pag. 62) el efecto que se observa está dado por la interacción de la dieta con el tiempo, y la interacción del inóculo con el

tiempo. En el análisis por tiempo se encontró significancia en dos tiempos (semanas 4, 8). En la semana 4, el efecto está dado por la interacción de la dieta con el inóculo, pero por no tener los datos de los animales sanos en éste tiempo, no se pueden hacer conclusiones. El efecto de la dieta es el mismo en las semanas 4 y 8, siendo que hay mayor concentración de IL-4 en los animales alimentados con una dieta normal que en los animales mal nutridos.

Tabla 8. Concentración de IL-4 en pg/ml en el sobrenadante de los cultivos de células del bazo. Se muestran valores promedio de tras ratones por cada caso, y cada uno de ellos a su vez por duplicado. Se muestran también los valores de la desviación estándar de cada promedio.

Tiempo	Dieta Hipoproteica			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	75.3 ± 0	149.7 ± 7	144.1 ± 23	105.1 ± 39
4 semanas		128.4 ± 47	75.3 ± 17	126.9 ± 11
6 semanas	187.4 ± 50	349.9 ± 144	451.6 ± 0	265.3 ± 42
8 semanas	170.2 ± 86	103.0 ± 1	162.9 ± 63	109.7 ± 23
10 semanas	40.3 ± 20	40.3 ± 0	125.3 ± 8	98.2 ± 31
12 semanas	263.2 ± 81	489.2 ± 103	388.9 ± 62	248.9 ± 60
Tiempo	Dieta Normal			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	234.7 ± 126	187.1 ± 92	112.3 ± 59	47.4 ± 8
4 semanas		153.8 ± 14	466.6 ± 80	175.1 ± 63
6 semanas	168.9 ± 42	85.5 ± 6	86.4 ± 16	63.2 ± 21
8 semanas	375.3 ± 13	154.1 ± 33	210.0 ± 49	196.1 ± 16
10 semanas	16.6 ± 0	26.6 ± 4	121.0 ± 57	147.8 ± 52
12 semanas	145.1 ± 57	296.1 ± 81	248.2 ± 35	286.9 ± 157

Concentración de IL-4 en ratones con una dieta hipoprotéica



Concentración de IL-4 en ratones con una dieta normal

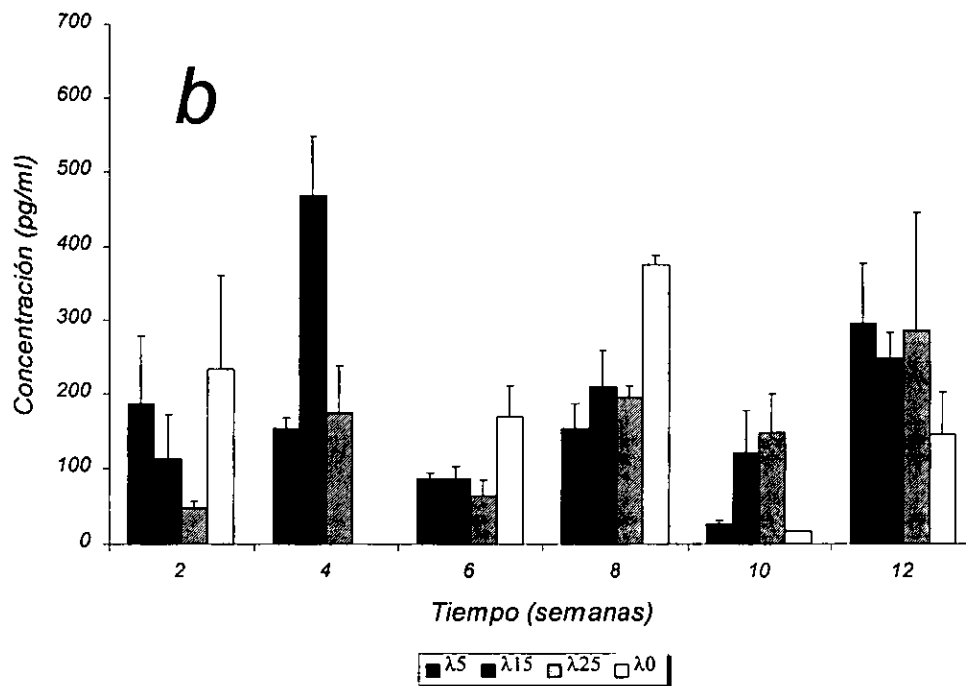


Figura 11. Concentración de IL-4 en pg/ml del sobrenadante de los cultivos de células del bazo en las ratones mal nutridas (a) y en las normal nutridas (b).

IL-6

De acuerdo a los datos que se presentan en la figura 12, observamos que en general, los ratones parasitados presentan una mayor concentración de IL-6 que los ratones sanos, esto sin importar la dieta y el tamaño del inóculo ó el tiempo.

En el análisis estadístico (pag. 63) se encontró que el efecto está dado por la triple interacción entre la dieta, el inóculo y el tiempo. En el análisis por tiempo, se encontró significancia en cuatro tiempos diferentes (semanas 2, 4, 8, 12). En las semanas 2, 4 y 12, se observó que la concentración de IL-6 es mayor en los animales parasitados que

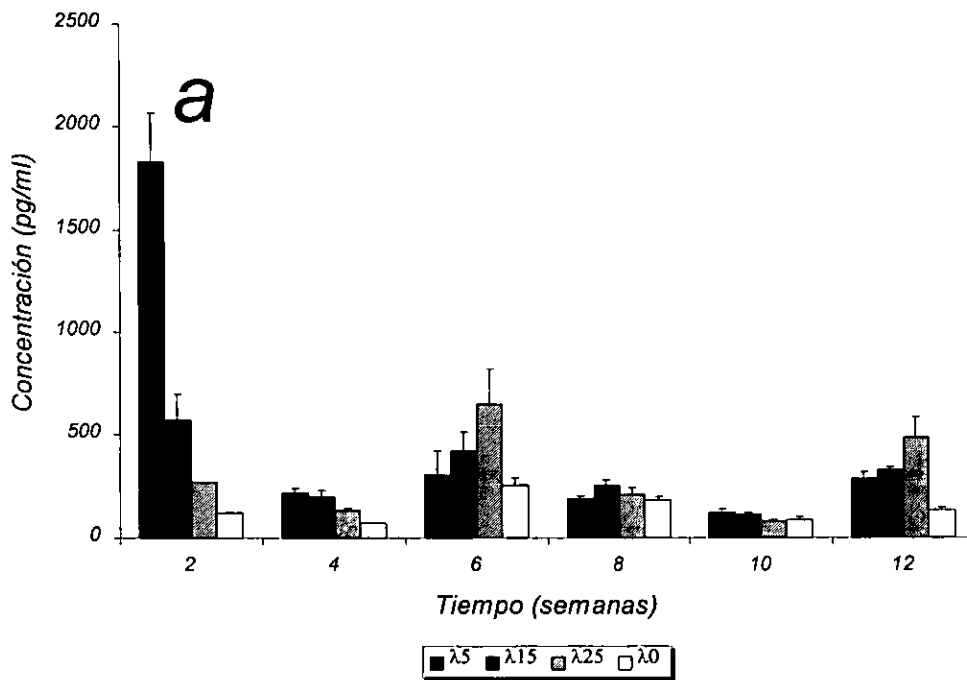
en los sanos. En cuanto a la dieta, se encontró que en las semanas 2 y 12 la concentración de IL-6 es mayor en los animales mal nutridos que en los normal nutridos. El único tiempo que se opone a éstas observaciones es el tiempo 8, en el que los ratones sanos con dieta normal, presentan mayor concentración de IL-6 que todos los demás animales en ese tiempo (semana 8).

Podemos decir entonces que la respuesta inmune que estamos viendo es de tipo TH2. En cuanto a la dieta, la concentración de IL-6, es mayor en los animales con dieta hipoproteica que en los animales con dieta normal.

Tabla 9. Concentración de IL-6, en pg/ml, en el sobrenadante de los cultivos de células del bazo. Se muestran valores promedio de tres ratones por cada caso y cada uno de ellos a su vez por duplicado. Se muestran también los valores de la desviación estándar de cada promedio.

Tiempo	Dieta Hipoproteica			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	121 ± 5	1826 ± 239	571 ± 128	266 ± 0
4 semanas	68 ± 2	219 ± 17	199 ± 30	132 ± 7
6 semanas	252 ± 35	301 ± 115	421 ± 87	650 ± 170
8 semanas	183 ± 15	187 ± 13	254 ± 26	209 ± 32
10 semanas	88 ± 13	122 ± 13	113 ± 7	80 ± 3
12 semanas	129 ± 17	281 ± 31	322 ± 18	482 ± 97
Tiempo	Dieta Normal			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	107 ± 7	162 ± 21	144 ± 12	112 ± 28
4 semanas	72 ± 1	184 ± 15	222 ± 44	141 ± 23
6 semanas	284 ± 20	365 ± 72	373 ± 33	385 ± 46
8 semanas	414 ± 17	186 ± 5	257 ± 20	257 ± 33
10 semanas	73 ± 2	502 ± 335	109 ± 15	120 ± 20
12 semanas	112 ± 12	217 ± 18	246 ± 25	301 ± 65

Concentración de IL-6 en ratones con una dieta hipoprotéica



Concentración de IL-6 en ratones con una dieta normal

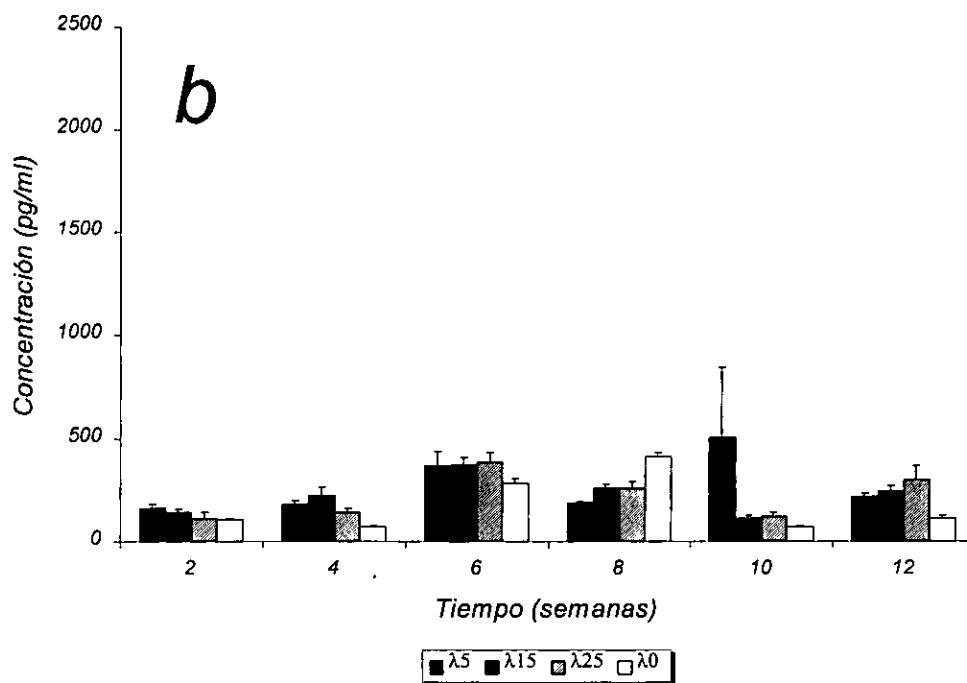


Figura 12. Concentración de IL-6 en pg/ml del sobrenadante de los cultivos de células del bazo de los ratones mal nutridos (a) y de los normal nutridos (b).

IL-10

En la figura 13, se observa que la concentración de IL-10 es mayor en los ratones parasitados que en los sanos, lo cuál se da en ambas dietas y en casi todos los tiempos con excepción del tiempo 8 en el que la relación es la contraria.

Se observa que en ambas dietas la concentración de IL-10 presenta un comportamiento oscilatorio, lo cuál ya se había observado para otras citocinas, y como se explicó anteriormente, posiblemente se deba a la naturaleza dinámica de los seres vivos.

La IL-10 es alta en la semana 6 en los animales con dieta hipoproteica e infectados y también es alta en la semana 12 para los animales con dieta normal e infectados, lo cuál nos habla de una respuesta tipo TH2, la cuál se encuentra estrechamente relacionada a la patología.

En el análisis estadístico (pag.65), se encontró que el efecto esta dado por las interacciones de la dieta con el tiempo y del inóculo con el tiempo. En el análisis por tiempo, se encontraron

diferencias significativas en cuatro tiempos (semanas 2, 4, 6, 8). En los tiempos 2, 4 y 6, se encontró que la concentración de IL-10 es mayor en los animales parasitados que en los sanos. En los tiempos 4 y 8 se encontró mayor concentración de IL-10 en los animales normal nutridos que en los mal nutridos. En el tiempo 6, en contraparte al los tiempos 4 y 8, hay mayor concentración de IL-6 en los animales mal nutridos que en los normal nutridos. El tiempo 8 aparentemente presenta mayor concentración de IL-10 en los animales sanos que en los parasitados.

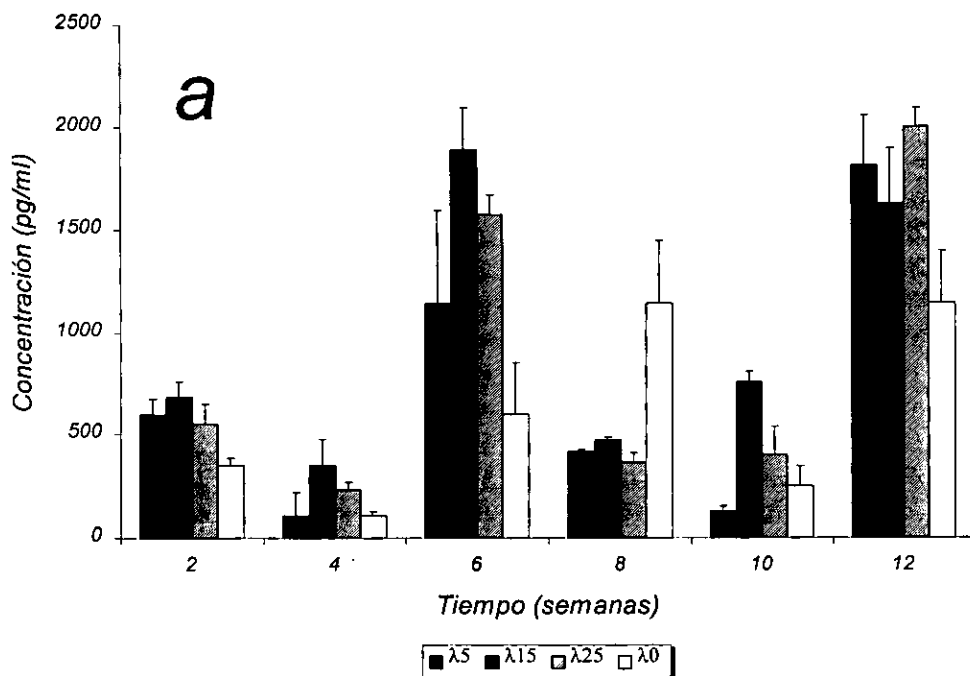
Podemos decir, entonces que el tipo de respuesta inmune que estamos observando es TH2, ya que en la mayor parte del tiempo (excepto semana 8), la concentración de IL-10 es mayor en los animales parasitados que en los sanos.

En cuanto al efecto de la dieta, no queda claro, pues en dos tiempos (semanas 4 y 8) es mayor la concentración de IL-10 en los animales normal nutridos que en los mal nutridos, y en un tiempo (6) es al contrario.

Tabla 10. Concentración de IL-10 en pg/ml del sobrenadante de los cultivos de células del bazo. Cada dato, es el promedio de tres ratones, cada prueba se hizo a cada ratón por duplicado. Se muestran también las desviaciones estándar de los promedios.

Tiempo	Dieta Hipoproteica			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	348 ± 35	597 ± 75	685 ± 73	551 ± 95
4 semanas	108 ± 18	705 ± 110	347 ± 130	235 ± 34
6 semanas	598 ± 251	1138 ± 451	1888 ± 202	1572 ± 94
8 semanas	1141 ± 304	418 ± 7	472 ± 16	364 ± 46
10 semanas	250 ± 94	124 ± 26	754 ± 51	400 ± 138
12 semanas	1142 ± 250	1805 ± 244	1626 ± 264	1991 ± 92
Tiempo	Dieta Normal			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	244 ± 65	643 ± 60	735 ± 40	697 ± 22
4 semanas	177 ± 15	864 ± 32	1105 ± 187	785 ± 136
6 semanas	628 ± 95	535 ± 29	608 ± 149	729 ± 41
8 semanas	1572 ± 88	885 ± 75	1110 ± 54	876 ± 41
10 semanas	268 ± 82	1089 ± 539	1085 ± 297	1285 ± 256
12 semanas	418 ± 152	1514 ± 396	1480 ± 215	1930 ± 512

Concentración de IL-10 en ratones con una dieta hipoprotéica



Concentración de IL-10 en ratones con una dieta normal

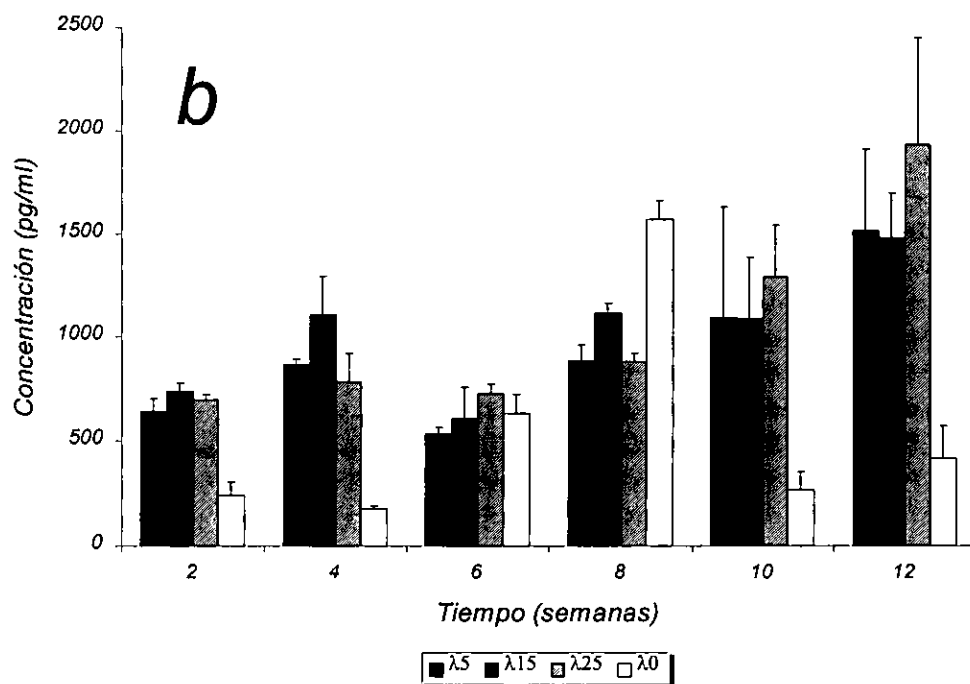


Figura 13. Concentración de IL-10 en pg/ml del sobrenadante de los cultivos de células del bazo en los ratones mal nutridos (a) y en los normal nutridos (b).

CITOCINA INDICADORA DE NUTRICIÓN

TNF- α

En la figura 14, se observa que es mayor la concentración de TNF- α en los ratones con dieta normal que en los que están mal nutridos. En general la concentración de TNF- α es mayor en los ratones parasitados que en los ratones sanos, independientemente de la nutrición.

En el análisis estadístico (pag.67), encontramos que la significancia esta dada por la triple interacción de los tres factores (la dieta, el inóculo, el tiempo). En el análisis por tiempo se encontró efecto significativo en los tiempos 4, 6 y 12. No es posible extraer un

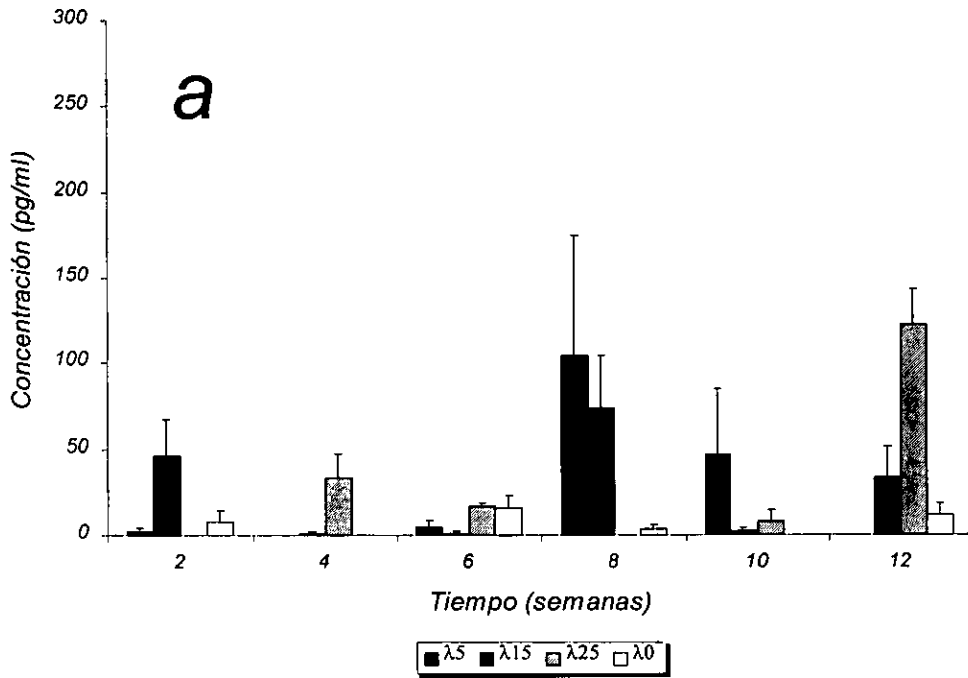
comportamiento general ya que para cada tiempo se obtiene un resultado completamente diferente de cuál es la población que difiere de las otras. En el tiempo 4, la mayor concentración de TNF- α está en los animales normal nutridos, parasitados con inóculo λ_{25} . En el tiempo 6 en los animales normal nutridos, parasitados con inóculo λ_{25} y en el tiempo 12 los mal nutridos, parasitados con inóculo λ_{25} .

Como podemos observar, no es nada claro lo que está sucediendo. Es difícil obtener información de éstos datos.

Tabla 11. Concentración de TNF- α en pg/ml en el sobrenadante de los cultivos de células del bazo. Los valores que se muestran son promedios de tres ratones, a cada uno de los cuáles se les aplicó la prueba por duplicado.

Tiempo	Dieta Hipoproteica			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	7.8 \pm 6	2.3 \pm 2	45.8 \pm 21	0
4 semanas	0	0	1.3 \pm 1	33.6 \pm 13
6 semanas	15.7 \pm 7	4.6 \pm 3	1.2 \pm 1	17.0 \pm 1
8 semanas	3.6 \pm 2	103.6 \pm 70	73.6 \pm 30	0.1 \pm 0
10 semanas	0.1 \pm 0	46.8 \pm 37	2.3 \pm 2	7.8 \pm 6
12 semanas	11.3 \pm 7	0	33.6 \pm 17	121.4 \pm 20
Tiempo	Dieta Normal			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 5$	$\lambda = 15$	$\lambda = 25$
2 semanas	1.2 \pm 1	4.6 \pm 2	6.9 \pm 4	2.4 \pm 1
4 semanas	3.4 \pm 2	53.6 \pm 14	65.8 \pm 21	184.7 \pm 23
6 semanas	8.1 \pm 5	223.6 \pm 34	100.3 \pm 22	58.1 \pm 12
8 semanas	24.7 \pm 6	139.2 \pm 11	130.3 \pm 19	121.4 \pm 30
10 semanas	14.3 \pm 6	19.1 \pm 9	0	0
12 semanas	71.4 \pm 20	0	58.1 \pm 11	48.1 \pm 7

Concentración de TNF- α en ratones con una dieta hipoprotéica



Concentración de TNF- α en ratones con una dieta normal

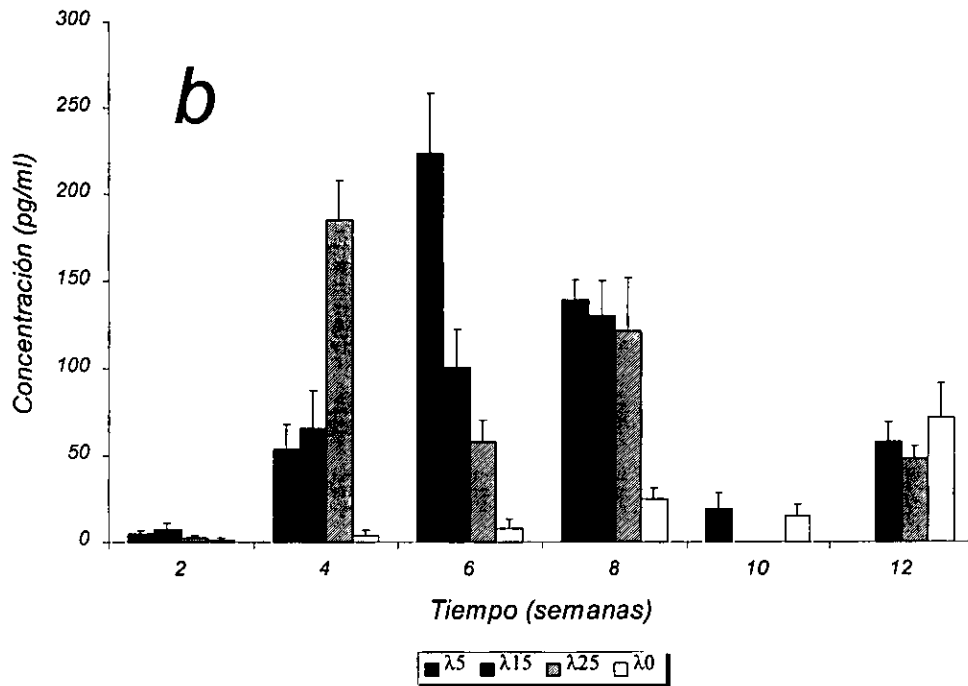


Figura 14. Concentración de TNF- α en pg/ml del sobrenadante de los cultivos de células del bazo, en animales con dieta hipoproteica (a) y en animales con dieta normal (b).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental que se manejó es de tipo factorial (Apéndice pag. 79) por lo que el análisis estadístico que se eligió es el análisis de varianza factorial aleatorizado (Apéndice pag. 80). En este tipo de diseño se tienen tres factores: la dieta, el inóculo y el tiempo. Cada uno de estos factores tienen a su vez niveles; la dieta tiene dos niveles: la de 6% de caseína y la normal; el inóculo tiene cuatro niveles que son λ_0 , λ_5 , λ_{15} y λ_{25} ; y el tiempo tiene doce niveles que son cada una de las doce semanas en el caso de la cuenta de cisticercos, y las semanas pares en el caso de las cuentas de proliferación celular y de los niveles de citocinas, ésto debido a que fueron esos los tiempos en los que se evaluó la infección. En adelante se utilizará el término tiempo, refiriéndome a las semanas, es decir, el tiempo 2 es la semana 2 y así sucesivamente.

Se hizo un análisis de varianza general para cada una de las variables dependientes de donde se pueden

concluir los efectos. Para cada análisis se hace un cuadro en el que se reportan los resultados obtenidos. Después del análisis general, se hizo un análisis por tiempo para cada una de las variables, y en el caso de encontrar significancia en las interacciones se hizo un análisis de tipo Tukey (pag. 85), el cual fue de gran ayuda para encontrar en que nivel se encontraban las diferencias significativas en cada caso. Solo se reportan los tiempos en los que se encontró significancia, ya que en los otros tiempos no hay diferencias significativas, y podemos decir que el efecto de los tratamientos es el mismo. Para cada variable dependiente se hizo un cuadro resumen del análisis por tiempo, en el que sólo se muestra si se encontró significancia o no, tanto en el modelo como en las interacciones.

CARGAS PARASITARIAS.

Variable dependiente: **Cuenta de cisticercos.**

▪ ANÁLISIS GENERAL.

En el caso particular en que la variable dependiente es la cuenta de cisticercos (pag. 23), no se tomó en cuenta el inóculo control (λ_0), ésto debido a que en términos biológicos es distinto ser un individuo no parasitado a ser uno parasitado. El incluir en el análisis a los individuos sanos podría haber resultado en falsas significancias, ya que estadísticamente al agregar tres ceros por cada tiempo, la varianza aumenta.

En el análisis general, se observa que el inóculo por si solo es significativo, pero no en su interacción con la dieta y el tiempo, lo cual se debe a que la cantidad de cisticercos inoculada inicialmente, influye por si misma

significativamente en la cuenta de cisticercos.

Otro factor significativo, es la interacción de la dieta con el tiempo lo que indica que la dieta tiene su efecto a través del tiempo. Se hizo un análisis de tipo Tukey, para la interacción dieta-tiempo, de donde se obtuvo como resultado que en los tiempos iniciales las diferencias entre las dietas no son significativas, lo cual cambia en los tiempos finales, en los que se observó una diferencia significativa entre ambas dietas.

Fuente	df	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr > F
Modelo	35	38543267.583	1101236.217	11.61	0.0001
Error	72	6831367.333	94880.102		
Total Corregido	107	45374634.917			
Dieta	1	2975052.083	2975052.083	31.36	0.0001
Inóculo	2	1635733.556	817866.778	8.62	0.0004
Dieta*Inóculo	2	8050.667	4025.333	0.04	0.9585
Tiempo	5	28177782.306	5635556.461	59.40	0.0001
Dieta*Tiempo	5	3550296.306	710059.261	7.48	0.0001
Inóculo*Tiempo	10	1580742.889	158074.289	1.67	0.1057
Dieta*Inóculo*Tiempo	10	615609.778	61560.978	0.65	0.7671

- *ANÁLISIS POR TIEMPO.*

En el análisis por tiempo se encontró significancia en los tiempos 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 11.

En el tiempo 1, se observa significancia en la interacción dieta inóculo, esto se debe a que el efecto de la dieta interacciona con el inóculo, en el análisis Tukey de dicha interacción, se encontraron diferencias significativas entre el inóculo menor (λ_5) y los otros dos inóculos, pero aparentemente no se observaron diferencias significativas entre las dietas.

En los tiempos 3, 4, 5 y 7, la significancia está dada por el inóculo, encontrándose que el inóculo mayor (λ_{25}) es significativamente diferente del inóculo menor (λ_5) y el inóculo intermedio (λ_{15}) es estadísticamente similar a los otros dos inóculos. No se encontraron diferencias significativas entre las dietas.

En las semanas 8, 9 y 10, la significancia está dada tanto por la dieta como por el inóculo, pero no hay interacción entre ambas. El efecto de la dieta es que los ratones con dieta normal, presentaron cargas parasitarias

significativamente mayores que las de los ratones con dieta hipoproteica. En cuanto al inóculo, se encontró que los inóculos extremos (λ_5 y λ_{25}) son significativamente diferentes entre sí, pero el inóculo intermedio (λ_{15}) no lo es.

En la semana 11, la significancia está dada por la dieta, y se observó que los ratones con dieta normal presentan una cuenta de cisticercos significativamente mayor que los ratones con una dieta hipoproteica.

En general, se observó que la diferencia entre los inóculos es significativa entre el inóculo mayor (λ_{25}) y el menor (λ_5), mientras que no se observaron diferencias significativas entre el inóculo intermedio (λ_{15}) y los otros dos inóculos. Lo que puede interpretarse como que la cuenta de cisticercos se ve afectada por el inóculo inicial, pero son los inóculos extremos lo que muestran diferencias significativas respecto al efecto de la dieta.

Fuente	PR>F					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
Modelo	0.0001	0.0579	0.0479	0.0067	0.0364	0.2113
Dieta	0.0790	0.9420	0.4130	0.1217	0.3781	1.0000
Inóculo	0.0001	0.0098	0.0077	0.0028	0.0071	0.0408
Dieta*Inóculo	0.0436	0.6768	0.9883	0.1095	0.5915	1.0000

Fuente	PR>F					
	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12
Modelo	0.0327	0.0077	0.0001	0.0019	0.0182	0.3665
Dieta	0.0762	0.0061	0.0004	0.0002	0.0068	0.0607
Inóculo	0.0105	0.0084	0.0001	0.0291	0.1230	0.5429
Dieta*Inóculo	0.7931	0.4941	0.7650	0.3564	0.1523	0.8121

PROLIFERACIÓN CELULAR.

Variable dependiente: **ConA**.

▪ ANÁLISIS GENERAL.

Para la proliferación de células del bazo, estimuladas con ConA (pag.28) se encontró en el análisis general que el efecto está dado por la interacción de la dieta con el tiempo, lo cuál nos indica que el efecto de la dieta se ve en el

tiempo, en términos generales aparentemente las ratones con una dieta normal tienen una mejor estimulación con Con A que las ratones con dieta hipoproteica.

Fuente	df	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr > F
Modelo	47	551136175007	11726301596	7.98	0.0001
Error	94	138199842723	1470211093		
Total Corregido	141	689336017730			
<i>Dieta</i>	1	2688123660	2688123660	1.83	0.1796
<i>Inóculo</i>	3	480694612	160231537	0.11	0.9547
<i>Dieta*Inóculo</i>	3	2278746229	759582076	0.52	0.6718
<i>Tiempo</i>	5	496049075947	99209815189	67.48	0.0001
<i>Dieta*Tiempo</i>	5	22170265507	4434053101	3.02	0.0144
<i>Inóculo*Tiempo</i>	15	15977466231	1065164415	0.72	0.7541
<i>Dieta*Inóculo*Tiempo</i>	15	11800546406	786703094	0.54	0.9145

▪ ANÁLISIS POR TIEMPO.

En el análisis por tiempo, se encontró efecto significativo en las semanas 2, 8 y 12.

En la semana 2, el efecto está dado por la dieta y por el inóculo pero no por la interacción de ambos, la proliferación celular es mayor en los ratones con dieta normal sanos que en los parasitados igualmente con dieta normal. En cuanto a los ratones con dieta hipoproteica, no se observaron diferencias.

En la semana 8, el efecto está dado por la dieta, y la proliferación es mejor en los ratones con dieta normal que en los que están con la dieta hipoproteica.

En la semana 12, el efecto está dado por la interacción entre la dieta y el inóculo, de acuerdo al análisis de Tukey, se observa que la proliferación está en el

siguiente orden: la mayor es en los ratones sanos con dieta hipoproteica, en segundo término, se encuentran los ratones sanos con dieta normal y finalmente no hay diferencias significativas entre los ratones parasitados sin importar la dieta.

Concluimos entonces que la proliferación de células del bazo estimuladas con ConA, es mayor en los animales con dieta normal que en los animales con dieta baja. Así mismo dicha proliferación, es mejor en los animales sanos que en los parasitados.

Fuente	PR>F					
	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
Modelo	0.0001	0.4791	0.6980	0.0173	0.1860	0.0001
Dieta	0.0005	0.9451	0.1296	0.0030	0.0266	0.0036
Inóculo	0.0001	0.2098	0.8918	0.1745	0.5143	0.0001
Dieta*Inóculo	0.4251	0.6268	0.6893	0.2551	0.3692	0.0002

Variable dependiente: **Ag**

▪ ANÁLISIS GENERAL.

Los resultados experimentales para la proliferación de células estimuladas con el homogenado de antígeno, se muestran en la Tabla 4 y en la figura 7 (pag. 32). En el análisis general se observa que el efecto

significativo es el de las interacciones de la dieta con el tiempo y del inóculo con el tiempo, pero no se observa significancia en la interacción de la dieta con el inóculo. Lo que significa que el efecto de la dieta y el del inóculo es en el tiempo.

Fuente	df	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr > F
Modelo	35	93405075.922	2668716.455	2.06	0.0049
Error	72	93291414.175	1295714.086		
Total Corregido	107	186696490.097			
Dieta	1	629666.089	629666.089	0.49	0.4880
Inóculo	2	49487.998	24743.999	0.02	0.9811
Dieta*Inóculo	2	2450602.804	1225301.402	0.95	0.3932
Tiempo	5	22802825.379	4560565.076	3.52	0.0067
Dieta*Tiempo	5	17967434.105	3593486.821	2.77	0.0240
Inóculo*Tiempo	10	34276026.670	3427602.667	2.65	0.0083
Dieta*Inóculo*Tiempo	10	15229032.877	1522903.288	1.18	0.3216

▪ ANÁLISIS POR TIEMPO.

En el caso en que la variable dependiente es el antígeno en el análisis por tiempo, no se encontró significancia

en ninguno de los tiempos, por lo que es difícil concluir algo del efecto del antígeno en la proliferación celular.

En vista de los resultados obtenidos, no se pueden obtener

conclusiones del efecto de éste factor.

Fuente	PR>F					
	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
Modelo	0.1529	0.1764	0.1117	0.4735	0.9025	0.0658
Dieta	0.0345	0.1789	0.0827	0.7432	0.8800	0.0480
Inóculo	0.3757	0.2124	0.0877	0.1489	0.9235	0.0674
Dieta*Inóculo	0.3757	0.1991	0.4240	0.8808	0.5335	0.3320

CITOCINAS DE LA RESPUESTA TH1.

Variable dependiente: **IL-2.**

▪ ANÁLISIS GENERAL.

Los datos experimentales se encuentran en la tabla 5 (pag. 33). En este caso, se obtuvo que la triple interacción entre la dieta, el inóculo y el tiempo es significativa Esto nos dice que

el efecto que observamos está dado por la interacción de la dieta con el inóculo y éste es significativamente distinto en el tiempo.

Fuente	df	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr > F
Modelo	47	4526179.4446	96301.6903	16.68	0.0001
Error	96	554207.1097	5772.9907		
Total Corregido	143	5080386.5544			
Dieta	1	24109.8761	24109.8761	4.18	0.0437
Inóculo	3	907717.5463	302572.5154	52.41	0.0001
Dieta*Inóculo	3	4274.0016	1424.6672	0.25	0.8634
Tiempo	5	2621639.6246	524327.9249	90.82	0.0001
Dieta*Tiempo	5	114141.7516	22828.3503	3.95	0.0026
Inóculo*Tiempo	15	683918.1519	45594.5435	7.90	0.0001
Dieta*Inóculo*Tiempo	15	170378.4926	11358.5662	1.97	0.0255

▪ **ANÁLISIS POR TIEMPO.**

En el análisis por tiempo, se encontró efecto en las semanas 2, 4, 8 y 12.

En la semana 2, el efecto está dado por el inóculo, y con el análisis Tukey, se observó que hay diferencia significativa entre los animales parasitados y los no parasitados (sanos), teniendo los animales sanos mayor concentración de IL-2 que los parasitados, sin importar el tamaño del inóculo.

En la semana 4, el efecto está dado por la interacción dieta-inóculo, de acuerdo al análisis Tukey, la concentración de IL-2 en los ratones sanos es la misma que la de los ratones parasitados. El efecto de la dieta, es que la concentración de IL-4 es mayor en los animales con dieta normal que en los animales con dieta hipoproteica.

En la semana 8 se observó que la dieta y el inóculo ejercen un efecto

significativo, pero no su interacción; la concentración de IL-2 de los ratones sanos fue mayor que la de los ratones parasitados y dentro de los ratones parasitados, los ratones con la dieta normal presentaron una mayor concentración de IL-2 que los ratones con la dieta hipoproteica.

En la semana 12 se encontró que la significancia está dada por el inóculo, y una vez más, los ratones sanos presentaron una mayor concentración de IL-2 que los parasitados.

Podemos concluir entonces, que dado que la concentración de IL-2 es mayor en los animales sanos que en los parasitados, la respuesta inmune que los animales están montando es del tipo TH2.

Fuente	PR>F					
	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
Modelo	0.0001	0.0006	0.0572	0.0016	0.0645	0.0001
Dieta	0.0902	0.0006	0.7032	0.0184	0.5412	0.1300
Inóculo	0.0001	0.0626	0.0691	0.0004	0.1161	0.0001
Dieta*Inóculo	0.0936	0.0423	0.0596	0.5514	0.0472	0.7165

Variable dependiente: **IFN- γ** .

▪ **ANÁLISIS GENERAL.**

En ésta citocina, se encontró que el efecto que estamos observando se debe a la triple interacción entre la dieta, el inóculo y el tiempo. Los datos

experimentales se encuentran en la tabla 6 (pag. 36). El análisis por tiempo, nos permitirá ver la interacción de la dieta con el inóculo en el tiempo.

Fuente	df	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr > F
Modelo	43	61293445.037	1425128.954	7.66	0.0001
Error	83	15451331.875	186160.625		
Total Corregido	126	76744776.912			
Dieta	1	5320632.347	5320632.347	28.58	0.0001
Inóculo	3	565234.343	188411.448	1.01	0.3916
Dieta*Inóculo	3	1147814.588	382604.863	2.06	0.1124
Tiempo	5	32573691.284	6514738.257	35.00	0.0001
Dieta*Tiempo	4	15445929.454	386148.364	20.74	0.0001
Inóculo*Tiempo	15	1273981.628	84932.109	0.46	0.9554
Dieta*Inóculo*Tiempo	12	5622136.754	468511.396	2.52	0.0071

▪ **ANÁLISIS POR TIEMPO.**

En el análisis por tiempo, se encontró significancia en casi todos los semanas. Por datos faltantes no se pudo hacer el análisis de la semana 10.

En la semana 2, el efecto esta dado por la dieta y se observa una mayor concentración de IFN- γ en los ratones mal nutridas que en los normal nutridos.

En la semana 4, el efecto está dado por la interacción dieta-inóculo, se observaron diferencias significativas entre los ratones con dieta hipoproteica, siendo mayor la concentración de IFN- γ

en los sanos que en los parasitados. Por no tener el control (sanos) para la dieta normal, no se pueden hacer observaciones en éste caso. No se observaron diferencias significativas entre las dietas, ni entre los diferentes inóculos.

En la semana 6 el efecto está dado por la dieta y se observó una mayor concentración de IFN- γ en los ratones con dieta hipoproteica que en los ratones con dieta normal. En esta semana, los valores para la concentración de ésta

citocina, se encuentran muy disparados para los animales mal nutridos. Lo cuál probablemente se debe a que en ese tiempo, los animales sufrieron algún estímulo del medio que hizo que subieran tanto, o quizás se deba a algún cambio fisiológico de los animales.

En la semana 8 el efecto está dado por la interacción dieta-inóculo. Se observó que en los ratones con dieta normal la concentración de IFN- γ es mayor en los sanos que en los parasitados, no encontrándose diferencia

significativa en los ratones con dieta hipoproteica.

En la semana 12 la significancia está dada por la dieta, y se observó una mayor concentración de IFN- γ en los ratones con dieta hipoproteica que en los ratones con dieta normal.

De acuerdo con los niveles de ésta citocina, el tipo de respuesta inmune que los animales presentan en TH2. El efecto de la dieta es una menor concentración de IFN- γ en los animales normal nutridos que en los mal nutridos.

Fuente	PR>F					
	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
Modelo	0.0180	0.0420	0.0066	0.0001	0.0007	0.0419
Dieta	0.0010	0.1129	0.0002	0.0015	.	0.0218
Inóculo	0.1163	0.7843	0.7917	0.0001	0.0007	0.0696
Dieta*Inóculo	0.3232	0.0105	0.1099	0.0001	.	0.5799

Variable dependiente: **IL-12**.

▪ **ANÁLISIS GENERAL.**

Los datos experimentales para ésta citocina se muestran en la tabla 7 y en la figura 10 (pag. 39). En el caso de IL-12, la triple interacción entre la dieta,

el inóculo y el tiempo es significativa. Para ver la interacción de la dieta con el inóculo en el tiempo, se hizo el análisis por tiempo.

Fuente	df	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr > F
Modelo	47	22519450.164	479137.238	7.70	0.0001
Error	94	5851657.553	62251.676		
Total Corregido	141	28371107.717			
Dieta	1	240.180	240.180	0.00	0.9506
Inóculo	3	1672055.126	557351.709	8.95	0.0001
Dieta*Inóculo	3	613655.864	204551.955	3.29	0.0242
Tiempo	5	14503848.784	2900769.757	46.60	0.0001
Dieta*Tiempo	5	817418.209	163483.642	2.63	0.0287
Inóculo*Tiempo	15	2402117.503	160141.167	2.57	0.0029
Dieta*Inóculo*Tiempo	15	2314143.199	154276.213	2.48	0.0041

▪ ANÁLISIS POR TIEMPO

En el análisis por tiempo, se encontró significancia en los tiempos 2, 8 y 12.

En el tiempo 2 el efecto está dado por el inóculo, y la concentración de IL-12 es mayor en los ratones sanos (sin inóculo) que en los parasitados.

En el tiempo 8 el efecto significativo está dado tanto por la dieta como por el inóculo, pero no por la interacción de ambos. En cuanto al inóculo, la concentración de IL-12 es mayor en los ratones sanos que en los ratones parasitados, y en cuanto a las dietas, la concentración de IL-12 es mayor en los ratones con la dieta normal que en los ratones con la dieta hipoproteica.

En el tiempo 12, el efecto está dado por la interacción dieta-inóculo, se observó que la concentración de IL-12 es mayor en los ratones sanos con dieta hipoproteica que en los parasitados con dieta hipoproteica, y en el caso de los animales con dieta normal, no se observaron diferencias significativas entre los ratones sanos y los parasitados.

El hecho que la IL-12 se encuentre en mayor concentración en los animales sanos que en los parasitados, nos habla de una respuesta inmune tipo TH2. El efecto de la dieta, es que los animales normal nutridos presentan mayor concentración de ésta citocina que los mal nutridos.

Fuente	PR>F					
	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
Modelo	0.0032	0.0894	0.0572	0.0033	0.2117	0.0012
Dieta	0.8029	0.1612	0.2524	0.0041	0.0277	0.0116
Inóculo	0.0002	0.3750	0.0716	0.0016	0.5681	0.1050
Dieta*Inóculo	0.9206	0.0461	0.0613	0.8471	0.4030	0.0008

CITOCINAS DE LA RESPUESTA TH2.

Variable dependiente: **IL-4**.

ANÁLISIS GENERAL.

Para los niveles de IL-4 (pag. 42), se encontró que el efecto está dado por las interacciones dieta-tiempo e inóculo-

tiempo. Lo que nos dice que los efectos de la dieta y el inóculo, se ven en el tiempo, pero no se alteran entre sí.

Fuente	df	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr > F
Modelo	46	1746591.6620	37969.3840	2.79	0.0001
Error	87	1185830.7132	13630.2381		
Total Corregido	133	2932422.3751			
Dieta	1	566.7882	566.7882	0.04	0.8389
Inóculo	3	111788.8812	37262.9604	2.73	0.0485
Dieta*Inóculo	3	62396.7440	20798.9147	1.53	0.2135
Tiempo	5	625907.0699	125181.4140	9.18	0.0001
Dieta*Tiempo	5	473601.2499	94720.2500	6.95	0.0001
Inóculo*Tiempo	15	449673.9875	29978.2658	2.20	0.0120
Dieta*Inóculo*Tiempo	14	238934.7435	17066.7674	1.25	0.2541

ANÁLISIS POR TIEMPO.

En el análisis por tiempo se encontró significancia sólo en los tiempos 4 y 8.

En la semana 4 el efecto está dado por la interacción dieta-inóculo, por no tener los datos de los animales sanos no es posible hacer comparaciones

respecto al efecto de la enfermedad en éste tiempo. La diferencia en cuanto a la dieta, es que la concentración de IL-4 de los ratones con dieta normal es mayor que la de los ratones con dieta hipoproteica.

En la semana 8 la significancia está dada por la dieta, siendo mayor la concentración de IL-4 en los ratones con

dieta normal en los ratones con dieta hipoproteica.

De acuerdo a ésta análisis, respecto a la dieta, los animales normal nutridos presentan mayor concentración de IL-4 que los mal nutridos. Pero no se dispone de evidencias estadísticas que nos hablen de la situación real de ésta citocina, si está inhibida o activada.

Fuente	PR>F					
	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
Modelo	0.7331	0.0005	0.0707	0.0468	0.1759	0.4375
Dieta	0.6334	0.0021	0.0024	0.0173	0.9497	0.1652
Inóculo	0.5841	0.0011	0.6522	0.0641	0.0463	0.3232
Dieta*Inóculo	0.6182	0.0044	0.2384	0.4113	0.7852	0.6958

Variable dependiente: **IL-6**.

▪ **ANÁLISIS GENERAL.**

La concentración de IL-6 está reportada en la tabla 9, en la figura 12 (pag. 44). Se observó que el efecto está dado por la triple interacción entre la

dieta, el inóculo y el tiempo. En el análisis por tiempo se explicará la interacción de la dieta con el inóculo en el tiempo.

Fuente	df	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr > F
Modelo	47	10030072.462	213405.797	9.15	0.0001
Error	94	2191954.617	23318.666		
Total Corregido	141	12222027.079			
Dieta	1	277225.852	277225.852	11.89	0.0008
Inóculo	3	861437.980	287145.993	12.31	0.0001
Dieta*Inóculo	3	291191.781	97063.927	4.16	0.0082
Tiempo	5	1424193.765	284838.753	12.22	0.0001
Dieta*Tiempo	5	1689645.181	337929.036	14.49	0.0001
Inóculo*Tiempo	15	2659064.575	177270.972	7.60	0.0001
Dieta*Inóculo*Tiempo	15	2533922.285	168928.152	7.24	0.0001

▪ **ANÁLISIS POR TIEMPO.**

En el análisis por tiempo, se observó efectos significativos en los tiempos 2, 4, 8 y 12.

En el tiempo 2, se observó significancia en la interacción de la dieta con el inóculo. Se encontró la concentración de IL-6 es mayor en los ratones mal nutridos parasitados que en los ratones también mal nutridos sanos, no se observaron diferencias significativas entre los animales con la dieta normal parasitados y los sanos. La concentración de IL-6, es mayor en los ratones con dieta hipoproteica que en los ratones con dieta normal.

En el tiempo 4, la significancia está dada por el inóculo, y se observó que la concentración de IL-6 es mayor en los ratones parasitados que en los sanos.

En el tiempo 8, el efecto está dado por la interacción dieta-inóculo. En el análisis Tukey de dicha interacción, se observó que los ratones sanos con dieta normal tienen una concentración mayor de IL-6 que el resto de los ratones.

En el tiempo 12, la significancia está dada por el inóculo y por la dieta, la concentración de IL-6 en los ratones parasitados es mayor que en los ratones sanos y a su vez es mayor en los ratones con la dieta hipoproteica que en los ratones con dieta normal.

El tipo de respuesta inmune que se presenta es TH2, dado que la concentración de IL-6 es mayor en los animales parasitados que en los sanos. Los animales con dieta hipoproteica, presentan mayor concentración de IL-6 que los animales con dieta normal.

Fuente	PR>F					
	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
Modelo	0.0001	0.0021	0.2334	0.0003	0.4186	0.0038
Dieta	0.0001	0.9866	0.4573	0.0022	0.3174	0.0371
Inóculo	0.0001	0.0002	0.1233	0.0081	0.3299	0.0010
Dieta*Inóculo	0.0001	0.7151	0.3810	0.0028	0.4466	0.4738

Variable dependiente: **IL-10**.

▪ **ANÁLISIS GENERAL.**

En el caso de IL-10, se encontró significancia en las interacciones de la dieta con el tiempo y del inóculo con el tiempo. Lo que nos dice que los efectos de la dieta y el inóculo, se ven alterados

durante el tiempo, pero no interaccionan entre sí. Los resultados experimentales se muestran en la tabla 10 y en la figura 11 (pag. 46).

Fuente	df	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr > F
Modelo	47	36494000.078	776468.087	5.35	0.0001
Error	94	13647381.417	145184.909		
Total Corregido	141	50141381.495			
Dieta	1	247189.01	247189.01	1.70	0.1951
Inóculo	3	3692979.97	1230993.32	8.48	0.0001
Dieta*Inóculo	3	279094.13	93031.38	0.64	0.5907
Tiempo	5	14645936.82	2929187.36	20.18	0.0001
Dieta*Tiempo	5	7187010.83	1437402.17	9.90	0.0001
Inóculo*Tiempo	15	7141651.38	476110.09	3.28	0.0002
Dieta*Inóculo*Tiempo	15	2926027.76	195068.52	1.34	0.1926

▪ **ANÁLISIS POR TIEMPO.**

En el análisis por tiempo, se encontraron diferencias significativas entre al menos dos de las poblaciones en las semanas 2, 4, 6 y 8.

En la semana 2, la diferencia significativa está dada por el inóculo. La concentración de IL-10 es mayor en los

ratones parasitados que en los ratones sanos.

En la semana 4, la significancia está dada por la interacción de la dieta con el inóculo, se observó que la concentración de IL-10 es mayor en los ratones parasitados que en los sanos y que la concentración de IL-10, es mayor en los ratones con la dieta normal que en los ratones con la dieta hipoproteica.

En la semana 6, el efecto está dado por la dieta y el inóculo sin haber interacción entre ambos. La concentración de IL-10 es mayor en los ratones parasitados con dieta hipoproteica que en los sanos con la misma dieta, en los ratones con dieta normal no hay diferencias significativas entre los parasitados y los no parasitados (sanos).

En la semana 8 la significancia está dada por la dieta y por el inóculo pero no por la interacción de ambos. La concentración de IL-10 es mayor en los ratones sanos que en los parasitados, lo cuál se opone a las observaciones hechas en los demás tiempos y posiblemente se deba a algún factor externo que influyó en los animales en ese tiempo. En cuanto a las dietas, la concentración de IL-10 es mayor en los ratones con la dieta normal que en los ratones con la dieta hipoproteica.

En la mayor parte de los tiempos (excepto semana 8), la concentración de IL-10 es mayor en los animales parasitados que en los sanos, lo que nos habla de una respuesta inmune tipo TH2.

Fuente	Pr>F					
	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
Modelo	0.0016	0.0001	0.0057	0.0001	0.0574	0.1163
Dieta	0.5101	0.0003	0.0012	0.0001	0.0146	0.2505
Inóculo	0.0002	0.0002	0.0671	0.0001	0.1300	0.0308
Dieta*Inóculo	0.4173	0.0339	0.0916	0.8104	0.3181	0.7964

CITOCINA INDICADORA DE NUTRICIÓN.

Variable dependiente: **TNF- α**

ANÁLISIS GENERAL.

Los datos para ésta citocina, se encuentran reportados en la tabla 11 y en la figura 14 (pag. 49). En el análisis

general de TNF- α , se observa que la triple interacción entre la dieta, el inóculo y el tiempo es significativa.

Fuente	df	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr > F
Modelo	47	396804.26619	8442.64396	7.00	0.0001
Error	95	114595.52603	1206.26870		
Total Corregido	142	511399.79222			
Dieta	1	40873.35894	40873.35894	33.88	0.0001
Inóculo	3	31467.03313	10489.01104	8.70	0.0001
Dieta*Inóculo	3	5196.86041	1732.28680	1.44	0.2371
Tiempo	5	73399.15690	14679.83138	12.17	0.0001
Dieta*Tiempo	5	54155.59957	10831.11991	8.98	0.0001
Inóculo*Tiempo	15	106957.95558	7130.53037	5.91	0.0001
Dieta*Inóculo*Tiempo	15	80827.57272	5388.50485	4.47	0.0001

ANÁLISIS POR TIEMPO.

En el análisis por tiempo, se encontró significancia en tres tiempos (semanas 4, 6 y 12).

En la semana 4, la significancia está dada por la interacción dieta-inóculo, se observó una mayor concentración de TNF- α en las ratones parasitadas con inóculo 25 y dieta normal y no reportó diferencias significativas en el resto de los animales.

En la semana 6, la significancia está dada por la interacción dieta-inóculo

y el análisis Tukey, reveló que la concentración de TNF- α es mayor en los ratones con dieta normal y parasitados con el inóculo 5 (λ_5) que en los otros. No se observaron diferencias significativas entre todos los otros ratones parasitados, y dentro de los animales con dieta normal la menor concentración de TNF- α la presentan los animales sanos. En el caso de los ratones con dieta hipoproteica, no se observaron diferencias significativas entre los

parasitados y los sanos, pero su concentración de TNF- α fue menor que la de los que estaban con dieta normal.

En la semana 12, la significancia esta dada por la interacción de la dieta con el inóculo. La concentración de TNF- α fue significativamente mayor en los ratones con dieta normal y el mayor inóculo (λ_{25}) y no se observaron

diferencias significativas de la concentración de TNF- α entre los demás animales.

Por las grandes diferencias en los resultados obtenidos en ésta variable, no es posible obtener conclusiones respecto al efecto de la dieta y de la infección en ésta citocina.

Fuente	Pr>F					
	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
Modelo	0.0589	0.0001	0.0001	0.0786	0.5351	0.0004
Dieta	0.1505	0.0001	0.0001	0.0425	0.7272	0.7966
Inóculo	0.0598	0.0001	0.0003	0.0615	0.2718	0.0005
Dieta*Inóculo	0.1395	0.0017	0.0001	0.5635	0.6164	0.0033

PESOS DE LOS ANIMALES

Variable dependiente: **pesos**

Para los datos obtenidos de los pesos de los ratones (pag. 22), no es posible realizar un análisis de varianza, como en todos los demás casos, esto debido a que como ya se dijo, los animales se pesaron por grupo, y no se puede calcular la varianza de cada grupo.

Se decidió hacer un análisis de X^2 -cuadrada (Apéndice pag. 85), en donde se consideró a los pesos de los animales con dieta hipoproteica como los valores observados, y a los pesos de los

animales con dieta normal como los valores esperados.

Se compararon ambos valores, y se obtuvo una $P = 0.98$, lo que nos dice que no hay diferencias significativas entre ambos grupos.

Como ya se explico antes el hecho que los animales se hayan pesado por grupo, impide apreciar las diferencias entre ellos. Es importante que quien decida continuar con éste trabajo, tenga atención en pesar a los animales por separado.

RESUMEN DE RESULTADOS

En ésta sección se presenta un resumen de resultados. En la Tabla 12 se describen los resultados en cuanto al tipo de respuesta inmune que se observó. Nótese que en ambas dietas, en los animales parasitados, la respuesta

TH1 se encuentra abatida, y la TH2 se encuentra activa. En cuanto al efecto de la dieta, en general la concentración de citocinas de los animales sanos, es mayor que la concentración en los animales parasitados.

Tabla 12. Resumen de resultados de las medidas de las citocinas de los dos distintos tipos celulares (TH1-TH2). Se compara la concentración de citocinas de los animales sanos con los parasitados, en ambas dietas.

	Citocina	Dieta Normal		Dieta Hipoproteica	
		Sano	Parasitado	Sano	Parasitado
TH1	IL-2	++++	++	+++	+
	IFN- γ	+++	+	+++	++
	IL-12	++++	++	+++	++
TH2	IL-4	+++	+++	++	++
	IL-6	+	+++	++	++++
	IL-10	++	++++	+	+++

++++ concentración muy alta
+++ concentración alta

++ concentración baja
+ concentración muy baja

En la Tabla 13, se describen los resultados de las cuentas de cisticercos. Nótese que la carga parasitaria de los

animales con dieta normal, es mayor que la de los animales con la dieta hipoproteica.

Tabla 13. Resumen de resultados de las cargas parasitarias

	Dieta Normal	Dieta Hipoproteica
Cuenta de cisticercos	++++	+++

++++ densidad muy alta

+++ densidad alta

En la Tabla 14, se describen los resultados de las proliferaciones celulares con dos estimulaciones distintas, con un mitógeno que es la ConA y con el homogenado de antígeno. Notese que la proliferación celular bajo la estimulación con ConA, es mayor en las

células de los animales con dieta normal que en las de los animales mal nutridos. Cuando la estimulación se hizo con el homogenado de antígeno, no se observan diferencias de proliferación celular entre las dietas, y por carecer de

resultados, no es posible describir el efecto de la infección.

Tabla 14. Resumen de resultados de la proliferación celular, con dos diferentes estimulaciones

Estimulación	Dieta Normal		Dieta Hipoproteica	
	Sano	Parasitado	Sano	Parasitado
con ConA	++++	++++	++	++
con Ag	---	++++	---	++++

++++ proliferación alta

++ proliferación baja

--- no se dispone de los datos

Los resultados que se muestran en ésta sección, son los observados en el transcurso de las doce semanas de infección que se analizaron.

En éstas tablas, no se muestra la oscilación que se observó en las concentraciones de las citocinas en el transcurso del tiempo.

DISCUSIÓN

En éste trabajo se midió el efecto de una dieta hipoproteica sobre la carga parasitaria, la proliferación celular y la respuesta inmune (perfil de citocinas) durante la infección murina de *Taenia crassiceps*. Se encontró, que la carga parasitaria de los animales con una dieta hipoproteica es menor que la carga parasitaria de los animales con una dieta normal. Cuando la proliferación celular es estimulada con ConA, proliferan mejor las células de los animales con dieta normal que las de los animales con dieta hipoproteica. Cuando la proliferación celular es estimulada con homogenado de antígeno no observamos un efecto estadísticamente significativo de la dieta hipoproteica. El perfil de citocinas de los animales con dieta hipoproteica apunta a una respuesta tipo TH2, al igual que el de los animales con una dieta normal, pero la concentración de citocinas de los animales mal nutridos es menor que la concentración de citocinas observada en los animales normal nutridos.

Dado el diseño experimental de este trabajo, el análisis del efecto de la dieta hipoproteica en la respuesta

inmune, puede hacerse en tres aspectos principales:

- a) El desarrollo del parásito, el cual está dado por las diferencias en las cuentas de cisticercos en las dos dietas.
- b) La respuesta inmune, la cual se ve reflejada en los perfiles de citocinas que presentan los animales bajo ambos regímenes alimenticios.
- c) La proliferación celular, con dos estimulaciones diferentes (ConA y homogenado de Antígeno).

En cuanto al desarrollo del parásito, el indicador que se tiene es la carga parasitaria, en la que observamos que, en las primeras semanas, aumenta lentamente para después, en la segunda mitad del experimento incrementarse más rápidamente. En las semanas iniciales, el efecto está dado por el inóculo y aparentemente la dieta no ejerce efecto. En las últimas semanas se observa que el efecto de la dieta ya es significativo mientras que el efecto del inóculo no deja de serlo.

La carga parasitaria de los ratones con la dieta normal, es mayor que la de los ratones con la dieta hipoproteica, lo cuál se puede explicar

por el hecho que los ratones mal nutridos, llegan a un grado de desnutrición que afecta al mismo parásito, es decir, los parásitos encuentran deficiencias nutricionales en los ratones que les impide un crecimiento poblacional equivalente al que tienen en un animal con una nutrición normal. De acuerdo a la literatura (Schmidt, 1989), los cisticercos de *T. crassiceps* se alimentan por pinocitosis, y hay un transporte activo de aminoácidos, estableciéndose un equilibrio entre los aminoácidos del hospedero y los aminoácidos del cisticerco. Podemos entonces decir que debido a la baja concentración de proteínas en la dieta de los ratones, hay una limitante importante en el hospedero que disminuye el desarrollo de los cisticercos.

Aparentemente, en las últimas semanas, las cuentas de cisticercos tienden a mantenerse relativamente constantes, sobre todo en los ratones mal nutridos, pero los datos aún no son suficientes para afirmar algo así, por lo que convendría repetir el experimento para analizar éste efecto a tiempos más largos.

Tener tres inóculos distintos, afecta la carga parasitaria pero en realidad solo se ven diferencias estadísticamente significativas del efecto de la dieta en los inóculos extremos (λ_5 y

λ_{25}), y aparentemente el inóculo intermedio (λ_{15}) se está comportando como alguno de los otros dos inóculos, sin diferencias significativas con ambos, por lo que si posteriormente se desea adentrarse más en el tema, en cuanto a la carga parasitaria con los inóculos λ_5 y λ_{25} es suficiente. No se observaron diferencias en el establecimiento de la enfermedad entre los tres inóculos distintos, es decir, con sólo 5 cisticercos el establecimiento de ésta es exitoso.

Es paradójico, que los animales mal nutridos, presenten una menor carga parasitaria. La noción intuitivamente común, es que la desnutrición favorece el parasitismo. Se tiene evidencia (Chandra, 1992) que las desnutriciones proteicas inducen un estado de inmunodeficiencia que favorece la presencia de infecciones oportunistas de algunos microorganismos, como son: *Pneumocystis carinii* y *Candida*. Sin embargo los resultados que hemos obtenido en los ratones durante la infección por *T. crassiceps*, se oponen a ésa noción general encontrándose menor carga parasitaria en los animales mal nutridos. Se ha reportado (Villa, 1996) que los cisticercos de *T. crassiceps*, para evadir el ataque inmune en su contra, inducen una inmunosupresión en la región anatómica en que se encuentran. Siendo así, el factor que

limita el desarrollo del parásito es la concentración de nutrientes en el hospedero, más que la respuesta inmune del mismo. Dado que ésta (respuesta inmune) no lo daña.

Para describir el tipo de respuesta inmune que estamos presenciando, se utiliza como indicador al perfil de citocinas, y con fines prácticos, agrupamos las citocinas que medimos en tres grupos, las características de la respuesta tipo TH1 entre las que tenemos IL-2, IL-12 e IFN- γ . Las características de la respuesta tipo TH2 en las que están IL-4, IL-6 e IL-10. La citocina indicadora de nutrición, que es el TNF- α . Con ayuda de esta clasificación se establecerá el tipo de respuesta inmune que se presentó durante el desarrollo del experimento.

Las citocinas de la respuesta tipo TH1, se encuentran ó en menor concentración en los ratones parasitados que en los ratones no parasitados, ó en concentraciones equivalentes. Cuándo se encuentran en menor concentración las citocinas de la respuesta tipo TH1, esto se debe a que el animal esta montando una respuesta inmune TH2, y la respuesta TH1 se encuentra inhibida dada la interregulación de ambas respuestas inmunológicas. Cuándo encontramos que la concentración de citocinas de los animales sanos, es equivalente a la de los animales

parasitados no podemos hablar de un tipo de respuesta inmune definido. Este caso se debe a las variaciones biológicas naturales entre los animales, y a que la concentración de citocinas no es constante en el tiempo tanto por la influencia del medio externo, como por la influencia de los ciclos estrales de los animales (Terrazas, 1994). No olvidemos que éste trabajo se hizo en hembras y que los cambios hormonales durante el ciclo estral, influyen en las variaciones del sistema inmune.

En cuanto a las dietas, en general los ratones con dieta normal presentan una mayor concentración de citocinas TH1 que los ratones con la dieta hipoproteica. No hay diferencias significativas respecto al inóculo en el perfil de citocinas. En términos generales podemos decir que la respuesta TH1 se encuentra abatida, que las respuestas de los animales con diferentes inóculos son paralelas por lo que se podría trabajar con un solo inóculo, y que el efecto de la dieta es disminuir la concentración de citocinas que se secretan en el animal.

Las citocinas características de la respuesta tipo TH2, se encuentran en mayor concentración en los ratones parasitados que en los ratones sanos, lo que nos dice que el animal está montando una respuesta inmune tipo TH2. En cuanto a las dietas, en la mayor

parte de los casos, los ratones con dieta normal presentan mayor concentración de citocinas que los ratones con dieta hipoproteica. En cuanto a los inóculos, una vez más, no se observaron diferencias significativas entre ellos. Por lo que podemos decir que la respuesta TH2 se encuentra activada, que el efecto de los diferentes inóculos es similar en cuanto a la secreción de citocinas, y que los animales con dieta normal presentan mayores concentraciones de citocinas que los animales con dieta hipoproteica.

Debido esto, podemos estar hablando de una respuesta consistente TH2 como se esperaba de acuerdo a la literatura. En caso de haber existido una respuesta inicial TH1, posiblemente ésta se dio antes de la segunda semana de infección, por lo que nosotros no la observamos (Terrazas, 1998).

Los resultados que hemos obtenido, nos dicen que el efecto principal de la dieta hipoproteica es la disminución de la secreción de citocinas por los ratones mal nutridos. Dicha disminución puede deberse a que la deficiencia proteica de los animales mal nutridos, limita sus recursos para la producción de citocinas.

En varias de las citocinas medidas, se observó que la concentración de éstas oscila en el tiempo. Pero la observación de la

oscilación, se hizo tanto en los animales parasitados como en los sanos, lo que nos dice que ésta no es efecto de la infección, sino algo presente *per se* en los ratones. Es normal que no todos los ratones presenten concentraciones iguales de citocinas, ya que son seres vivos, sometidos a las presiones del medio ambiente externo. Por otro lado, no olvidemos que éste trabajo se realizó en hembras, que presentan ciclos estrales. Los cambios en las concentraciones hormonales influyen en las citocinas (Terrazas, 1994).

Podemos concluir entonces, que en cuanto al tipo de respuesta inmune montada por el animal para defenderse del parásito, aparentemente la dieta no ejerce efecto, ya que en ambos casos la respuesta que se observó fue la TH2.

En cuanto al TNF- α , las observaciones hechas, no son consistentes entre sí, y convendría repetir los experimentos antes de afirmar o negar algo, dado que las concentraciones obtenidas de ésta citocina, no son confiables. Por un problema de diseño, la última citocina que se midió fue TNF- α , a pesar de ser la primera citocina en degradarse, lo que hace pensar que es posible que en el momento en que dicha citocina fue medida, ya se encontraba degradada, y que lo que se obtuvo son resultados no

confiables. En el futuro es necesario que la primera citocina en cuantificarse sea el TNF- α , ya que es la primera en degradarse.

En cuanto a la proliferación celular de las células estimuladas con ConA, el efecto estadísticamente significativo que se observa está dado por la dieta. Los animales con dieta normal presentan mayor proliferación que los animales con dieta hipoproteica, lo que puede significar que el hecho que los animales se encuentren con una mala nutrición, afecta la capacidad de sus células para reaccionar a la estimulación con un mitógeno, disminuyéndola. Se ha reportado (Villa, 1996) que la activación de la ConA a las células del bazo, es a través de una vía de señalización activada por un tipo de receptor de células T, el CD3 (TCR-CD3). Probablemente, la deficiencia proteica, hace que las células T de los animales mal nutridos expresen en menor cantidad ése receptor, y siendo así la proliferación de las células del bazo de los animales mal nutridos estimuladas con ConA, sería menor.

Aparentemente el tamaño del inóculo no ejerce efecto en la proliferación, ya que los inóculos de diferentes tamaños reaccionaron de igual manera.

Cuando la proliferación celular fué medida bajo la estimulación con homogenado de antígeno, no se encontraron efectos estadísticamente significativos. Aparentemente, no hay efecto de la dieta en la proliferación celular bajo la estimulación del antígeno, pero no debemos olvidar que a ésta prueba, no se agregaron los animales sanos. De haber diferencias en la proliferación celular entre las células del bazo de los animales sanos y los parasitados, no es posible observar esas diferencias, por no contar con los datos necesarios.

Los ratones sometidos a una dieta hipoproteica presentan el siguiente perfil: una menor carga de cisticercos, menores concentraciones de citocinas y menor proliferación celular de células del bazo estimuladas con ConA, comparados con los ratones alimentados con dieta normal. Por lo que queda claro que la dieta baja en proteínas tiene un efecto en el ratón, y éste es independiente del inóculo.

Los resultados que observamos, se deben a la deficiencia proteica del animal. El hecho que la carga parasitaria sea menor, se debe a los limitados recursos que encuentra el parásito en su hospedero para sobrevivir. Así mismo, las menores concentraciones de citocinas, se deben a la deficiencia

proteica, pues al no tener suficientes proteínas en su dieta el animal no tiene los recursos para sintetizar la misma cantidad de citocinas (proteínas) que en condiciones normales. La menor proliferación celular bajo la estimulación del antígeno, es resultado de la deficiencia proteica, ya que las células de los animales mal nutridos, no son capaces de reaccionar igual que las células de los animales con una nutrición normal.

Queda la pregunta de que pasaría si se sometiera a los ratones a una dieta hiperproteica, y cómo influiría ésta en la carga parasitaria, en la respuesta inmune y en la proliferación celular.

Por otro lado, también vale la pena aumentar el tiempo de seguimiento de la respuesta inmune, pues aparentemente la carga parasitaria de los ratones mal nutridos, tiende a la estabilidad, pero sólo con un experimento más largo se podría ver que es lo que pasaría en ese respecto. Vale la pena también medir algunas otras proteínas relacionadas con el sistema inmune, y saber que está pasando con los anticuerpos específicos contra el parásito.

Posiblemente en futuros trabajos, se podrá describir con mayor precisión el efecto de la nutrición en la respuesta inmune y en la infección por *T. crassiceps*

ya que éste fue un trabajo inicial que da bases para otros trabajos.

En el futuro, se elaborará un modelo matemático con los resultados obtenidos en éste experimento, y con ayuda del modelo, se pretende plantear el efecto que tendría la aplicación tanto de una dietoterapia, como la aplicación de una inmunoterapia, se espera que con alguna de ambas terapias o las dos se pudiera eliminar la infección de *Taenia crassiceps* del organismo.

Es necesario profundizar en el tema, para llegar en un futuro al desarrollo de alguna terapia que elimine la infección. Sin olvidar que el estudio de la infección murina de *T. crassiceps*, es un modelo, que pretende representar la infección con *Taenia solium*, la cuál afecta al humano. Posteriormente, se desea continuar con éste trabajo, e intentar extrapolar los datos obtenidos a la infección por *T. solium* en el hombre.

En caso de ser exitosas las terapias (dietoterapias e inmunoterapia) en contra de *T. crassiceps* se evaluará su efecto en la eliminación de las infecciones por *Taenia solium*. El diseño de una terapia exitosa sería de suma importancia e interés biomédico, dado que la cisticercosis es un problema de salud mundial.

CONCLUSIONES

- *La carga parasitaria disminuye en los ratones sometidos a una dieta hipoproteica en comparación con la carga parasitaria de los ratones con una dieta normal. Esto se puede deber a los limitados recursos que encuentran los cisticercos en la cavidad peritoneal de los animales mal nutridos.*
- *Consistentemente con lo reportado en la literatura, la respuesta inmune tipo TH1 se encuentra abatida tanto en los ratones sometidos a la dieta hipoproteica como en los ratones alimentados con la dieta normal. Lo cuál es un efecto de la infección y es independiente de la dieta.*
- *La respuesta inmune que presentan los ratones a la infección por *Taenia crassiceps*, es del tipo TH2 independientemente de la dieta. Lo que es consistente con lo reportado en la literatura.*
- *Los ratones sometidos a una dieta hipoproteica presentan una menor concentración de citocinas que los ratones sometidos a una dieta normal. La deficiencia proteica en la dieta, restringe la capacidad del animal de sintetizar citocinas (proteínas).*
- *La proliferación celular bajo la estimulación con ConA, se ve afectada por la dieta hipoproteica, siendo menor en las células de los ratones mal nutridos. La deficiencia protéica, restringe la capacidad de las células de los animales mal nutridos para reaccionar a la estimulación con ConA.*
- *La dieta no ejerce efecto en la proliferación de las células del bazo bajo la estimulación con el homogenado de antígeno.*
- *La cinética de la parasitosis así como la respuesta inmune asociada a la nutrición fue semejante para ratones sometidos a diferentes tamaños de desafíos (λ_5 , λ_{15} y λ_{25}). Por lo que se concluye que para futuros experimentos es suficiente trabajar con un solo inóculo.*

APÉNDICE

ESTADÍSTICA

La estadística es una rama de las matemáticas que provee un conjunto de herramientas utilizadas en la investigación tanto para el diseño de experimentos, como para el análisis y la interpretación de resultados. La ciencia de la estadística trata con:

- a) Colección de datos*
- b) Diseño de experimentos*
- c) Medición de la variación de los datos experimentales*
- d) Estimación de parámetros de población y suministro de varias medidas de precisión de esas estimaciones.*
- e) Ensayo de hipótesis respecto a poblaciones.*
- f) Estudio de la relación entre dos o más variables*

La estadística debe usarse en el diseño experimental, pues aún en los experimentos mejor planeados no es posible controlar todos los factores y porque se desea hacer conclusiones basadas en observaciones de los datos muestra (Ostle B., 1974).

La estadística se reduce a resultados numéricos; los métodos y procesos usados en obtenerlos; los métodos usados para estimar su confiabilidad; y la obtención de inferencias de éstos resultados.

Los métodos objetivos y controlados que permiten abstraer grupos de tendencias de muchos individuos aislados, son llamados métodos estadísticos. Estos métodos están especialmente adaptados para la dilucidación de datos cuantitativos que han sido afectados por muchos factores.

Los métodos estadísticos constituyen una de las herramientas por las que el hombre trata de comprender la generalidad de la vida.

Existen un gran número de métodos estadísticos. En el caso del trabajo de ésta tesis el análisis que consideramos conveniente realizar es el análisis de varianza, por lo que a continuación nos enfocaremos a la descripción de dicho análisis.

Muy a menudo, en la práctica se tienen que tomar decisiones sobre poblaciones, partiendo de la información muestral de las mismas. Para llegar a tomar decisiones, conviene hacer determinados supuestos o conjeturas acerca de las poblaciones que se estudian. Tales supuestos pueden ser o no ciertos, y se llaman hipótesis estadísticas. En general, las hipótesis estadísticas son hipótesis sobre las distribuciones de probabilidad de las poblaciones. La hipótesis por probar se llama hipótesis nula. Las hipótesis contrarias a la hipótesis nula, son llamadas hipótesis alternativas. Por ejemplo, si se quiere decidir si una población es distinta de otra, se forma la hipótesis nula de que son iguales, ya que solo hay una manera de ser iguales y hay muchas maneras de ser distintas. En caso de rechazar la hipótesis nula, inmediatamente se acepta la hipótesis alternativa, de que si ambas poblaciones no son iguales, necesariamente son distintas (Spiegel M. R., 1991).

En experimentos diseñados, el observador tiene el control de los niveles de una o más variables para determinar su efecto en la variable de interés.

Hay algunos elementos comunes a todos los experimentos diseñados, como son:

- a) La variable de interés en el experimento llamada variable dependiente.
- b) Las variables que pueden tener efecto en la respuesta llamadas factores. Los factores pueden ser cualitativos o cuantitativos, dependiendo de si pertenecen o no a una escala numérica (Nos referiremos a ellos con letras mayúsculas, ej: A, B, C, etc.).
- c) Los niveles de un factor son los valores del factor que fueron usados en el experimento.
- d) Los tratamientos, que son las combinaciones de factores y niveles que fueron utilizadas en el experimento (Nos referiremos a ellos con letras minúsculas, ej: a, b, c, etc.).

Los diseños experimentales pueden ser de distintos tipos:

- Un diseño aleatorizado es aquel en el que para cada tratamiento las unidades experimentales son seleccionadas independientemente y aleatoriamente.

- *Un diseño de bloque aleatorizado consiste de un procedimiento de dos pasos: 1. Se determinan conjuntos de unidades experimentales llamadas bloques, cada bloque consta de p unidades experimentales (donde p es el número de tratamientos). Cada b bloque debe consistir de unidades experimentales lo mas similares posibles. 2. Cada unidad experimental de cada bloque es asignada aleatoriamente a cada tratamiento, resultando en un total de n=bp respuestas.*
- *Un diseño factorial aleatorizado, es aquel en el que el experimento tiene más de un factor, un diseño factorial completo, es aquel en el que todos los posibles tratamientos (factor-nivel combinaciones) son utilizados. Durante el diseño de la presente investigación, éste es el tipo de modelo que se siguió.*

Antes de hacer un análisis de varianza, se deben asumir tres cosas:

- 1. Las distribuciones de probabilidad de la población p son normales*
- 2. Las varianzas de la población p son equivalentes.*
- 3. Las muestras fueron seleccionadas aleatoriamente e independientemente de las poblaciones respectivas.*

En el análisis de varianza, se comparan las medias ya sea para probar la hipótesis nula de que las medias de los tratamientos son iguales, o para probar la hipótesis alternativa de que al menos dos de las medias de los tratamientos difieren entre si. La diferencia entre las medias de los tratamientos depende de la variabilidad de las muestras.

La variación entre las medias de los tratamientos es calculada con la suma de cuadrados de los tratamientos (SST), la cual es calculada con el cuadrado de la distancia entre cada media de tratamiento y la media general de todas las muestras medidas, multiplicando cada distancia al cuadrado por el número de muestras medidas para cada tratamiento, y sumando los resultados de todos los tratamientos:

$$SST = \sum_{i=1}^p n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$$

Donde:

SST = suma de cuadrados de los tratamientos

\bar{x} = media total de la respuesta de todas las muestras medidas

n_i = el tamaño de la muestra para el i-avo tratamiento

\bar{x}_i = la media de cada tratamiento

Para calcular la variación en los tratamientos se calcula la suma de cuadrados del error (SSE), que es la que mide la variabilidad alrededor de la media del tratamiento que se atribuye al error de muestreo, la suma de cuadrados del error, se calcula sumando el cuadrado de la distancia entre cada respuesta medida y la media del tratamiento correspondiente, y se suman los cuadrados de las diferencias de todas las medias de la muestra completa:

$$SSE = \sum_{j=1}^{n_1} (x_{1j} - \bar{x}_1)^2 + \dots + \sum_{j=1}^{n_p} (x_{pj} - \bar{x}_p)^2$$

Donde:

SSE = suma de cuadrados del error

x_{1j} = es la j -ava medida de la muestra 1

x_{pj} = es la j -ava mediada de la muestra p

\bar{x}_1 = es la media de la muestra 1

\bar{x}_p = es la media de la muestra p

Para hacer que las dos medidas de variabilidad sean comparables, es necesario convertir la suma de cuadrados en cuadrados medios. Esto se logra dividiendo cada una de las sumas de cuadrados entre el número de grados de libertad (df) para cada caso.

Para el cuadrado medio de los tratamientos (MST) que mide la variabilidad entre las medias de los tratamientos, se divide la suma de

cuadrados de los tratamientos entre el número de grados de libertad (df) de los tratamientos, los que para p tratamientos es $(p - 1)$:

$$MST = \frac{SST}{p - 1}$$

Después, calculamos el cuadrado medio del error (MSE) que mide la variabilidad de las muestras en cada tratamiento, la cuál está dada por la división de la suma de cuadrados del error entre los grados de libertad (df) del error, los que para n muestras y p tratamientos están dados por $(n - p)$:

$$MSE = \frac{SST}{n - p}$$

Finalmente calculamos la llamada F estadística o valor F , que es la relación de MST respecto a MSE:

$$F = \frac{MST}{MSE}$$

Cuando los valores de la F estadística, son cercanos a 1 esto indica que las dos fuentes de variación entre los tratamientos y en los tratamientos son aproximadamente iguales, la diferencia entre las medias de los tratamientos, puede atribuirse a error de muestreo. Cuando los valores de F son mucho mayores que 1, esto indica que la variación entre las medias de los

tratamientos es mayor que la variación en los tratamientos, lo cual soporta la hipótesis alternativa que las poblaciones tratadas difieren.

Para saber cuándo la F estadística excede a 1 lo suficiente para rechazar la hipótesis nula (las poblaciones son iguales), es decir para aceptar la hipótesis alternativa (al menos una de las poblaciones es distinta), es necesario conocer los grados de libertad (df) de los tratamientos y los grados de libertad (df) del error y el valor α seleccionado para la prueba.

El valor α es el nivel de significancia, que en el caso de éste trabajo, se consideró como 0.05, es decir se tiene el 95% de confiabilidad de que la hipótesis nula no será rechazada cuando deba ser aceptada.

Se compara el valor F que se calculó con el valor F de tablas estadísticas. El valor de dichas tablas nos da la significancia ($Pr > F$) que en éste experimento se consideraron diferencias significativas aquellas menores de 0.05.

En el caso del análisis que nosotros realizamos, usamos un diseño

factorial aleatorizado, donde tenemos tres tratamientos (a, b, c); para hacer el análisis, primero, calculamos la variabilidad entre los tratamientos (MST), y después calculamos la variabilidad de las muestras (MSE), y usamos la relación F de éstas dos cantidades para probar la hipótesis nula de que los tratamientos eran iguales. En el caso en el que la hipótesis nula fué rechazada, concluimos que existían algunas diferencias entre los tratamientos. Surgió entonces la pregunta: ¿cuál de los factores es el o los que afectaban la respuesta? Los tres factores, dos, ó solo uno por separado, y si eran los tres factores, eran por separados o la combinación de ellos, igualmente si eran dos factores era la combinación de éstos o los factores por separado.

Para determinar la naturaleza del efecto de los tratamientos, en la respuesta de un experimento factorial se dividió la variabilidad de los tratamientos en siete componentes: Interacción entre los tres factores ABC, Interacciones entre dos factores AB, BC, AC, efecto independiente de cada factor A, B, C. En la fig 15 se esquematiza el análisis de tres factores que realizamos.

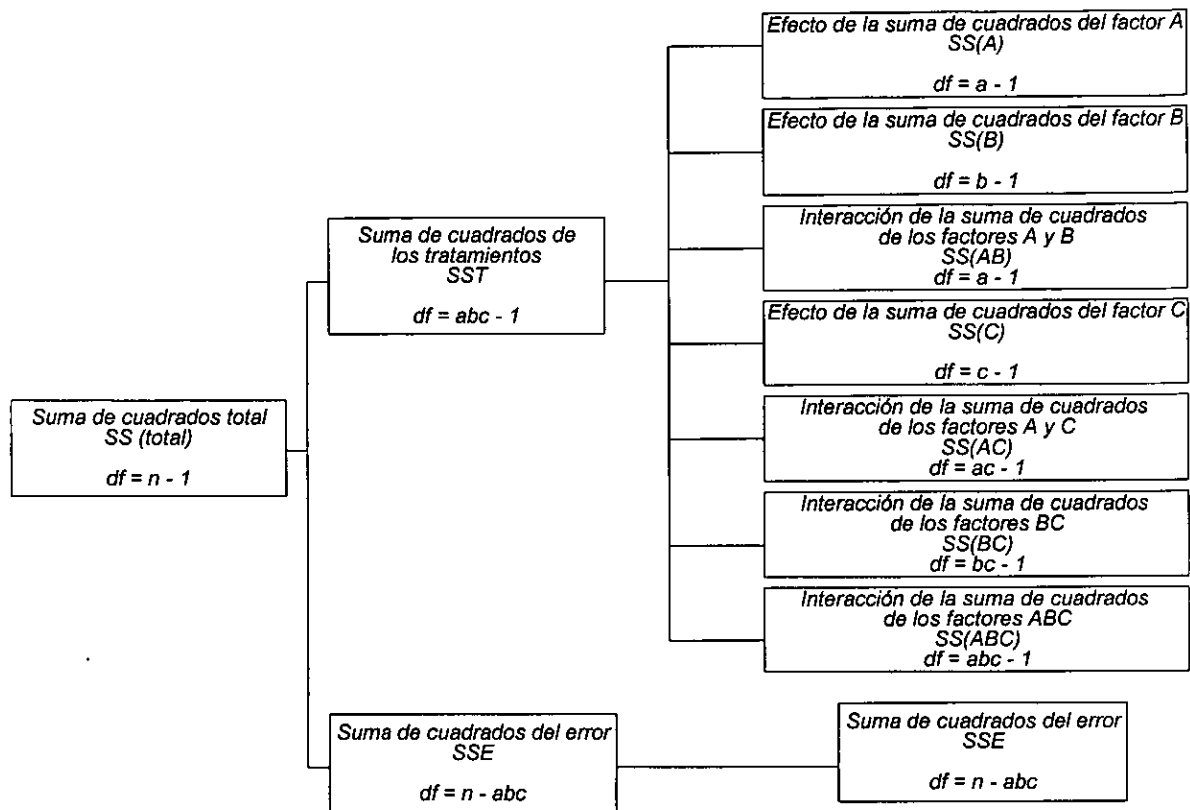


Figura 15. Análisis de tres factores (A, B, C). Nótese que los grados de libertad (df) para cada caso son diferentes

Después de dividir la variabilidad de los tratamientos en sus componentes, se probó la hipótesis nula de que los factores A, B y C no interactuaban, en caso de rechazar la hipótesis nula, es decir, aceptar la hipótesis alternativa (que los factores A, B y C si interactuaban) se concluyó que la respuesta es afectada por la interacción de los tres factores.

En el caso de no rechazar la hipótesis nula de la triple interacción, se procedió a probar la hipótesis nula de las dobles interacciones (AB, AC y BC), cuándo se rechaza la hipótesis nula de las dobles interacciones, se concluye

que el efecto es de una o algunas de éstas dobles interacciones.

Cuando se acepta la hipótesis nula para las dobles interacciones, se procede a probar la hipótesis nula para cada nivel de cada factor (A, B y C). Si se rechaza la hipótesis nula solo para uno de los factores, se concluye que es ése factor el que ejerce efecto. Si se rechaza la hipótesis nula para dos factores, se concluye que ambos ejercen efecto por separado, ya que se aceptó la hipótesis nula de la interacción de ambos.

Si se rechaza la hipótesis nula de la interacción de dos factores (ej. AB) y

se rechaza también la hipótesis nula del otro factor (ej. C), se concluye que lo que ejerce efecto es la interacción de los dos factores (ej. AB) y el otro factor por separado (ej. C).

Al concluir un análisis de varianza, los resultados se presentaron en tablas de análisis de varianza, como la que se muestra a continuación:

Fuente	df	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr > F
Modelo	abc-1	SST	MST	MST/MSE	(TABLA)
Error	n-abc	SSE	MSE		
Total Corregido	n - 1	SST + SSE	MST + MSE		
Dieta	a-1	SS(A)	MS(A)	MS(A)/MSE	(TABLA)
Inóculo	b-1	SS(B)	MS(B)	MS(B)/MSE	(TABLA)
Dieta*Inóculo	ab-1	SS(AB)	MS(AB)	MS(AB)/MSE	(TABLA)
Tiempo	c-1	SS(C)	MS(C)	MS(C)/MSE	(TABLA)
Dieta*Tiempo	ac-1	SS(AC)	MS(AC)	MS(AC)/MSE	(TABLA)
Inóculo*Tiempo	bc-1	SS(BC)	MS(BC)	MS(BC)/MSE	(TABLA)
Dieta*Inóculo*Tiempo	abc-1	SS(ABC)	MS(ABC)	MS(ABC)/MSE	(TABLA)

Para simplificar la interpretación de los resultados, además de hacer un análisis de varianza general para cada una de las variables dependientes, se hizo un análisis de varianza por tiempo para cada variable dependiente, esto es, en cada tiempo un análisis que presenta dos factores: dieta e inóculo.

Los resultados obtenidos en el análisis por tiempo, se presentan en una tabla que resume si se encontró o no significancia.

ANÁLISIS DE TUKEY

El análisis de Tukey (Mendez I.R., 1981) permite determinar cuáles de los

Para la interpretación de éste análisis, se considera primero si hay significancia en la interacción de los dos factores, y de encontrarse, el efecto se atribuye a la interacción de ambos factores. Cuando no hay interacción, se consideran los factores por separado.

promedios poblacionales son diferentes y cuáles son iguales. Una ventaja del

análisis de Tukey es que por su diseño tiene pocas probabilidades de cometer errores al efectuar inferencias.

La prueba de Tukey, consiste en determinar la magnitud relativa de cada diferencia entre promedios de las muestras. Para que una de esas diferencias sea estadísticamente significativa, es decir que conduzca al rechazo de la hipótesis nula (que no hay diferencias), se requiere que la discrepancia entre ambas sea grande. Para determinar que es lo que se considerará como una diferencia grande, se construye la llamada diferencia mínima significativa honesta (DMSH).

La diferencia mínima significativa honesta (DMSH), es una función tanto de un valor obtenido en el análisis de varianza para el cuadrado medio del error (MSE), como un valor obtenido de las tablas de rangos de student. Dichas tablas fueron construídas por Tukey.

Al valor obtenido de las tablas de rangos de student, lo llamaremos Q. Para obtener Q, se consultan las tablas con un nivel de significancia dado, conciderando el número de las medias

PRUEBA DE X^2 -CUADRADA

La prueba X^2 -cuadrada, consiste en hacer comparaciones entre el valor real de las observaciones y el valor

de las muestras que se quieren comparar (el número de poblaciones que se estudian), y los grados de libertad (df) del error del análisis de varianza.

De manera que el valor DMSH es el siguiente:

$$DMSH = Q \sqrt{\frac{MSE}{n}}$$

Donde:

DMSH = diferencia mínima significativa honesta

Q = Valor obtenido de las tablas de rangos estudentizados

MSE = cuadrado medio del error

n = número de los elementos en las muestras que se están comparando

Para que alguna diferencia entre promedios, se pueda considerar como significativa, se requiere que ésa diferencia sea mayor que el valor de DMSH. En ése caso, la hipótesis nula debe rechazarse, y aceptarse la hipótesis alternativa (las poblaciones son diferentes).

esperado de las mismas, para varios valores de la variable aleatoria. Los valores esperados, usualmente se

calculan usando la distribución supuesta , haciendo los parámetro iguales a sus muestras estimadas.

La X^2 -cuadrada para k clases se calcula usando la siguiente ecuación:

$$X^2 = \frac{\sum_{i=1}^k (O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Donde:

O_i = el valor observado en la i -ésima clase

E_i = el valor esperado en la i -ésima clase

Para ésta prueba, los grados de libertad (df) seran $k - p - 1$, donde p representa al número de parámetros estimados por la muestra estadística.

Una vez que se conoce el valor de la X^2 -cuadrada, se calcula con el valor de Tablas de X^2 -cuadrada, considerando los grados de libertad, y la significancia X establecida. Entonces si el valor X^2 calculado es mayor o igual al valor X^2 de las tablas para dicha X y dichos grados de libertad, rechazamos la hipótesis que la población observada es igual a la población esperada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abehsira-amar O., Gibert M., Jolij M., Théze J., y Jankovic D.L., 1992, "IL-4 plays a dominant role in the differential development of TH0 into TH1 and TH2 cells", *The Journal of Immunology*, 148:3820-3829.
2. Allen J.E., y Maizels R.M., 1997, "TH1-TH2: reliable paradigm or dangerous dogma?", *Immunology Today*, 392(18),8.
3. Beck G y Habicht GS., 1997, "Origen de la inmunidad de los invertebrados", *Investigación y Ciencia*, enero, 4-9.
4. Beutler B. y Cerami A., 1988, "Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator", *Ann. Rev. Biochem.*, 57:505-518.
5. Bojalil R., Terrazas L.I., Govezensky T., Sciutto E., y Larralde C., 1991, "Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)", *J. Parasitol* 79(3):384-389.
6. Bundy D.A.P. y Golden M.H.N., 1987, "The impact of host nutrition on gastrointestinal helminth populations" *Parasitology*, 95:623-635.
7. Chan J., Tian Y., Tanaka K.E., Tsang M.S., Yu K., Salgame P., Carroll D., Kress Y., Teitelbaum R., y Bloom B.R., 1996, "Effects of protein calorie malnutrition on tuberculosis in mice" *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:14857-14861.
8. Chandra R.K., 1991, "Mc Collum award lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future", *Am J. Clin. Nutr.*, 53:1087-1101.
9. Chandra R.K., 1992, "Protein-energy malnutrition and immunological responses", *J. Nutr.*, 122: 597-600.
10. Else K.J., Entwistle GM., y Grecis R.K., 1993, "Correlations between worm burden and markers of TH1 and TH2 cell subset induction in an inbred strain of mouse infected with *Trichuris muris*" *Parasite Immunology*, 15:595-600.
11. Else K.J., Finkelman F.D., Maliszewski C.R., y Grecis R.K., 1994, "Cytokine-mediated Regulation of chronic intestinal helminth infection", *The Journal of Experimental Medicine* 179:347-351.
12. Else K.J., Hültner L., y Grecis R.K., 1992, "Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. II. Differential induction of Th-cell subsets in

- resistant versus susceptible mice", *Immunology* 75:232-237.
13. Else K.J., y Grencis R.K., 1991, "Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. I. Differential cytokine production during acute or chronic infection", *Immunology* 72:508-513.
 14. Fragoso GG, Lemus R.D., Trueba Z. L., 1988, "Inmunología de la cisticercosis murina causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps* variedad ORF", Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., pp. 32,89.
 15. Gajewski T.F., Pinnas M., Wong T., y Fitch F.W., 1991, "Murine TH1 and TH2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations", *The Journal of Immunology*, 146 (6):1750-1758.
 16. Hermanek, J., Goyal P.K., y Wakelin D., 1994, "Lymphocyte, antibody and cytokine responses during concurrent infections between helminths that selectively promote T-helper-1 or T-helper-2 activity", *Parasite Immunology*, 16:111-117.
 17. Janeway-Travers, 1997, "Immuno Biology. The Immune system in health and disease" edit. Garland Publishing, tercera edición, Nueva York, parte V, cap. 9.
 18. Kauffman C.A., Jones P.G, y Klunger M.J., 1986, "Fever and malnutrition: endogenous pyrogen/interleukin-1 in malnourished patients", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 44:449-452.
 19. Keymer A., Crompton D.W.T., y Walters D.E., 1983, "*Nippostrongylus* (Nematoda) in protein-malnourished rats: host mortality, morbidity and rehabilitation" *Parasitology* 86:461-475.
 20. Klasing K.C., 1988, "Nutritional aspects of leukocytic cytokines", *J. Nutr.*, 118:1436-1446.
 21. Litman, GW., 1997, "Origen de la inmunidad de los vertebrados", *Investigación y Ciencia*, enero, 10-15.
 22. Maizels R.M., Bundy D.A.P., Murray E.S., Smith D.F., y Anderson R.M., 1993, "Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations", *Nature*, 365:797-805.
 23. Markell y Voge, 1981, "Parasitología. Diagnóstico, prevención y tratamiento", edit. Manual Moderno, cap. 7 pp. 202-235.
 24. Mendez I. R., 1981, "Probabilidad y Estadística", Colegio de Bachilleres, sistema de enseñanza abierta, México, pp. 81-83.

25. Mc.Clave J.T. y Dietrich F.H., 1991, "Statistics", Dellen Publishing Company, quinta edición. Macmillan, USA. pp. 497-531.
26. Mosmann T.R., y Coffman R.L., 1989, "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different function properties". *Annual Review of Immunology*, 7:145-173.
27. Ostle, B., 1974, "Estadística Aplicada", edit. Limusa, primera edición. México. pp. 311-446.
28. Pearce E.J., Caspar P., Grzych J.-M., Lewis F.A. y Sher A., 1991, "Downregulation of TH1 cytokine production accompanies induction of TH2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*", *The Journal of Experimental Medicine*, 173:159-166.
29. Reyburn H., Mandelboim O., Valdés-Gómez M., Sheu E.G, Pazmany L., Davis D.M., y Strominger J.L., 1991, "Human NK cells: their ligands, receptors and functions" *Immunological Reviews*, 155: 119-125.
30. Rincón M., Anguota J., Nakumara T., Fikrig E., and Flavell R.A., 1997, "Interleukin-6 (IL-6) directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ Cells", *J. Exp. Med.*, 185(3):461-469.
31. Rivera J., Martorell R., 1988, "Nutrition, infection, and growth part II: effects of malnutrition on infection and general conclusions", *Clin. Nutr.*, 7: 163-167.
32. Romagnani S., 1997, "The TH1/TH2 paradigm in disease". Ed. Chapman and Hall, Canada, pp. 241.
33. Santos, J.I., 1994, "Nutrition, Infección, and Immunocompetence", *Infectious disease clinics of north america*, 8 (1):243-267.
34. Sciutto E., 1989, "Aportaciones de la cisticercosis murina experimental por *Taenia crassiceps* al conocimiento de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad a la infección por metacéstodos y al diagnóstico y prevención de la cisticercosis por *Taenia solium*", Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., pp. 225.
35. Schmidt GD., Roberts L.S., 1989, "Foundations of Parasitology", edit. Times Mirror/Mosby, College Publishing, USA, 4th edition, pp. 12-14, 313-341.
36. Sherry B. and Cerami A., 1988, "Cachectin/Tumor Necrosis Factor Exerts Endocrine, Paracrine, and Autocrine Control of Inflammatory Responses" *The Journal of Cell Biology*, 107:1269-1277.

37. Spiegel M. R., 1991, "Probabilidad y Estadística" Colección Schaum, Mc. Grow Hill, pp. 306-338.
38. Swain S.L., 1995, "CD4 T cell development and cytokine polarization: an overview", *Journal of Leukocyte Biology*, 57: 795-798.
39. Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T., y Larralde C., 1994, "A role for β -estradiol in immunoendocrine regulation of cysticercosis (*Taenia crassiceps*)" *J. Parasitol*, 80:563-568.
40. Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T., y Larralde C., 1998, "Shift from an early protective TH1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)", *J. Parasitol*, 84(1):74-81.
41. Urban J.F., Katona I.M., Paul W.E., y Finkelman F.D., 1991, "Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice" *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 5513-5517.
42. Urban J.F.Jr., Madden K.B., Svetic A., Cheever A., Trotta P.P., Gause W., Katona I.M., y Finkelman F.D., 1992, "The importance of TH2 cytokines in protective immunity to nematodes", *Immunological Reviews*, 127:205-220.
43. Valdés-Ramos R., 1994, "Nutrición y Respuesta Inmune", *Perinatol. Reprod. Hum.*, 8(1):20-28.
44. Villa O.F., y Kuhn R.E., 1996, "Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a TH2-like response with concomitant anergy and downregulation of TH1-associated phenomena", *Parasitology*, 112:561-570.