



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“IDENTIFICACIÓN DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA (TF)
PRESENTE EN EL EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS
(DLE) POR MEDIO DE ELECTROFORESIS CAPILAR”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

FERNANDO EDSON COMPAGNY MACIAS

**ASESORES: Dr. ANDRES ROMERO ROJAS
Dr. ENRIQUE R. ANGELE ANGUIANO**

**Dr. SERGIO ESTRADA PARRA
M. en C. MAYRA PÉREZ**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los laboratorios 8 y 11 del área de posgrado de la **FESC Cuautitlán de Campo, 1** por permitirme hacer uso de las instalaciones, materiales y equipo, para desarrollar este trabajo.

Agradezco también al personal del Laboratorio de Inmunología Molecular II del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, por la elaboración de las muestras problema empleadas en este trabajo y a la M. en C. Mayra Pérez y al Dr. Sergio Estrada Parra, cabezas principales del proyecto **Factor de Transferencia** por permitirme participar en él, con la realización de este trabajo.

A la **UNAM** la mejor Universidad de Latinoamérica, por permitirme formar parte de su privilegiado grupo de estudiantes y ahora egresados, fue un verdadero regalo de la vida poder estar aquí y conocer a extraordinarias personas que ahora forman parte importante de mi vida.

A los magníficos profesores que fueron parte medular de mi formación profesional, en especial a mis sinodales el Dr. Andrés Romero Rojas gracias por su tiempo, interés, paciencia y el permitirme formar parte de su equipo, con usted logre algo que no pensé podría alcanzar, exponer este trabajo en un Congreso Internacional gracias; y al Dr. Enrique Angeles Anguiano, gracias por su enorme paciencia, consejos y enseñanzas, fue un verdadero honor estar cerca de usted para aprender de sus conocimientos y profesionalismo, así como, de su principal virtud la sencillez que lo caracteriza.

A mis compañeros de posgrado el Dr. Miguel Balboa y al M. en C. Víctor Abrego, gracias por su amistad, enseñanzas e interés para que yo pudiera sacar adelante este trabajo, aprendí lo más que pude de ustedes y espero poder acercarme algún día un poco a su dedicación y talento.

Gracias a la M. en C. Andrea Becerril Osnaya, por sus enseñanzas, consejos, regaños, por permitirme estar en su equipo de colaboradores, gracias a eso fui seleccionado para participar en el Premio Gustavo Baz Prada con mi reporte del Servicio Social y sobre todo por su amistad, le tengo un profundo cariño y estoy muy orgulloso de haber estado aprendiendo de su profesionalismo y personalidad, me dio uno de los más grandes regalos en mi estancia en aquí; la confianza en mis capacidades, el saber que puedo llegar a ser mejor de lo que soy y seguir superándome mas y mas, por todo esto mil gracias Maestra.

A los principales artífices de mis logros, los más sinceros, los principales críticos, los más generosos y cariñosos, los más orgullosos de esto, sin ustedes, no

pude haberlo logrado, gracias a mis amados padres y solo puedo decirles algo más; gracias por esperar. A mis hermanos que me ayudaron a seguir adelante sin querer nada a cambio y eso tiene un gran valor para mí.

A mi amada Miriam por permitirme formar parte de tu vida, por regalarme algo que es fundamental en la existencia del hombre, el amor desinteresado y generoso, por ponerme los pies en la tierra constantemente, por tus regaños, regaños y regaños, por tu esencia, tu calidez, tu honestidad, comprensión y por tu amor, estaré eternamente agradecido, tú has sido y serás una bendición en mi vida. Tú fuiste parte fundamental para este trabajo, pues con tu confianza en mí, lograste que a pesar de tantas barreras para desarrollarlo, lograra terminarlo, siempre me impulsaste para no claudicar y mejorar en todos los sentidos posibles, eres tan importante en mi vida, que no vislumbro el futuro sin mi más importante pilar, tú.

A mis compañeros, que son algo que me regalo mi estancia en la UNAM, pues muchos de ellos se convirtieron en mis más grandes y queridos amigos. Gracias a ti Omar porque tu constancia me enseñó que no importan los obstáculos que la vida presente, no importa que los demonios sean fuertes, no triunfan cuando la decisión es firme de corazón, se pueden lograr las metas cuando estas son parte de los sueños de uno, a David tu eterna sonrisa y forma de afrontar la vida, así como tu sincera amistad son parte de mis tesoros encontrados. A Daniel y Carolina que con su nobleza, me enseñaron a querer ser mejor persona. A Amalia tu sincera amistad me lleno de fortuna desde el principio y te tengo un profundo cariño, a Alma tu forma de ser desinteresada y honesta me hacen tenerte en un lugar muy especial, creo que seremos amigos siempre, por que se que cuento contigo en cualquier momento y sin esperar nada a cambio, y así podría seguir párrafos y párrafos, por lo que les digo gracias a mis compañeros y amigos de la generación 25, Laura Panda, Jessica, Raúl, Betsa, Beto, Itzhel, Vaquero, Jorge, Gustavo, Toño, Gus, José Luis, Mireya, Adolfo, Nanche, Lenin, Ivan, Erik y Araceli.

Agradezco también a D. Jiménez y C. Pérez B. por la asistencia técnica prestada durante el proyecto.

Índice

	PAGINAS
Índice de Cuadros, Figuras y Tablas	i
ABREVIATURAS	v
1.- RESUMEN	1
2.- ANTECEDENTES	3
3.- INTRODUCCIÓN	9
3.1. RELEVANCIA DEL ESTUDIO	9
4.- GENERALIDADES	10
4.1. FACTOR DE TRANSFERENCIA	10
4.1.1. Definición de Factor de Transferencia	10
4.1.2. Características Generales del Factor de Transferencia	11
4.1.3. Mecanismos de acción propuestos para el F. de Transferencia	13
4.1.4. Propiedades inmunológicas del Factor de Transferencia	16

4.1.5. Estructura química del Factor de Transferencia	17
4.1.6. Obtención del Extracto Dializable de Leucocitos y Factor de Transferencia	19
4.2 ELECTROFORESIS CAPILAR (CE)	20
4.2.1. Fundamento de las separaciones Electroforéticas	21
4.2.2. Movilidad electroforética	25
4.2.3. Movilidad electroosmótica-electroósmosis (EOF)	25
4.2.4. Instrumentación	30
4.2.4.1. Modos de Inyección	30
4.2.4.2 Modos de Detección	31
4.2.5. Tipos de Electroforesis capilar	33
4.2.5.1 Electroforesis capilar de zona o en disolución libre	33
4.2.5.2. Electroforesis capilar en gel	33
4.2.5.3 El Enfoque Isoelectrico	34

4.2.5.4. Isotacoforesis	34
4.2.5.5. Electro cromatografía capilar	35
4.2.5.6. Cromatografía capilar electrocinética Micelar	36
5.- JUSTIFICACIÓN.	38
6.- OBJETIVOS	39
6.1. Objetivo General	39
6.2. Objetivos Particulares	39
7.- HIPÓTESIS	40
8.- MATERIALES Y MÉTODOS	41
8.1. Equipo,	41
8.2. Materiales	41
8.3. Reactivos	42
8.4. Muestras	43

8.5. Actividades a realizar	44
8.5.1 Acondicionamiento del capilar	45
8.5.2 Preparación de muestras	48
8.5.3 Método de corrida	50
8.5.3.1. Método 1	50
8.5.3.2. Método 2	51
8.5.3.3. Método 3	52
8.5.3.4. Método 4	53
9.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
9.1. Método 1. Electroforesis Capilar de Zonas	54
9.2. Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar	61
9.2.1 Método 2	62
9.2.2 Método 3	84

9.2.3. Método 4	106
10.- CONCLUSIONES	126
11.- SUGERENCIAS	128
12.- ANEXOS	130
13.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146

INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y TABLAS

	Páginas
Cuadro 1. Clases de surfactantes	37
Cuadro 2. Reactivos utilizados	42
Cuadro 2. Muestras utilizadas durante el proyecto	43
Cuadro 3. Células por unidad murina	43
Figura 1. Estructura teórica del Factor de Transferencia	19
Figura 2. Representación de Equipo de Electroforesis capilar	23
Figura 3. Grupos silanol en capilar de sílice fundida	24
Figura 4. Esquema del Flujo electrosmótico	27
Figura 5. Distribución de las cargas en capilar de Sílice	28
Figura 6. Efecto de agente tensoactivo en pared de Sílice	29
Figura 7. Esquema del detecto por Arreglo de Diodos	32
Figura 8. Diagrama de flujo de actividades a realizar	47
Figura 9. Diagrama de flujo de Preparación de las muestras de DLE	49
Figura 10. Electroferograma de HSP56 por medio del método 1	55
Figura 11. Espectro de absorción de HSP56 por el método 1	56
Figura 12. Electroferograma de OM por medio del método 1	56
Figura 13. Electroferograma de la inyección doble de HSP56 y OM por medio del método 1	57
Figura 14. Espectro de absorción de la inyección doble de HSP56 y OM por el método 1	58
Figura 15. Electroferograma de Balb por medio del método 1	59
Figura 16. Electroferograma de la inyección doble de DLE s/aditivo y OM por medio del método 1	60
Figura 17. Electroferograma de controles a) Agua desionizada libre de Pirógenos y b) Buffer de corrida SDS-Boratos por medio del método 2	62
Figura 18. Electroferograma de Factor de Transferencia de cerdo por medio del método 2	68
Figura 19. Electroferograma de Factor de Transferencia de cerdo y la inyección doble de este y el OM por medio del método 2	72
Figura 20. Electroferograma de Calostro de glioma y la inyección doble de este y el OM por medio del método 2	76

Figura 21. Electroferograma de Balb y la inyección doble de este y el OM por medio del método 2	77
Figura 22. Electroferograma comparativo de la inyección doble entre las muestras y el OM evaluadas por el método 2	79
Figura 23. Electroferograma de OM a diferentes longitudes de onda por medio del método 3	85
Figura 24. Electroferograma de Calostro de Glioma y de la inyección doble de este y el OM por medio del método 3	88
Figura 25. Espectro de absorción del pico 1 de la muestra de Calostro de Glioma y de la inyección doble de este y el OM por el método 3	89
Figura 26. Electroferograma de agua desionizada y libre de pirógenos por medio del método 3	91
Figura 27. Electroferograma de buffer de corrida de Colatos-Boratos por medio del método 3	91
Figura 28. Electroferograma de C57 y de la inyección doble de este y el OM por medio del método 3	93
Figura 29. Electroferograma comparativo de Balb, Balb 6-8 KDa y de la inyección doble de este y el OM por medio del método 3	96
Figura 30. Electroferograma de Factor de Transferencia de cerdo y de la inyección doble de este y el OM por medio del método 3	100
Figura 31. Electroferograma comparativo de la inyección doble entre las muestras y el OM evaluadas por el método 3	102
Figura 32. Electroferograma de Factor de Transferencia de cerdo y de la inyección doble de este y el OM por medio del método 4	108
Figura 33. Electroferograma de Calostro de Glioma y de la inyección doble de este y el OM por medio del método 4	111
Figura 34. Electroferograma de Balb y de la inyección doble de este y el OM por medio del método 4	115
Figura 35. Electroferograma de C57 y de la inyección doble de este y el OM por medio del método 4	119
Figura 36. Electroferograma comparativo de la inyección doble entre las muestras y el OM evaluadas por el método 4	122

Tabla 1a I. Resultados del Factor de Transferencia de cerdo por medio del método 2.	70
Tabla 1a II. Resultados del Factor de Transferencia de cerdo y marcador Neutro por medio del método 2.	71
Tabla 1b I. Resultados del Calostro evaluado por medio del método 2	74
Tabla 1b II. Resultados del Calostro y el marcador neutro evaluado por medio del método 2.	74
Tabla 1c I. Resultados del Balb evaluado por medio del método 2	75
Tabla 1c II. Resultados del Balb y el marcador neutro evaluado por medio del método 2.	75
Tabla 1d. Resumen de los resultados obtenidos por medio del método 2	81
Tabla 1e. Valores de migración efectiva de picos semejantes obtenida en el método 2	82
Tabla 2a I. Resultados del Calostro de Glioma evaluado por medio del método 3.	86
Tabla 2a II. Resultados del Calostro de Glioma y marcador neutro por medio del método 3.	86
Tabla 2b I. Resultados del C57 evaluado por medio del método 3	92
Tabla 2b II. Resultados del C57 y el marcador neutro evaluado por medio del método 3.	92
Tabla 2c I. Resultados del Balb y Balb de 6-8KDa evaluado por medio del método 3.	94
Tabla 2c II. Resultados del Balb y el marcador neutro evaluado por medio del método 3	95
Tabla 2d I. Resultados del Factor de Transferencia de Cerdo evaluado por medio del método 3.	99
Tabla 2d II. Resultados del Factor de Transferencia de Cerdo y el marcador neutro evaluado por medio del método 3.	99
Tabla 2e. Resumen de los resultados obtenidos por medio del método 3	101
Tabla 2f. Valores de migración efectiva de picos semejantes obtenida en el método 3 .	105
Tabla 3a I. Resultados del Factor de Transferencia de Cerdo evaluado por medio del método 4	109.
Tabla 3a II. Resultados del Factor de Transferencia de Cerdo y el marcador neutro evaluado por medio del método 4	110
Tabla 3b I. Resultados del Calostro de Glioma evaluado por medio del método 4.	113

Tabla 3b II. Resultados del Calostro de Glioma y marcador neutro por medio del método 4.	113
Tabla 3c I. Resultados del Balb evaluado por medio del método 4	114
Tabla 3c II. Resultados del Balb y el marcador neutro evaluado por medio del método 4.	114
Tabla 3d I. Resultados del C57 evaluado por medio del método 4	116
Tabla 3d II. Resultados del C57 y el marcador neutro evaluado por medio del método 4.	116
Tabla 3d III. Resultados del C57 y el marcador neutro evaluado por medio del método 4. .	117
Tabla 3e. Resumen de los resultados obtenidos por medio del método 4.	120
Tabla 3f. Valores de migración efectiva de picos semejantes obtenida en el método 4. .	121
Tabla 4. Condiciones optimas .	128

ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidad Mediada por Anticuerpos
Cm	Centímetros
CMC	Concentración Micelar Crítica
CV	Coeficiente de Variación
CV_{μe}	Coeficiente de Variación de la movilidad efectiva
DLE	Extracto Dializable de Leucocitos
DTH	Hipersensibilidad Cutánea Tardía
E	Campo Eléctrico
EC	Electroforesis Capilar
ECC	Electrocromatografía Capilar
ECG	Electroforesis capilar en gel
ECZ	Electroforesis capilar de zona
FEO	Flujo Electrosmótico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IEF	El Enfoque isoeléctrico
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
INF-γ	Interferón Gama
KDa	Kilo Daltons
KV	Kilo volts
LIF	Factor Inhibidor de Leucocitos e Inmuno-fluorescencia inducida por láser
M	Molar
mM	Micromolar
mA	Micro Amperes
MEKC	Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar
MIF	Factor Inhibidor de Macrófagos
Min	Minutos

mL	Mililitros
nL	Nanolitros
nm	Nanómetros
OM	Óxido de Mesitilo
psi	Micro unidades de Presión
RT-PCR	
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Seg	Segundos
TCR	Receptor de Células T
TF	Factor de Transferencia
TFC	Factor de Transferencia de Bazo de Cerdo
TFs	Factores de Transferencia Específicos
Tm	Tiempo de Migración
Tm_x	Tiempo de Migración Promedio
UV-VIS	Ultravioleta Visible
W	Watts
λ	Longitud de Onda
λ_{Max}	Longitud de Onda Máxima
μAU	Microunidades de Absorbancia
μ_e	Movilidad Efectiva
μ_{EF}	Movilidad Electroforética
μ_{EOS}	Movilidad Eelectroosmótica
μ_x	Movilidad Efectiva Promedio
μL	Microlitros
μm	Micrometros



1.- RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un método por medio de Electroforesis Capilar para evaluar diferentes **Extractos Dializables de Leucocitos** (DLE), con lo cual se pretende encontrar al **Factor de Transferencia** (TF) presente en estos, y con ello poder determinar su naturaleza química.

Para la experimentación se utilizaron diferentes Extractos Dializables de Leucocitos otorgados por el Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, estos fueron: H37RV, HSP56 utilizando para estos como controles agua desionizada libre de pirógenos, así como su vehículo o aditivo cuya composición es una mezcla de sacarosa y glicina, Balb/c a diferentes cortes de diálisis, C57 ambos de ratón, Calostro de Glioma y DLE de Bazo de cerdo, utilizando como control agua desionizada libre de pirógenos y el empleo de un marcador de flujo como el Óxido de Mesitilo.

Se desarrollaron diferentes métodos para la evaluación de los extractos; el primero con Electroforesis Capilar de Zonas (ECZ) para los extractos H37RV y HSP56 que contenían el aditivo, los resultados no fueron muy satisfactorios debido principalmente al vehículo, ya que este interfirió de forma negativa en las corridas. Los métodos posteriores se desarrollaron basados en la Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (MEKC) con variaciones en los buffers de corridas utilizando diferentes formadores de micelas y diferentes longitudes de capilar. Lógicamente existieron diferencias entre estos métodos desarrollados mediante MEKC, resultando



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



como condiciones de corrida optimas: Buffer SDS-Boratos de concentración 50-20 mM, con pH= 9.17; usando un capilar de sílice fundida con longitud total 65cm, 50 cm de longitud efectiva y 75 μ m de diámetro interno; λ optimas de 215, 268 y 280 nm; Inyección Hidrodinámica; Detección directa con voltaje aplicado de 15KV durante 30 min.

Los resultados obtenidos muestran un patrón de salida similar entre las diferentes muestras de extractos utilizados, es decir, se encontraron las **Patrón Electroforético** de los Extractos Dializables de Leucocitos, con lo que respecta a la naturaleza química de los componentes, no fue posible su determinación ya que requiere la aplicación de otros parámetros como el de los puntos isoeléctricos para saber si los componentes son de naturaleza peptídica y un detector de UV, así como realizar pruebas biológicas de los diferentes componentes encontrados.



2.- ANTECEDENTES

Desde el punto de vista histórico, inmunidad significa protección frente a la enfermedad y más específicamente ante las infecciones. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario y la respuesta global y coordinada tras la introducción de sustancias extrañas se conoce como respuesta inmunitaria. Hoy en día sabemos que muchos de los mecanismos de resistencia a las infecciones, también participan en la respuesta individual a sustancias extrañas no infecciosas. Además, los mecanismos que normalmente protegen a los individuos de las infecciones y eliminan las sustancias extrañas son capaces por sí mismos en ciertas circunstancias de producir una lesión y/o enfermedad tisular. Por lo tanto, una definición más completa y moderna considera a la inmunidad como una reacción a las sustancias extrañas, incluyendo a los microorganismos, así como, a macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos, sin que dicha reacción tenga una repercusión fisiológica o patológica. La inmunología es el estudio de la inmunidad en su sentido más amplio y de los acontecimientos celulares y moleculares que tienen lugar una vez que el organismo entra en contacto con los microorganismos y otras macromoléculas extrañas (Abbas, 1999).

En su expresión moderna, la inmunología es una ciencia experimental en la que las explicaciones de los fenómenos inmunológicos se basan en las observaciones experimentales y conclusiones que se extraen a partir de ellas. La evolución de la inmunología como una disciplina experimental ha dependido de



nuestra capacidad para manipular la función del sistema inmunitario bajo condiciones controladas (Abbas, 1999).

Nuestra salud es influenciada directamente por nuestro sistema inmunológico. Un sistema inmunológico sano y en equilibrio es vital para que el cuerpo tenga la habilidad de defenderse contra los agentes infecciosos. En la actualidad, sin embargo, muchos factores contribuyen al debilitamiento general de las defensas del cuerpo. Los antibióticos han comenzado a fallar por que la resistencia de muchas especies infecciosas se multiplica. Las enfermedades ahora se expanden más fácilmente que nunca, debido a la inhabilidad del gobierno para controlar los códigos de salud, el deterioro de la calidad del agua y los frecuentes viajes internacionales.

La gran mayoría de los mexicanos ha tenido exposición temprana al bacilo que produce la tuberculosis. Sin embargo, una parte importante desarrolla resistencia a la enfermedad en lugar de padecerla. Gracias a esa inmunidad y a la creada frente a otras como la lepra, diferentes tipos de herpes, varicela y candidiasis, entre muchas más, se ha podido desarrollar en el Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del IPN una sustancia de gran eficacia para el tratamiento de casos graves, llamado inmunomodulador (<http://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2002/al021a.html>).

El término inmunomodulador se emplea generalmente para describir la manipulación farmacológica, del estado de actividad del sistema inmunológico.



Esta puede involucrar un incremento en la magnitud de la respuesta inmunológica “inmunoestimulación” o una disminución en la magnitud “inmunosupresor”; la inmunoestimulación específica implica el cambio en la respuesta del sistema a un estímulo antigénico particular como el proceso de vacunación (Mulcahy y Quinn, 1986).

Ese producto puede modificar la respuesta inmunológica del organismo, es decir, la que nos protege de contraer enfermedades infecciosas, alérgicas o autoinmunes, y que en un futuro también podrá tener una aplicación sobre el cáncer, propone Sergio Estrada Parra, quien actualmente coordina los trabajos de investigación del Departamento de Inmunología de la ENCB (<http://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2002/al021a.html>)

"El inmunomodulador se obtiene al romper los glóbulos blancos de la sangre (leucocitos), que son los que nos defienden de las enfermedades y modifican la respuesta inmunológica para que ésta siempre trabaje bien" (Huerta, 2002).

Investigadores han descubierto un potente agente de origen natural que puede aumentar nuestra habilidad para combatir las infecciones y mejorar la calidad de vida para muchas personas. Factor de Transferencia es el nombre dado a este agente. Se encuentra en Sangre Periférica, Bazo, Calostro, y es un medio natural para fortalecer nuestro sistema inmunológico contra las infecciones (http://www.4tf-spanish.com/info_tf.html).



Sherwood Lawrence en 1955, logró demostrar que existía la posibilidad de transferir la respuesta inmunológica celular en humanos, abriendo con esto nuevas ramas en la investigación y el inicio en el desarrollo de nuevas formas de terapias inmunomoduladoras. En 1955, encontró que la Hipersensibilidad Cutánea Tardía o DTH podía ser transferida utilizando extractos solubles de leucocitos provenientes de 20 mL de sangre. El doctor Lawrence descubrió que una respuesta inmunológica podía ser transferida de un donante a un receptor mediante la inyección de un extracto de leucocitos. Se postuló que el extracto contenía un factor capaz de transferir la inmunidad del donante al recipiente. Lawrence denominó esta sustancia Factor de Transferencia, el término que ahora usan los científicos. Debido a sus características el factor de transferencia se considera como un potente agente inmunoterapéutico principalmente en estados de inmunodeficiencia mediada por células (Lawrence, 1955; Klein, 1982; Roitt, 1992; Rodríguez, 2002).

Actualmente el interés por el Factor de Transferencia, considerado como un potente inmunomodulador, se ha incrementado, principalmente por ser usado en el combate contra las enfermedades infecciosas, terapia de Cáncer, tratamiento de enfermedades autoinmunes y tecnología de trasplantes.

Los beneficios del TF fueron revisados en las ponencias del XI Simposio Internacional sobre el factor de transferencia llevado a cabo en 1999 en la ciudad de Monterrey México. Estos reportes abarcan el exitoso uso del factor de transferencia en la atención de enfermedades virales, parasitarias, fúngicas,



malignas, neurológicas y enfermedades autoinmunes. Es importante hacer saber que científicos mexicanos han presentado diversos trabajos acerca del factor de transferencia en este congreso, tal como el del Doctor Sergio Estrada Parra quien ha patentado en México un proceso para obtener factor de transferencia de la sangre y se ha utilizado efectivamente en el tratamiento de diversos padecimientos tales como el asma bronquial alérgica, la dermatitis atópica y herpes zoster con muy buenos resultados (<http://www.multired.com/negocios/lavillun.html>).

El factor de transferencia, empezó a ser desarrollado en México por el doctor Sergio Estrada, en colaboración con el doctor Oscar Velasco. Ahora está en construcción una planta con la supervisión de la Secretaría de Salud para producir el inmunomodulador con las nuevas normas de calidad farmacéutica y en mayor volumen. (<http://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2002/al021a.html>).

Otra de las ventajas del producto, afirma el investigador, es que no tiene efectos secundarios y se puede obtener en cualquier parte del mundo, ya que eso es relativamente sencillo comparado con la obtención de otros agentes terapéuticos como el interferón o las interleucinas, que son muy caros y tienen efectos secundarios muy importantes (<http://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2002/al021a.html>).



Electroforesis Capilar:

El término “Electroforesis” fue empleado por primera vez por Michaelis en 1909 para describir la migración de coloides en un campo eléctrico. La primera práctica de un método de electroforesis fue descrita por Tiselius en 1937. Él usó un tubo-U llenando con una solución amortiguadora la capa encima de la muestra; la migración podría ser monitoreada usando Schlieren ópticas. En la electroforesis de zona, el tubo-U fue remplazado por papel, un material de apoyo simple para prevenir o minimizar la difusión de iones, para que estos se aplicaran en una tira estrecha, y en el papel se separarán y permanecerán como zonas relativamente discretas. El papel fue remplazado por una variedad de otros medios, incluyendo acetato de celulosa, almidón hidrolizado (gel de almidón), agarosa y poliacrilamida. Este último, además de ser el medio de apoyo, tiene las propiedades de cribado-tamaño. Del método básico de electroforesis de zonas, se han desarrollado otros medios de separación, incluyendo Enfoque Isoeléctrico (IEF), Isotacoforesis, Electroforesis por Gradiente de Densidad y varias formas de Inmunolectroforesis (Palfrey, 1999).

De alguna manera la Electroforesis Capilar (EC), ha regresado al método original de Tiselius. En su forma más simple, la separación ocurre en una solución buffer dentro de un tubo (Sílice fundida) y la detección ocurre como el movimiento de la muestra más allá de una ventana óptica (Palfrey, 1999).



3.- INTRODUCCIÓN

El creciente interés por conocer más sobre la composición química de muestras complejas, ha motivado el desarrollo de técnicas cada vez más precisas y confiables, que sean más sencillas y costeables para los laboratorios.

Las técnicas de separación se utilizan actualmente para muestras complejas, y para seleccionar la técnica se debe de considerar las propiedades físicas y estructurales de las moléculas presentes en las mezclas que queremos separar e identificar o de las características de la matriz en las que se encuentran, además, la selección se basa en los objetivos que se quieren alcanzar.

Se están realizando esfuerzos por identificar las sustancias presentes en el extracto dializable de leucocitos, una de estas metodologías incluye a la Electroforesis Capilar.

3.1.- RELEVANCIA DEL ESTUDIO

La electroforesis capilar ha resultado más eficiente en el estudio de biomoléculas con respecto al HPLC, además, de que no existen reportes que se refieran al uso de la Electroforesis Capilar para identificar las moléculas presentes en el DLE.



Basados en las características estructurales reportadas en los diferentes estudios para la identificación de los componentes del extracto realizados a nivel mundial y por las características de la técnica se eligió a la EC para desarrollarlo.

Si se logran encontrar similitudes entre los diferentes Extractos Dilaizables de Leucitos estudiados en éste proyecto, así como la naturaleza química de estas similitudes, podría darse un paso importante, para determinar cuál es la molécula principal de este inmunomodulador y se habrá aportado un avance importante en el estudio de éste destacado reactivador celular linfocitario, para poder descubrir algún día, el posible mecanismo de acción.

4.- GENERALIDADES

4.1.- FACTOR DE TRANSFERENCIA

4.1.1.- Definición de Factor de Transferencia

El TF es un agente inmunoterapéutico derivado de una estirpe de leucocitos de la sangre (linfocitos) que se define de las siguientes maneras:

- Extracto soluble de leucocitos provenientes de 20 mL de sangre capaz de transferir inmunidad (Fudenberg, 1989).



- Familia de moléculas hidrofílicas altamente polares de bajo peso molecular, las cuales son producidas en pequeñas cantidades por células linfoides y que poseen una potente actividad biológica (Kirkpatrick y col., 1992).
- El TF es una familia de péptidos proveniente de donadores inmunes que transfieren la respuesta de linfocitos T de una manera antígeno específica (Kirkpatrick y col., 1992, 1993).

4.1.2.- Características generales del TF

- Los TF son moléculas de bajo peso molecular entre 3.5 y 6.0 KDa (Kirkpatrick; 1993).
- El TF es lábil al calor pero estable a bajas temperaturas y su actividad biológica permanece
- Puede ser almacenado por varios años a temperaturas entre -20°C y -70°C (Rodríguez, 2003).
- El TF específico no es inmunoglobulina, ni es inmunogénico; transforma linfocitos normales (no sensibles) *in vitro* e *in vivo* para que respondan al antígeno (Padierna, Velasco y Estrada, 1967; Árala y Fundenberg, 1976; Fernández, 1985).
- Se ha determinado arbitrariamente que una unidad internacional de TF corresponde al Extracto Dializable de Leucocitos (DLE) proveniente de 5×10^8 leucocitos colocada en un volumen final de 1 mL o bien, una unidad de TF es aquella que se obtiene de los leucocitos de medio litro de sangre de un sujeto sano (Kirkpatrick y col. 1985; Rodríguez, 2001).



- Los extractos obtenidos por el método de Lawrence contienen al menos 200 diferentes moléculas con pesos moleculares de 1 a 20 KDa. Dentro de estas moléculas se encuentran un conjunto de proteínas con pesos moleculares entre 3.5 y 5 KDa, que son específicas para antígenos, y que se denominan factores de transferencia o factores de transferencia específicos (FTs). Para demostrarlo se empleó TF obtenido de ratones sensibilizados con ferritina, posteriormente se incubó los dializados en superficies plásticas cubiertas con ferritina observando que, al recuperar el extracto, éste perdía su capacidad de transferir la hipersensibilidad cutánea tardía (DTH). La actividad específica puede ser recuperada eluyendo el TF con urea 8 M o acetonitrilo. Los FT son péptidos hidrofílicos altamente polares, con partes ácidas, y que tienen dos regiones: una variable y una constante. La secuencia parcial de las regiones constantes de algunos de ellos ya se conoce. Además de transferir la respuesta inmune celular en forma específica, los FT tienen efectos sobre los canales de calcio, estimulando el transporte de este ión en las células, probablemente activando la respuesta en células del sistema inmune (Charles y Kirkpatrick, 1989; Kirkpatrick y col., 1985, 1992,1993; Huerta, 2002).
- Utilizando cromatografía de permeación en gel. (Sephadex G-15) antes y después de pasarlo por columnas de cromatografía de afinidad en columnas con m-aminofenil y ácido borónico inmovilizado, se descubrió que el material conteniendo un grupo cis-diol podría ser el responsable de la actividad funcional del TF (Kirkpatrick, 1993; Cano, 2001).



Por otra parte, diversos estudios han demostrado que aparentemente no existe barrera interespecies para la utilización del factor de transferencia obtenido de una especie y aplicarse en otra sin ninguna complicación y con excelentes resultados (Rodríguez, 2003).

4.1.3.- Mecanismos de acción propuestos para el TF

El estudio del TF se ha centrado por varias décadas en sus efectos clínicos, desafortunadamente hasta ahora no se había logrado obtener TF con un alto grado de pureza para su análisis molecular, esto había impedido que las investigaciones progresaran y esto limitaba el entendimiento de los mecanismos de acción básicos de su funcionamiento (Kirkpatrick y col. 1992; Cano, 2001). Pero ahora con los DLE obtenidos en la ENCB otorgados para este proyecto y el avance en las técnicas de análisis instrumental, se abre la posibilidad de resolver la incógnita de su naturaleza química, para así, poder elucidar en algunos años su mecanismo de acción.

Aunque el mecanismo de acción exacto no se conoce, se han propuesto varias hipótesis para explicarlo: En 1975, Kirkpatrick estableció que el TF tiene diferentes sitios de acción tales como el timo, la interacción entre linfocitos-monocitos y linfocitos-linfocitos. Además, el TF presenta efectos directos sobre células presentes en el sitio inflamatorio. Sugiere también que la especificidad del TF está determinada por el estado inmunológico en el que se encuentra el sujeto receptor del TF, más que por la información molecular del lisado. Finalmente



propone que muchos de los efectos del TF pueden ser debidos a cambios intracelulares de nucleótidos cíclicos, principalmente por la acumulación de cGMP en células inmunológicamente activas (Kirkpatrick y col., 1974,1992; Cano, 2001).

Se han apreciado múltiples efectos *in vitro*, consistentemente se presentan dos efectos en los receptores: expresión de DTH y secreción *in vitro* de ciertas citocinas por linfocitos T activados (Osteopontina, IL-2 e INF- γ). Una observación constante ha sido la capacidad de los linfocitos de producir factor inhibidor de macrófagos (MIF) y factor inhibidor de leucocitos (LIF) en respuesta a un antígeno, tanto en pacientes con enfermedades infecciosas como en aquellas de origen autoinmune, casi siempre la respuesta *in vitro* corresponde con la aparición de DTH (Kirkpatrick, 1993; Rodríguez, 2003).

El TF incrementa la actividad quimiotáctica de los granulocitos y débilmente la de los monocitos; También actúa como adyuvante (Vanderbark y col., 1977; Cano, 2001).

Incrementa la actividad citotóxica específica contra células tumorales y la actividad de macrófagos y producción de IL-1, aumenta la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) y la reacción de rechazo a trasplantes (Rodríguez, 2003).

También actúa como mitógeno acelerando la producción y diferenciación de las células del sistema inmunológico, regula así las respuestas de las mismas (Zapata y col., 1981; Cano, 2001).



El TF es una molécula de información que puede desbloquear o desreprimir poblaciones de linfocitos T y estimular la proliferación clonal, es decir, que provoca que los linfocitos T vuelven a funcionar y también activa a los macrófagos. Esta actividad se trata de explicar ya que la porción ribonucleotídica del TF que se encuentra presente en la superficie de la célula se podrá unir por complementariedad al DNA (Cech en 1987) y una vez unidos son internalizados por medio de un receptor de DNA (Olsen y Krakowa, 1983; Estrada y col. 1998; Cano, 2001).

En 1988, Karhumaki y colaboradores establecieron, a partir de un estudio enzimático, que la mayor parte de la actividad protectora, tanto en dializados humanos como porcinos, es sobre la base de la acción de estructuras de bajo peso molecular conteniendo péptidos y/o poli-nucleótidos que se pudieran obtener al cortarse el TF, de manera que una porción de estas estructuras permanezca en la superficie celular y de esta manera formar parte del TCR (Kirkpatrick, 1993; Cano, 2001).

Se ha propuesto también que el TF forma parte del receptor del linfocito T (TCR) ya que el TF puede interactuar con la región variable de la cadena α y/o β del receptor de células T para cambiar su avidéz y afinidad por el antígeno en una forma que de otra manera podría ocurrir sólo después del encuentro con el antígeno (Dawer, 1996), entonces este sería necesario para la activación de los linfocitos Th (Fundenberg, 1989, Kirkpatrick, 1993; Cano, 2001).



En 1996 se describieron las propiedades de una subfracción del TF: IMREG(R)-1, la cual se obtiene después de una segunda diálisis con una membrana de 3.5 KDa de corte. Esta subfracción tiene la habilidad de incrementar y acelerar la DTH contra el antígeno con el cual el donador fue sensibilizado y modifica la expresión *in vitro* de la subunidad p55 del receptor para IL-2 en linfocitos CD4 (Gottlieb y col., 1996; Cano, 2001).

Ninguna hipótesis ha sido comprobada haciendo falta realizarse más experimentos, para aceptar o descartar cualquiera, ya que ninguna de ellas explica todos los efectos que se le atribuyen al TF.

4.1.4.- Propiedades inmunológicas del TF

- Conversión de la respuesta de la DTH (Hipersensibilidad cutánea de tipo tardío) a un determinado antígeno de negativa a positiva. (Tsakalos y col., 1982; Roitt, 1998; Huerta López, 2002)
- Capacitación de los linfocitos para producir linfocinas en respuesta a antígenos *in vitro*. (Huerta López, 2002; Roitt, 1998)
- Modulación de la actividad funcional de los linfocitos. (Holeva y col., 2000; Roitt, 1998)
- Proliferación de los linfocitos en respuesta a un antígeno *in vitro*. (Huerta López, 2002)
- Expresión de la actividad citotóxica de los linfocitos. (Huerta López, 2002)



Además, se ha reportado incremento en los niveles de INF- γ en pacientes con herpes zoster que recibieron factor de transferencia.

En algunos padecimientos alérgicos ya se está empleando el TF con buenos resultados como en dermatitis atópica, tuberculosis (Zielinski y col., 1984) y en asma, en este último padecimiento se demostró en un estudio realizado en el Instituto Nacional de Pediatría su utilidad (Huerta López, 2002).

4.1.5.- Estructura química del TF

La mayoría de los estudios realizados indican que el TF contiene pequeñas cadenas de ribonucleótidos unidos a péptidos, originando una estructura de oligoribonucleopéptido. Hubo cierta discrepancia entre diversos investigadores de todo el mundo en lo que se refería a esta estructura, llegándose a la conclusión de que dependía de la forma en la que se obtuviese el TF. Tal parece que el péptido y el oligoribonucleótido se unen *in vivo* y el rompimiento de esta unión aparentemente destruye su actividad biológica (Fudenberg 1994; Cano, 2001).

Considerando el peso molecular y la composición de los diferentes TF aislados hasta el momento, es factible que cada factor contenga por lo menos 40 aminoácidos; por lo tanto, si consideramos las posibles combinaciones con los 20 aminoácidos conocidos (aunque cabe mencionar que solo se han encontrado 18 de los 20, en TF purificados), entonces deben existir varios millones de variaciones en la estructura primaria, y por lo tanto varios millones de TF



específicos para todos los diversos antígenos existentes (Kirkpatrick 1988,1992; Cano, 2001; Rodriguez, 2003).

Un número de modelos moleculares ha sido propuesto a través de los años, basados en las propiedades de sedimentación. Gottlieb y colaboradores (Sudhir, 1988) propusieron que el factor de transferencia eran nucleopéptidos. Posteriormente Paddock, Wilson y Fudenberg (1994) llevaron a cabo un modelo que proponía que la mitad del péptido se unía a un oligonucleótido por un enlace fosfodiéster. La afinidad de materiales purificados ha sido procesada por High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de líquidos de alta resolución “HPLC”) y filtración en gel, los productos fueron virtualmente homogéneos. Éstos materiales tenían un peso molecular de 4.9-5.4 KDa y reteniendo la especificidad del antígeno de los materiales de arranque. La masa completa de las moléculas podría considerarse por la presencia de aminoácidos en la composición; no había ningún componente de ácido nucleico perceptible. Experimentos de mapeo de péptidos han mostrado péptidos que son idénticos a todas las moléculas de factor de transferencia y otros péptidos que son únicos en cada uno de los factores de transferencia. Estos últimos péptidos se cree tentativamente que están relacionados a la especificidad del factor de transferencia (Roitt, 1998).

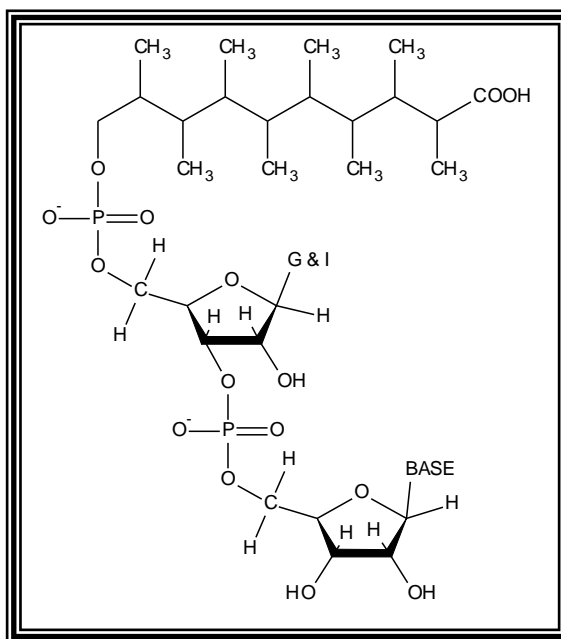


Figura 1. Posible Estructura del TF (Rodríguez, 2003)

4.1.6.- Obtención del DLE y TF

Se obtienen de leucocitos totales de un donador sano; estas células son rotas por ciclos de congelación y descongelación. El lisado leucocitario es posteriormente dializado a través de una membrana con un punto de corte de 12 KDa, posteriormente es liofilizado. Muestras de este DLE son sometidas a pruebas de inocuidad y seguridad para garantizar que sean estériles y libres de pirógenos (Rodríguez, 2003).



4.2.- ELECTROFORESIS CAPILAR (EC)

La electroforesis convencional ha sido y continúa siendo de gran utilidad; sin embargo este tipo de separación electroforética es lenta, laboriosa y difícil de automatizar, y además no proporciona resultados cuantitativos precisos. La investigación y la aplicación de la electroforesis llevada a cabo en capilares tuvo un crecimiento explosivo durante la segunda mitad de la década de los ochenta, ello unido a la aparición de varios instrumentos comerciales.

La *electroforesis capilar* da lugar a separaciones con volúmenes de muestra extraordinariamente pequeños (de 0,1 a 10 nL), en contraste con la electroforesis convencional en la cual se emplean volúmenes de muestra del orden de μL) y con una elevada resolución y rapidez. Además, las especies separadas eluyen de uno de los extremos del capilar, pudiendo utilizarse detectores cuantitativos como los empleados en HPLC, en lugar de las incómodas técnicas de coloración de la electroforesis convencional (Skoog, 2000).

La EC es una técnica de separación que se ha desarrollado gracias a los avances de la cromatografía líquida de alta eficiencia junto con los procedimientos más tradicionales de electroforesis. Esta técnica permite separar bastante bien biomoléculas, donde la cromatografía líquida se muestra menos eficaz, y compuestos de pequeña masa molecular, difíciles de estudiar por los procedimientos clásicos de electromigración en soporte. Desde los comienzos de los años 90, esta técnica, también llamada electroforesis capilar de alta eficacia



(HPCE), ha relegado de los laboratorios de bioquímica la electroforesis convencional (Rouessac, 2000).

4.2.1.- Fundamento de las Separaciones Electroforéticas

La **electroforesis** es la migración de partículas cargadas eléctricamente o moléculas presentes en un medio líquido conductor, usualmente acuoso bajo la influencia de un campo eléctrico. El equipo de **electroforesis capilar** que se representa en la figura 2 dispone de un voltaje en KV y separa los componentes de una disolución dentro de un tubo capilar de sílice fundida (SiO_2), cuya longitud oscila entre 20 y 80 cm y de un diámetro interno de 25 a 75 μm . Los extremos del tubo capilar son sumergidos en el buffer acuoso, llamado electrolito o buffer de corrida, contenido en dos recipientes o biales, y el capilar es llenado con el buffer.

También en cada recipiente están los electrodos de platino que sirven para establecer contacto eléctrico entre la fuente de poder de alto voltaje y la columna capilar. La introducción de la muestra se realiza reemplazando uno de los biales con buffer por un bial que contiene la muestra (disuelta en agua o en buffer) y luego aplicando por unos segundos una presión externa con ayuda de una bomba (inyección hidrodinámica) o bien un campo eléctrico (inyección electrocinética), todo esto se realiza de forma automatizada.

Hecho lo anterior, se aplica el campo eléctrico para llevar a cabo la separación. La diferencia de potencial aplicada puede llegar a los 600 V/cm, pero



la intensidad no debe sobrepasar una centena de mA, con el fin de que la energía disipada se mantenga inferior a 3 W. Para limitar el calentamiento del capilar es preferible situarlo dentro de un recinto termostatzado. El detector se encuentra ubicado a una distancia del extremo anterior del capilar y cerca del comportamiento catódico.

La detección se realiza ya sea en línea (a través de la pared del capilar) con un detector UV-VIS, arreglo de diodos o fluorescencia, o fuera del capilar con detectores como índice de refracción, conductimetría, amperometría, e inclusive espectrometría de masas. La señal obtenida es la base de la obtención del *electroferograma* que nos muestra el registro de la composición de la muestra. Los diferentes solutos tienen diferentes *movilidades* y por consiguiente migran a través del capilar con diferente movilidad (Harris, 2001; Rouessac, 2000 y Dale, 1995).

La velocidad de separación y resolución de los compuestos mejora al realizar las medidas en capilares, debida a la facilidad del aumento del campo eléctrico aplicado. Lo anterior se debe a que al realizar la separación en capilares el calor generado al aplicar el campo eléctrico puede ser disipado más fácilmente con la consecuente facilidad en la utilización de voltajes mayores.

La movilidad electroforética es directamente proporcional a la carga eléctrica del analito e inversamente proporcional a los factores de retardo por rozamiento. El campo eléctrico actúa solamente sobre los iones. Si dos especies difieren bien en la



carga o en las fuerzas de rozamiento, se moverán a través del tampón y se separan. Las especies neutras no se separan. La fuerza de retardo por rozamiento se determina en un analito cargado, a partir del tamaño y de la forma del ión y de la viscosidad (Skoog, 2000).

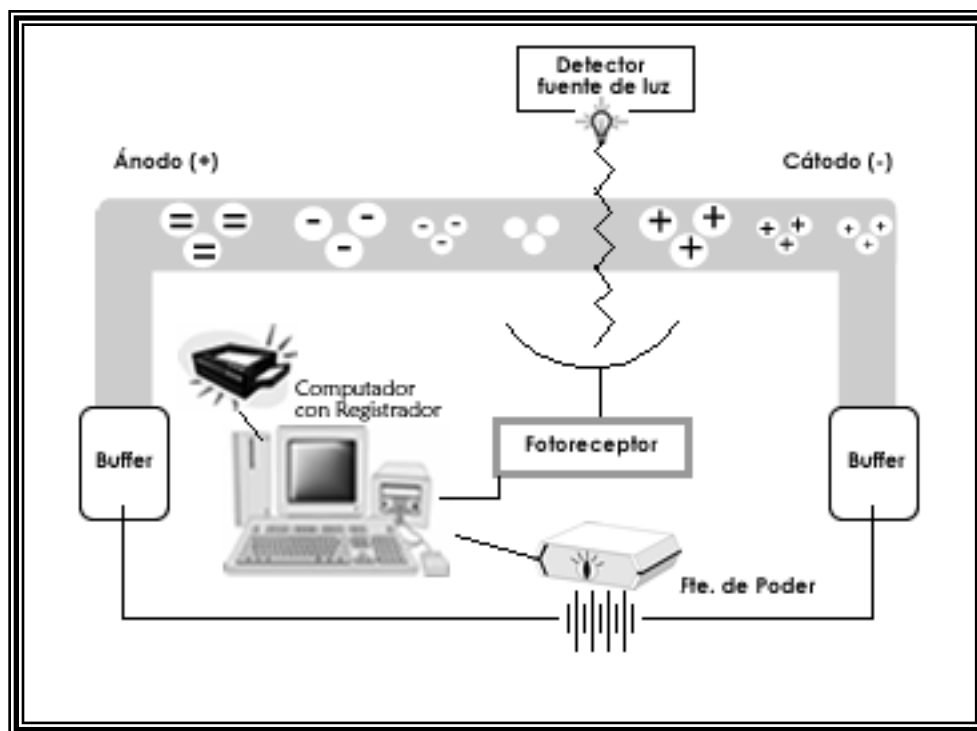


Figura 2. Esquema representativo de un sistema de electroforesis capilar (E = campo eléctrico, V = voltaje, d = distancia). La figura es una versión modificada de <http://ntri.tamuk.edu/ce/ce.html>

La separación depende, por lo tanto, de la relación **tamaño/carga** del ión hidratado, las especies neutras se separan mal entre ellas, salvo que se añada al electrolito un agente iónico capaz de asociarse con ellas y provocar su migración diferencial (Rouessac, 2000).



En la electroforesis capilar de zona, la separación se basa en las diferencias de movilidad electroforética. Si la pared del capilar es negativa (Figura 3), el flujo electrosmótico se dirige hacia el cátodo (Figura 4 y 5) y el orden de elución es cationes antes que las moléculas neutras y éstas antes que los aniones (Harris, 2001).

Las especies presentes en la muestra están sometidas a dos efectos principales que se manifiestan sobre iones, moléculas o micelas. Se trata por una parte de su *movilidad electroforética* propia y, por otra, del flujo o movilidad *electrosmótica*.

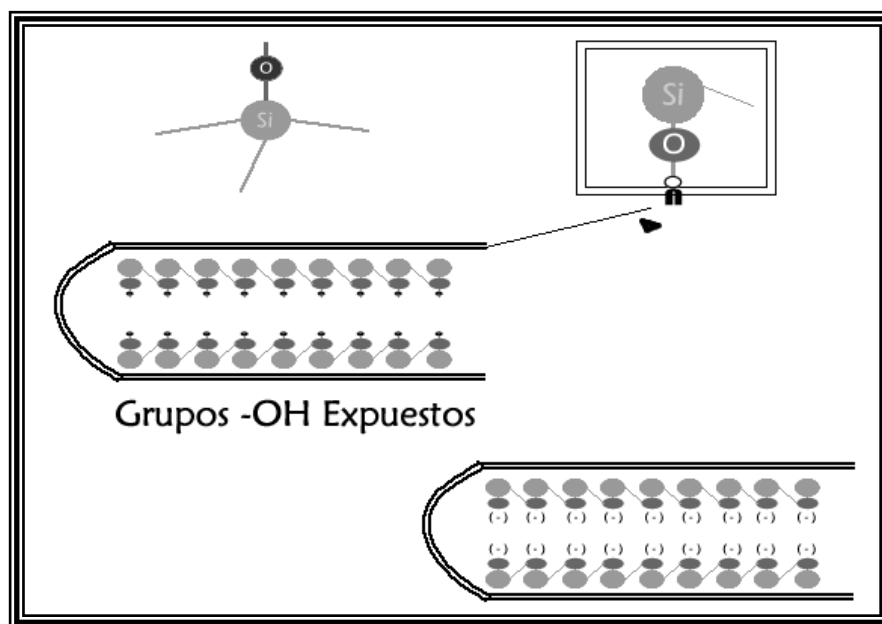


Figura 3. Esquema representativo de los capilares de sílice fundida donde se observan los grupos silanol ionizables.



4.2.2.- Movilidad electroforética

Todo compuesto portador de una carga eléctrica se desplaza en el electrolito con una velocidad que depende de las condiciones experimentales y de su verdadera movilidad electroforética μ_e . Este parámetro se define a partir de la velocidad de migración del compuesto y del campo eléctrico. La movilidad electroforética tendrá un signo (+ o -) según la naturaleza, catiónica o aniónica de la especie; μ_e es nula para una especie globalmente neutra (Rouessac, 2000).

4.2.3.- Movilidad electroosmótica-electroósmosis (EOF)

El segundo factor que controla la migración de los solutos es el flujo del electrolito, también llamado *flujo electrosmótico* y caracterizado por su movilidad electroosmótica μ_{EOS} .

El movimiento o flujo de solvente dentro del capilar, el cual a su vez influye en la separación de las moléculas está determinada por la acción de un campo eléctrico que produce dentro del capilar un fenómeno llamado electroósmosis y está caracterizado por un término denominado Flujo Electrosmótico (EOF) (Weinberger, 2000; Kuhn, Wiley and Sons, 1998; Camillery, 1997; Altria 1996; Righetti 1996; Guzmán y Jandik, 1993).

El EOF puede modificar la migración de los compuestos, por lo tanto, si se mueven a la misma dirección que los analitos, la velocidad de éstos será mayor, si



por otro lado, se mueven en contra del EOF su velocidad será disminuida. Las moléculas neutras se moverán a la misma velocidad que el EOF y este hecho permite determinar experimentalmente la velocidad del EOF. Su cálculo se lleva a cabo a partir de los tiempos de migración que posee un marcador neutro, que se usa como trazador, tiempo que necesita para recorrer la distancia efectiva del capilar. Se elige como marcador una molécula orgánica, no polar al pH del electrolito utilizado, y que se puede detectar fácilmente por absorción en el UV próximo (por ejemplo, acetona, óxido de mesitilo o alcohol bencílico). El flujo electrosmótico, origen del desplazamiento de todas las especies presentes en la muestra, depende de la naturaleza de la pared interna del tubo capilar. Esta pared de sílice, y el recubrimiento de grupos silanol que se ionizan si el pH es superior a 3, forman una superficie con lugares aniónicos, fijos, que crean un potencial negativo <<el potencial Z>> enfrentando a una capa catiónica bañada de iones H_3O^+ (Ver figura 4). Pero, más al interior de la disolución, el campo eléctrico provoca una migración de los cationes hacia el cátodo. Estos son disueltos y arrastrados por las moléculas de agua del electrolito que se dirigen hacia el cátodo. Los aniones siguen el movimiento general, es decir, progresan de manera <<contra-electrosmótica>>.

Es posible invertir la polaridad de la pared si se añade un agente tensoactivo, como por ejemplo un tetra-alquil-amonio, que provoca la inversión del flujo electrosmótico (ver figura 6). De este modo, y como regla general, una superficie negativa provoca un flujo electrosmótico que se dirige hacia el cátodo y a la inversa. En la práctica de la electroforesis capilar el control del flujo electrosmótico es esencial para obtener resultados reproducibles. Por lo tanto, es poco aconsejable utilizar



capilares con paredes no tratadas (Rouessac, 2000; Weinberger, 2000; Kuhn, Wiley and Sons, 1998; Camillery, 1997; Altria 1996; Guzmán, y Jandik, 1993).

Entonces, cuando se aplica un potencial elevado a través de un capilar que contiene un tampón, se origina normalmente *un flujo electrosmótico*, gracias al cual el disolvente migra hacia el cátodo o el ánodo. La velocidad de migración puede ser apreciable. Por ejemplo, se ha demostrado que una disolución tampón 50 mM de pH=8 migra hacia el cátodo a través de un capilar de 50 cm a una velocidad de aproximadamente 5 cm/min cuando se aplica un potencial de 25 kV (Skoog, 2000).

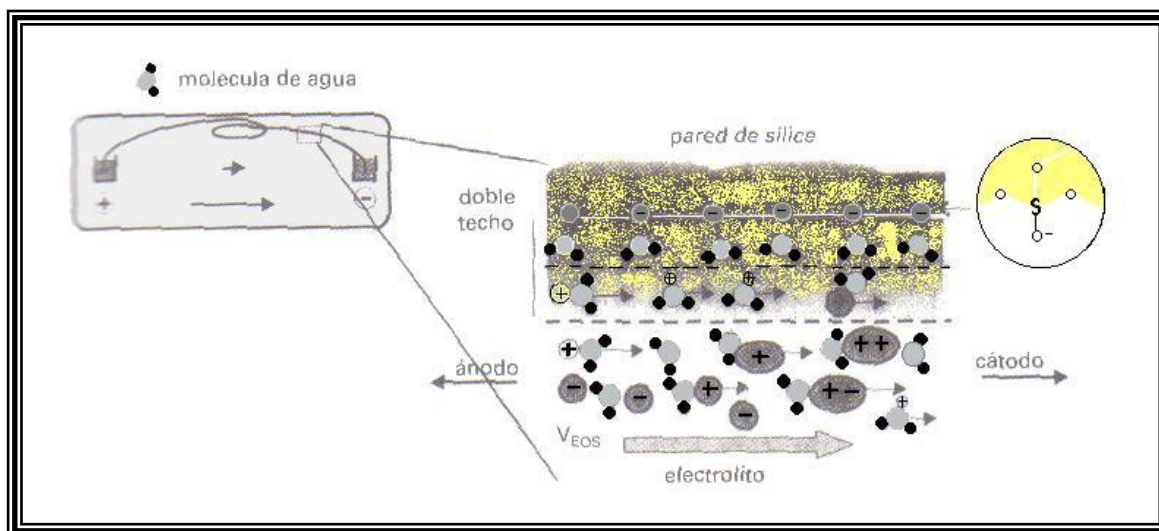


Figura 4. Aparición de flujo electrosmótico en un electrolito según la naturaleza de la pared interna del capilar. Si la pared no ha tenido tratamiento (pared polianiónica de vidrio o sílice) aparece un efecto de bombeo que aspira el líquido desde el compartimiento anódico hacia el compartimiento catódico, que constituye el flujo electrosmótico.



Como se indica en la Figura 4, la causa del flujo electrosmótico es la doble capa eléctrica que se forma en la interface sílice/disolución. A valores de pH por encima de 3, la pared interna de un capilar de sílice presenta carga negativa debido a la ionización de los grupos silanol ($\text{Si}-\text{OH}$) de la superficie. Los cationes del tampón se agrupan sobre la superficie negativa del capilar de sílice para formar la doble capa eléctrica. Los cationes, situados en la capa exterior difusa de la doble capa, son atraídos hacia el cátodo o electrodo negativo, y dado que los cationes están solvatados arrastran al resto de la disolución con ellos, a lo largo del capilar (Skoog, 2000).

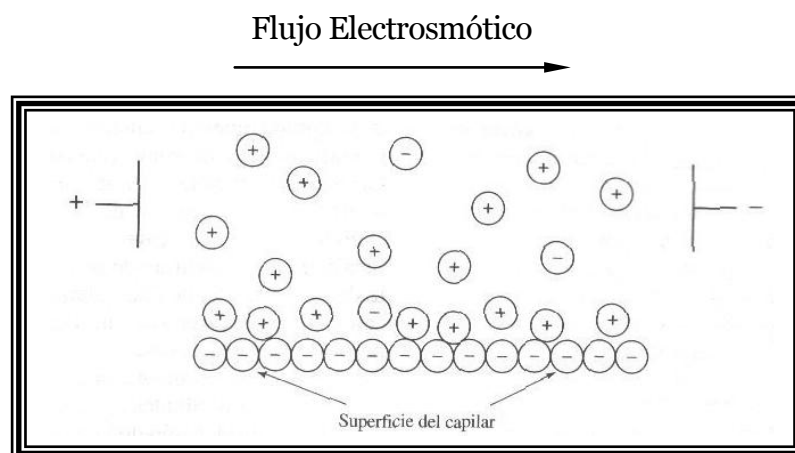


Figura 5. Distribución de las cargas en la interfaz del capilar de sílice y flujo electrosmótico resultante (Reproducción autorizada de A. G. Ewing, R. A. Wallingford y T. M. Olefirowicz, *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 294 A.)

Las separaciones de las especies aniónicas son muy frecuentes en EC. Generalmente se invierte la polaridad del aparato, estando por tanto el detector en el lado anódico. El flujo electrosmótico está asimismo invertido. Sólo podrán ser detectados los aniones en los cuales las μ_{EF} sean superiores a las μ_{EOS} (Rouessac, 2000).

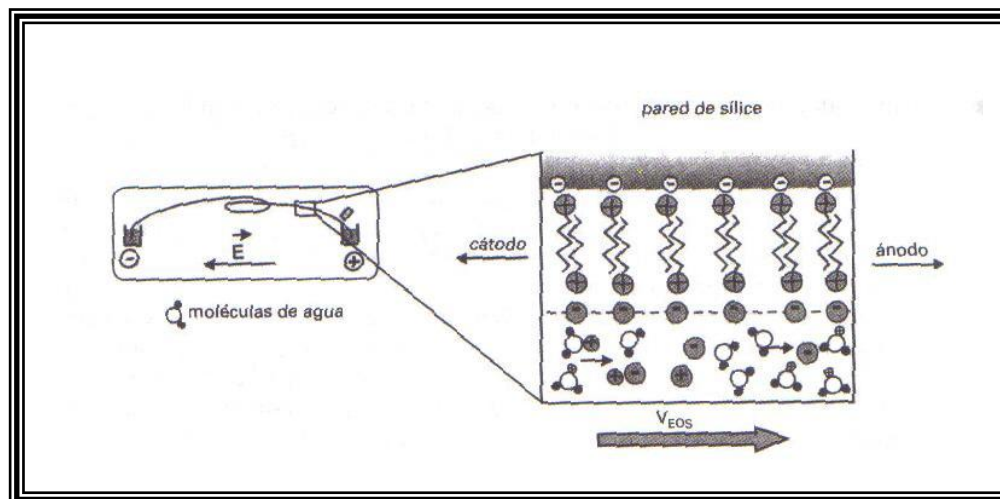


Figura 6. Efecto de un agente tensoactivo catiónico sobre la pared de sílice. Las migraciones deben hacerse hacia el extremo donde se encuentra el detector, debiendo invertirse la polaridad del equipo. Las especies aniónicas progresan de modo natural en el mismo sentido del flujo del electrolito, por lo tanto hacia el detector.

Existen varios factores que pueden afectar al flujo electrosmótico como son la adición de disolventes orgánicos, pero principalmente se verá afectado por el pH de trabajo y el campo eléctrico aplicado, también se ve afectado por la fuerza iónica del buffer, y también es influenciado por la viscosidad y la temperatura, también afectan al EOF la adición de polímeros hidrofílicos al buffer, así como los surfactantes y la derivatización del capilar con moléculas adheridas covalentemente a su pared (Rouessac, 2000; Weinberger, 2000; Kuhn, Wiley and Sons, 1998; Camillery, 1997; Altria 1996; Guzmán y Jandik, 1993). Debido a que el EOF se ve afectado por diferentes factores, podemos hacer una manipulación efectiva del mismo, por lo que se pueden hacer varios cambios en las condiciones experimentales obteniendo así varios fenómenos como:



- Controlar al EOF
- Disminuir al EOF
- Eliminar al EOF
- Invertir el EOF

4.2.4.- Instrumentación

4.2.4.1.- Modos de inyección

Para introducir volúmenes de microlitros de muestra, que no debe sobrepasar el 1% de la longitud del capilar para no producir una disminución de la resolución, se utilizan dos procedimientos:

- **Inyección hidrodinámica.** Consiste en sumergir el extremo del capilar en la muestra en disolución (igualmente un electrolito) y provocar una aspiración en el otro extremo. Se puede mejorar el procedimiento ejerciendo una presión de alrededor de 50 mbar sobre la disolución muestra (Rouessac, 2000, Dale, 1995).
- **Inyección electrocinética.** Se utiliza en electroforesis en gel y consiste en sumergir durante un cierto tiempo el extremo del capilar en la muestra sometida a un determinado potencial (50mV/cm), cuya polaridad es elegida con respecto al otro extremo. En contraposición con el procedimiento anterior, este modo de inyección provoca una acción discriminante sobre los compuestos presentes, lo que conlleva que el análisis se realizará sobre una fracción en la cual su



composición es diferente de la muestra de partida. Este modo debe optimizar separa cada tipo de muestra (Rouessac, 2000, Dale, 1995).

4.2.4.2.- Modos de detección

➤ En la detección UV-Vis se mide la intensidad de la luz que pasa a través del capilar en una pequeña zona en la que se ha eliminado el recubrimiento opaco. El capilar intercepta el trayecto óptico procedente desde la fuente al fotomultiplicador (Figura 7). De esta manera se evita todo tipo de volumen muerto. El corto recorrido óptico en el capilar hace poco sensible este modo de detección si la disolución absorbe poco. Para subsanarlo, se puede elegir una longitud de onda corta (200-230 nm), pero entonces las medidas son difíciles, ya que a esa longitud de onda generalmente las matrices son absorbentes (Rouessac, 2000, Dale, 1995).

✦ **DetECCIÓN INVERSA.** Los iones inorgánicos, que absorben muy poco la luz, también pueden ser detectados por medidas de absorbancia: para ello se elige un electrolito conteniendo un cromato o un ftalato para hacerlo muy absorbente. En estas condiciones, cuando un ión de la muestra llega al detector, hay una disminución de la absorbancia, lo que conduce a picos negativos. Esta disminución de la absorbancia está relacionada linealmente con la concentración del ión detectado.

✦ **ARREGLO DE DIODOS.** Los diodos son una serie de detectores UV-Vis pueden proveer información cualitativa acerca de la muestra. La radiación atraviesa el capilar antes de que se disperse en sus longitudes de onda del



componente por un enrejado. La intensidad a cada longitud de onda es simultáneamente moderada por una serie varios cientos de fotodiodos, una computadora procesa y despliega el espectro.

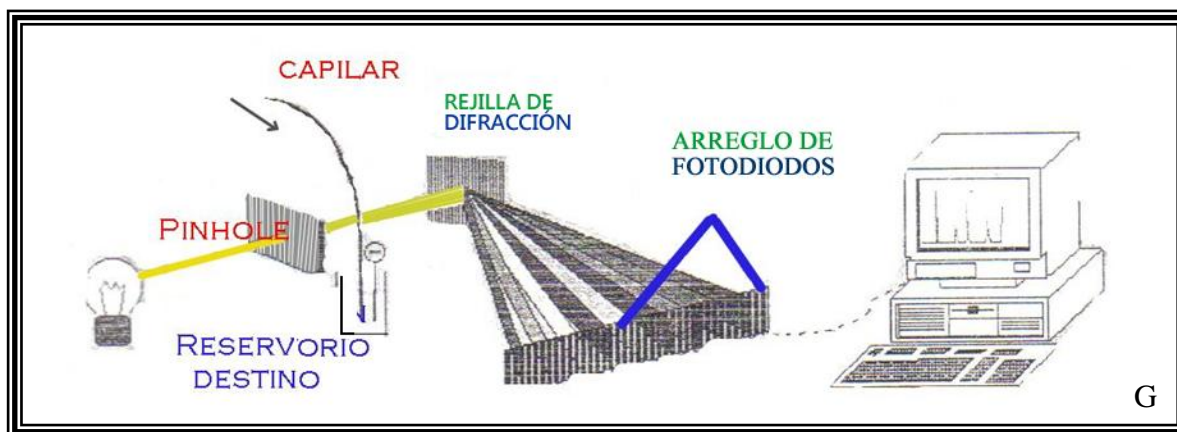


Figura 7. Arreglo de Diodos. Fixed grating (enrejado arreglado), Array of photodiodos (serie de fotodiodos), Pinhole (agujero de alfiler) y reservorio destino

- La detección por fluorescencia resulta más sensible si se emplea una fuente láser muy intensa, asociada a menudo a un procedimiento de pre- o post-formación de derivados de los analitos portadores de un fluoróforo (Rouessac, 2000).
- La detección electroquímica requiere que se inserten minúsculos electrodos en el capilar (Rouessac, 2000, Dale, 1995).
- El acoplamiento con un espectrómetro de masas es un procedimiento igualmente utilizado. El pequeño flujo del capilar se presta bien a los métodos de



ionización a presión atmosférica, lo que permite el estudio de compuestos biológicos (Rouessac, 2000).

4.2.5.- Tipos de electroforesis capilar:

4.2.5.1.- Electroforesis capilar de zona o en disolución libre

Es el procedimiento de electroforesis más habitual, en el cual el capilar es recorrido por el electrolito, un medio tamponado que puede ser ácido (fosfato o citrato) o básico (borato), o por un anfótero (moléculas que poseen carácter ácido o básico). El flujo electrosmótico crece con el pH del medio electroforético. Esta técnica es un procedimiento de electroforesis en zona (Rouessac, 2000, Dale, 1995, Skoog, 1995).

4.2.5.2.- Electroforesis capilar en gel (ECG)

La separación se basa en la forma y tamaño de los compuestos cuando están inmersos en una red polimérica que es el gel. Este gel hará que las movilidades electroforéticas de los analitos sean diferentes cuando estos difieren en su forma espacial y en sus pesos moleculares. Se lleva a cabo en una matriz polimérica con estructura de gel poroso, cuyos poros contienen una mezcla tampón donde ocurre la separación. Estos geles están contenidos en un tubo capilar. Los geles utilizados son por ejemplo agarosa, poliacrilamida, celulosa etc. (Rouessac, 2000, Dale, 1995, Skoog, 1995).



4.2.5.3.- El Enfoque isoelectrónico ó Isoelectroenfoque (IEF)

En esta técnica la diferencia de los puntos isoelectrónicos de las moléculas anfotéricas (o zwitteriones) como las proteínas, péptidos o aminoácidos, se aprovecha para separarlas por el método de isoelectroenfoque. Este método se basa en establecer un gradiente de pH estable en una disolución o gel. Este gradiente se establece por un conjunto de tampones especiales llamados anfólitos que migran por sí mismos hasta que alcanzan sus puntos isoelectrónicos. Cuando la molécula anfotérica se encuentra dentro del medio con gradiente de pH, esta poseerá carga, es decir tendrá una movilidad hasta que alcance la zona de pH en donde encuentre su punto isoelectrónico (carga neta de cero). Los analitos así separados se movilizan al detector aplicando una presión para poder llevarlos a él (Rouessac, 2000, Dale, 1995, Skoog, 1995).

4.2.5.4.- La isotacoforesis

Significa electroforesis a velocidad uniforme. Esto significa que el tiempo de recorrido en el capilar bajo condiciones isotacofóricas es independiente de la velocidad.

Es una técnica de separación por desplazamiento. Antes de iniciar la corrida, el capilar se debe llenar con un electrolito líder o guía en un extremo. Este debe tener una gran movilidad y debe ser mayor que la de los componentes a separar. Luego se introduce la muestra seguida del electrolito terminal o cola,



cuya movilidad debe ser menor que cualquiera de los componentes de la muestra. La selección de los electrolitos guías y terminales depende del conocimiento de los valores de las movilidades y del pKa para todos los componentes de la muestra.

En la isotacoforesis las bandas siempre están en contacto con la zona adyacente. Esta característica es necesaria para mantener la continuidad eléctrica a lo largo del sistema, dado que no hay un electrolito de soporte. Esta técnica puede ser utilizada para determinar cationes y aniones. Se requiere usualmente corridas separadas para determinar cada forma iónica. (Jorgenson1981, Quesada 1996 y Weinberger 2000)

4.2.5.5.- La electrocromatografía capilar (ECC)

Es un híbrido entre la HPLC y la CE donde se reúnen algunas de las mejores características de cada técnica por separado, por lo que tiene ventajas sobre ellas. De esta manera la electrocromatografía capilar puede usarse para la separación de especies no cargadas. Proporciona una elevada eficacia en las separaciones de microvolúmenes de disolución de muestra, sin necesidad de aplicar un bombeo de alta presión.

En la electrocromatografía capilar la fase móvil se transporta a través de la fase estacionaria por el bombeo ejercido por el flujo electrosmótico y no por un bombeo mecánico, lo que simplifica significativamente el equipo.



Electrocromatografía rellena, en la cual un disolvente polar se conduce por el flujo electrosmótico a través de un capilar que contiene un relleno típico de HPLC en fase inversa. Las separaciones dependen de la distribución de los analitos entre la fase móvil y la fase estacionaria líquida retenida por el relleno.

4.2.5.6.- Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC).

Esta técnica requiere la utilización de un tensoactivo en un nivel de concentración en el cual se formen micelas. Estas micelas son capaces de alojar compuestos no polares en su interior. La interacción de las micelas y los solutos es la que produce la separación (Rouessac, 2000, Dale, 1995, Skoog, 1995).

Esta técnica esta aplicada principalmente a la separación de compuestos neutros, aunque también se separan iones. En el caso de sustancias neutras, la separación está basada en las diferencias de interacción de los solutos entre una fase acuosa y una fase micelar (pseudoestacionaria). En esta técnica la fase móvil o acuosa es transportada por el flujo electrosmótico. La fase micelar es transportada por una combinación entre el FEO y la migración electroforética(Rouessac, 2000, Dale, 1995, Skoog, 1995).

Para el caso de las sustancias cargadas se basa en la interacción de los solutos con la fase acuosa y micelar, pero, también se basa en las diferencias de movilidades electroforéticas. La eficiencia de la separación estará determinada



por las diferencias de interacción de los analitos con las dos fases, es decir, entre mayor diferencia de interacción exista entre los analitos la separación será mejor.

La eficiencia de la separación está influenciada por el tipo de tensoactivo (agente formador de micelas) agregado al buffer de corrida, pues cada surfactante tiene un número de agregación micelar diferente, lo que hace que algunos analitos interaccionen mejor con algún tipo de micelas que con otras.

De esta manera podemos agregar al buffer de corrida diferentes tipos de agentes de superficie estos tipos pueden ser:

CLASES DE SURFACTANTES Y PROPIEDADES				
<i>Surfactante</i>	<i>Tipo</i>	<i>CMC</i>	<i>Agregación</i>	
SDS	Aniónico	8.1×10^{-2}	62	Dodecil sulfato de sodio
C TAB	Catiónico	9.2×10^{-4}	170	Bromuro de cetilmetil amonio
BRIJ-25	No iónico	1.0×10^{-4}	40	25 polioxiltileno, 23 lauril éter
Sulfobetaína	Zwitteriónico	3.2×10^{-2}	55	N-dodecil-N-N-dimetil amonio 3-propano 1-sulfónico ácido

Cuadro 1. Se encuentran algunos surfactantes que se pueden utilizar para MEKC



5.- JUSTIFICACIÓN

La propiedad del TF de transferir la inmunidad celular específica de un individuo a otro ha despertado el interés de muchos inmunólogos clínicos por esta molécula, sobre todo por la posibilidad de utilizarla en el tratamiento de enfermedades donde la competencia inmune celular parece estar ausente o deficiente (Rojas, 2001).

Dada la capacidad demostrada del TF y los cuestionamientos acerca de su naturaleza química, es de gran importancia tratar de elucidar de qué está realmente constituido, ya que no ha habido estudios serios que resuelvan por completo esta importante incógnita. Como el TF se obtiene en pequeñísimas cantidades, hay que escoger un método instrumental que sea tan sensible que pudiese detectar bien al inmunomodulador y que fuese superior a las técnicas utilizadas hasta el momento; como HPLC y electroforesis convencional. Gracias a la mayor capacidad y sensibilidad de la Electroforesis Capilar, se selecciono a esta, para resolver el problema.

Así mismo, se logrará estandarizar una técnica para permitir también mejorar el control de calidad de los extractos obtenidos.



6.- OBJETIVOS

6.1.- Objetivo General

Desarrollar un método para la evaluación del DLE, por medio de Electroforesis Capilar de Zonas e identificar el TF presente en este.

6.2.- Objetivos particulares

- ✦ Realizar un barrido para determinar la longitud de onda (λ) optima a muestras del Extractos Dializables de Leucocitos (DLE), empleando Electroforesis Capilar de Zonas por detección con rearreglo de diodos.
- ✦ Realizar corridas por Electroforesis Capilar de Zonas, empleando diferentes soluciones amortiguadoras (Buffers), según la naturaleza del TF reportada en la bibliografía.
- ✦ Estandarizar el método a utilizar para la identificación del Factor de Transferencia por Electroforesis Capilar con detección de rearreglo de diodos, provenientes de los diferentes Extractos Dializables de Leucocitos (DLE) de calostro bobino, ratón y control (aditivo); proporcionados por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB-IPN).
- ✦ Obtención de TF de Bazo provenientes de cerdo para su análisis por el Método de Electroforesis Capilar previamente estandarizado.



7.- HIPÓTESIS

Sí se estandariza el método de Electroforesis Capilar (EC) para la detección del Factor de Transferencia, entonces, se podrá elucidar la posible naturaleza química del Factor, para así, poder implementar otras técnicas y métodos para establecer posteriormente un modelo Biológico *in vitro* de los Extractos Dializables de Leucitos y analizar el efecto biológico de los diferentes picos obtenidos por Electroforesis Capilar.



8.- MATERIALES Y MÉTODOS

8.1.- Equipo

Vortex "Genie 2 VWR scientific".

Campana de flujo laminar horizontal de dos filtros "VECCO".

Aparato de Electroforesis capilar "Beckman Coulter, P/ACE™ MDQ Electroodos".

Sonicador "Elma, Ultrasonic LC30H".

pH-metro digital "Beckman, PHI 316".

Balanza analítica "Mettler, AT 200".

Congelador – 70° C "Pevco, ULT1386-3-A35".

8.2.- Materiales

Capilar de sílice fundida con 65 μm de diámetro interno y 65 y 50 cm de largo, con

Micropipetas de 1000, 200, 50, 10 y 5 μL

Biales para electroforesis capilar de 1 mL

Material general de laboratorio



8.3.- Reactivos

Oxido de mesitilo "Merck"
Ácido Sulfúrico Concentrado
Ácido clorhídrico 0.1 M
Fosfato monobásico de sodio
Fosfato dibásico de sodio decahidratado
Urea
Zinc
SDS "Sigma-Aldrich"
Tetraborato de sodio
Borato de sodio
Metanol para grado HPLC
Sacarosa
Glicina
Agua desionizada
Agua desionizada libre de pirógenos
Hidróxido de sodio 0.1 M
Base Tris

Cuadro 2. Reactivos utilizados durante el proyecto



8.4.- Muestras

Extractos Dializables de Leucitos (DLE)			
<i>Etiqueta</i>	<i>No. de Unidades por Frasco (★)</i>	<i>No. de Frascos</i>	<i>Especie</i>
Placebo (Control)	10	20	Glicina / Sacarosa
H37RV 21 días	10	25	Ratón
HSP56 Inglaterra, Alemania	10	14 12	Ratón
Transferon (Comercial)	1	2	Humano
TF (Bazo)	10	Conc	Cerdo
TF (Bazo) Liofilizado	12	Conc	Cerdo
Calostro	10	1	Bobino (Glioma)
DLE s/aditivo	10	8	Ratón
Balb/c 12-14KDa s/aditivo	12	30	Ratón
Balb/c 6-8KDa s/aditivo	12	10	Ratón
C57 s/aditivo	15	22	Ratón

Cuadro 3. Muestras de DLE utilizadas durante el proyecto

(★)

1 unidad murina 1×10^6 células
1 unidad Humana 1×10^8 células

Cuadro 4. Número de células empleadas por unidad de DLE



8.5.- Actividades realizadas:

Se pensó, que si se utilizaba mayor cantidad de sangre, se obtendría mayor cantidad de TF y esto ayudaría a la determinación de la naturaleza química de este, por ello se escogió al cerdo para que después de la estandarización del método, se corrieran muestras de TF porcinas.

1.- Estandarizar el método de electroforesis capilar empleando los extractos dializables de:

- a) Ratón
- b) Ratón ^C/Aditivo
- c) Control de aditivo
- d) Ratón ^S/Aditivo
- e) Cerdo
- f) Calostro Bovino

a) El DLE humano se proporciona conteniendo 1 unidad de producto liofilizado equivalente al producto de la diálisis de 5×10^8 células linfocitarias.

b) El DLE de ratón se proporciona en frascos conteniendo 10 unidades de producto liofilizado equivalente al producto de la diálisis de 1×10^7 células de bazo.



Es importante mencionar que en los modelos biológicos estudiados en la ENCB se estableció 1 unidad murina = 1×10^6 células de bazo. Debido al bajo contenido de producto se decidió envasar 10 unidades por frasco.

c) En la liofilización de todos los DLE anteriormente descritos se emplea sacarosa y glicina como soporte de liofilización, por lo que se proporcionaron conteniendo el soporte SIN EXTRACTO (aditivo) para evaluar los corrimientos electroforéticos correspondientes a los componentes de este.

d) El DLE de ratón se proporciona en frascos conteniendo 10 unidades de producto equivalente al producto de la diálisis de 1×10^7 (10×10^6) células de linfocitarias.

e) El DLE de cerdo se proporciona en frascos conteniendo producto dializable concentrado de células de bazo.

f) El DLE de calostro bovino se proporciona en frascos conteniendo producto dializable concentrado de calostro de animales.

8.5.1.- Acondicionamiento de capilar

Cuando un capilar es utilizado por primera vez se le tiene que realizar un acondicionamiento para activar los grupos silanol y esto se realizó de la siguiente manera:



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



- 1) Lavar con Metanol grado HPLC o electroforesis 0.1 M para electroforesis capilar por 10 min a 20 psi de presión.
- 2) Lavar con agua desionizada por 5 min a 20 psi de presión.
- 3) Lavar con HCl 0.1 M grado HPLC por 5 min a 20 psi de presión.
- 4) Lavar con agua desionizada por 5 min a 20 psi de presión.
- 5) Lavar con NaOH 0.1 M grado HPLC por 15 min a 20 psi de presión.
- 6) Lavar con agua desionizada por 5 min a 20 psi de presión

Después del acondicionamiento del capilar, antes de cada inicio de sesión de trabajo, lavar con NaOH 0.1 M para electroforesis capilar por 5 min a 20 psi de presión y con agua desionizada por 5 min a 20 psi de presión.



ACTIVIDADES REALIZADAS

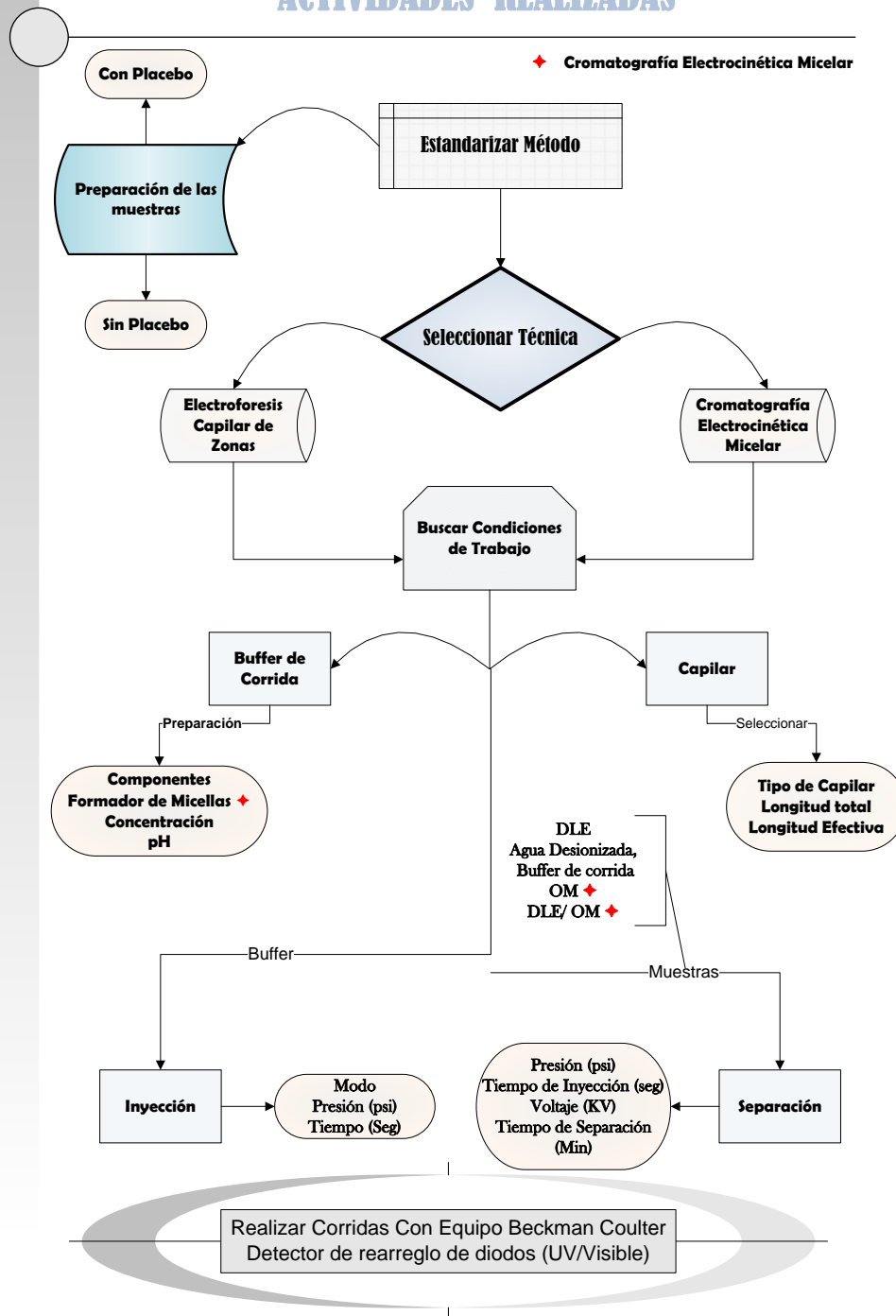


Figura 8. Diagrama de flujo de las actividades realizadas para desarrollar un Método de corrida de las muestras de DLE para EC



8.5.2.- Preparación de la muestra

A los biales que contienen Placebo y TF (H37RV, HSP 65) se les agrega 600 μL de agua desionizada y libre de pirógenos por cada bial que se utilice y evaluarlos por EC.

A los biales que contienen Factor de Transferencia (BALB/c; s/ aditivo) se les agrega 100 μL de agua desionizada y libre de pirógenos por cada bial que se utilice y evaluarlos por EC.

De los biales que contienen Factor de Transferencia de Bazo de Cerdo y Calostro Bovino tomar 200 μL tal y como fueron otorgados, se inyectan para evaluarlos por EC.

Todas las muestras se sonicaron por 2 minutos y filtrados por membrana de 0.45 μm ..



PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

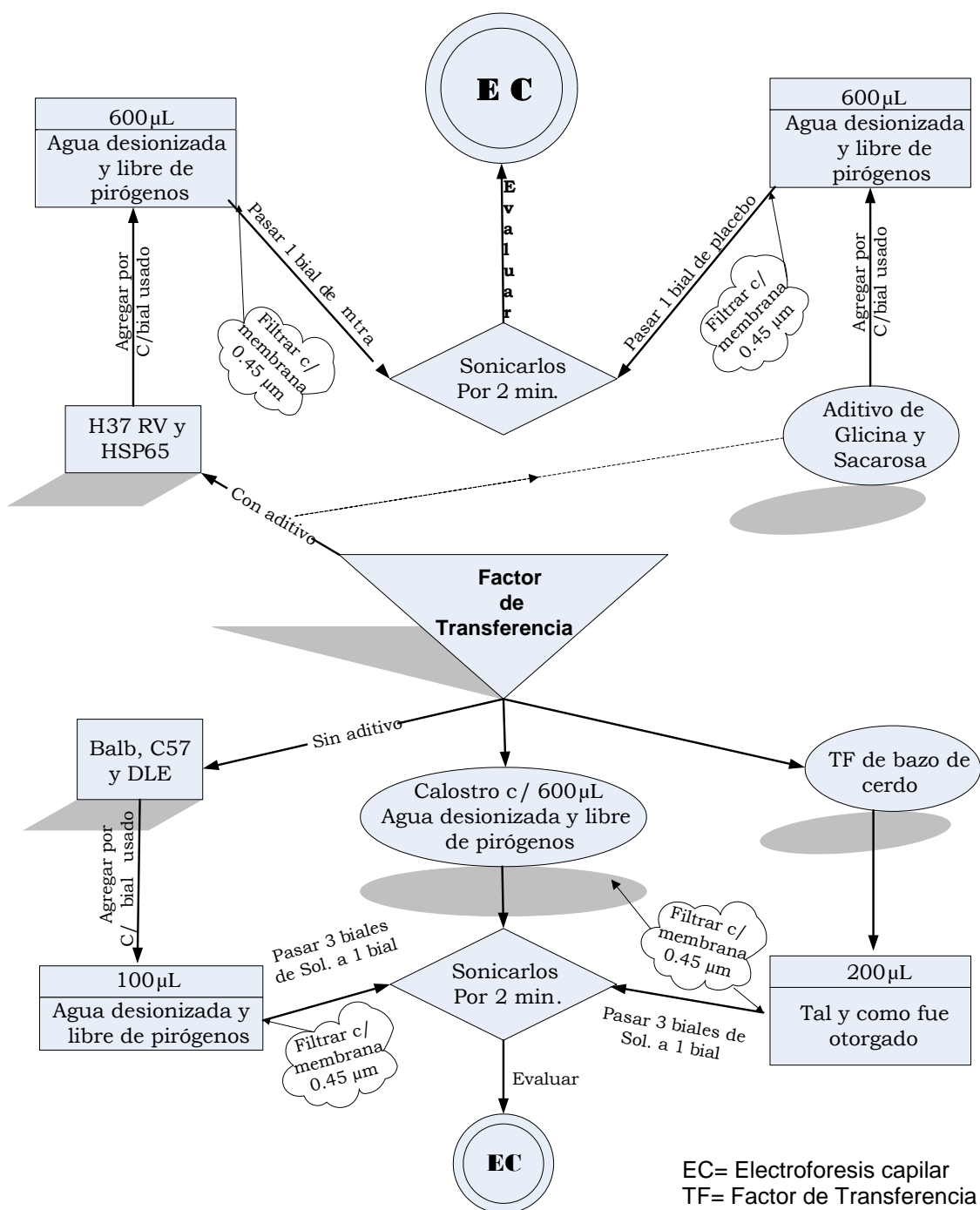


Figura 9. Diagrama de flujo de la preparación de las muestras de DLE para EC



8.5.3.- Método de corrida

Por la naturaleza del estudio, fue necesario realizar las corridas de las muestras con diferentes condiciones, a continuación se enlistan las condiciones utilizadas:

8.5.3.1.- Método 1 (ECZ)

Proceso	Sustancia	Tiempo	Presión	Voltaje	Especificación
Lavado	H ₂ O _{di}	2 min	20 psi		
Llenado	Buffer	8 min	20 psi		
Inyección	Muestra	5 seg	0.5 psi		Hidrodinámica
Separación		25 y 30 min		15 KV	

Polaridad normal (ánodo a cátodo)

A 25 y 30 °C

Soluciones utilizadas

1. Buffer de Boratos de concentración 20mM pH=11.1
2. Buffer de fosfatos 30mM y 20mM, pH = 7.01 y 2.04 respectivamente
3. Buffer de Tris-Boratos 5mM, SDS 50mM, Zn 3 mM y Urea 2 M, pH= 6.95
4. Buffer de SDS-Boratos 20-50 mM



8.5.3.2.- Método 2 (MEKC)

Inyección simple

Buffer

SDS –Boratos 50-20 mM

pH = 9.17

A 25 °C

Capilar Largo

L= 65 cm

l_{ef} = 50 cm

Proceso	Sustancia	Tiempo	Presión	Voltaje	Especificación
Lavado	H ₂ O _{di}	1 min	20 psi		
Llenado	Buffer	5 min	20 psi		
Inyección	Muestra	5 seg	0.5 psi		Hidrodinámica
Separación		30 min		15 KV	

Polaridad Normal

Inyección doble

Buffer

SDS -Boratos 50-20 mM

pH = 9.17

Marcador Neutro Óxido de Mesitilo 1 %

A 25 °C

Capilar Largo

L= 65 cm

l_{ef} = 50 cm

Proceso	Sustancia	Tiempo	Presión	Voltaje	Especificación
Lavado	H ₂ O _{di}	1 min	20 psi		
Llenado	Buffer	5 min	20 psi		
Inyección ₁	Marcador	1.5 seg	0.2 psi		Hidrodinámica
Inyección ₂	Muestra	5 seg	0.5 psi		Hidrodinámica
Separación		30 min		15 KV	

Polaridad Normal



8.5.3.3.- Método 3 (MEKC)

Inyección simple

Buffer

Colatos –Boratos 50-20 mM

pH = 9.15

A 25 °C

Capilar Corto

L= 50 cm

l_{ef} = 34 cm

Proceso	Sustancia	Tiempo	Presión	Voltaje	Especificación
Lavado	H ₂ O _{di}	1 min	20 psi		
Llenado	Buffer	5 min	20 psi		
Inyección	Muestra	5 seg	0.5 psi		Hidrodinámica
Separación		15 min		15 KV	

Polaridad normal

Inyección doble

Buffer

Colatos –Boratos 50-20 mM

pH = 9.15

Marcador Neutro Óxido de Mesitilo 1 %

A 25 °C

Capilar Largo

L= 50 cm

l_{ef} = 34 cm

Proceso	Sustancia	Tiempo	Presión	Voltaje	Especificación
Lavado	H ₂ O _{di}	1 min	20 psi		
Llenado	Buffer	5 min	20 psi		
Inyección ₁	Marcador	1.5 seg	0.2 psi		Hidrodinámica
Inyección ₂	Muestra	5 seg	0.5 psi		Hidrodinámica
Separación		15 min		15 KV	

Polaridad normal



8.5.3.4.- Método 4 (MEKC)

Inyección simple

Buffer

SDS –Boratos 50-20 mM

pH = 9.15

A 25 °C

Capilar Corto

L= 50 cm

l_{ef} = 34 cm

Proceso	Sustancia	Tiempo	Presión	Voltaje	Especificación
Lavado	H ₂ O _{di}	1 min	20 psi		
Llenado	Buffer	5 min	20 psi		
Inyección	Muestra	5 seg	0.5 psi		Hidrodinámica
Separación		15 min		15 KV	

Polaridad normal

Inyección doble

Buffer

SDS –Boratos 50-20 mM

pH = 9.15

Marcador Neutro Óxido de Mesitilo 1 %

A 25 °C

Capilar Largo

L= 50 cm

l_{ef} = 34 cm

Proceso	Sustancia	Tiempo	Presión	Voltaje	Especificación
Lavado	H ₂ O _{di}	1 min	20 psi		
Llenado	Buffer	5 min	20 psi		
Inyección ₁	Marcador	1.5 seg	0.2 psi		Hidrodinámica
Inyección ₂	Muestra	5 seg	0.5 psi		Hidrodinámica
Separación		15 min		15 KV	

Polaridad normal



9.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde el punto de vista histórico, inmunidad significa protección frente a la enfermedad y más específicamente frente a las infecciones. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario y la respuesta.

9.1.- Método 1 ECZ (Electroforesis Capilar de Zonas)

Para este estudio se utilizaron varios buffers y diferentes condiciones de corrida, utilizando primero las muestras de DLE H37RV y HSP56, los cuales contenían como aditivo una mezcla de Sacarosa y Glicina, por lo cual habría que utilizar un blanco cuya composición contuviera a estos dos, para realizar el descarte de picos, desafortunadamente los resultados no fueron tan satisfactorios, esto debido a dos factores importantes:

Él primero, es que los buffer no fueron los adecuados para las determinaciones y el segundo, fue la concentración a la que se encontraba el aditivo en las muestras, ya que está muy por encima, comparándola con la baja cantidad de DLE que contenía cada frasco.

Se pensó que como la sacarosa no es fácilmente detectable y con respecto a la glicina esta tampoco lo es, ya que requiere un detector de ultravioleta y no se utilizó sino uno de rearreglo de diodos, estos componentes del aditivo no



intervendrían en las corridas, pero desafortunadamente la concentración de estas sí lo que evito que se observara la presencia de algún pico durante las corridas.

Aunque las corridas que se realizaron no dicen mucho, hay dos buffer que fueron importantes; el primero de ellos fue el buffer de fosfatos de pH=7.01, en el cual se observó un pico como se muestra en la figura 10, con tiempos de migración de 7.6538 min.

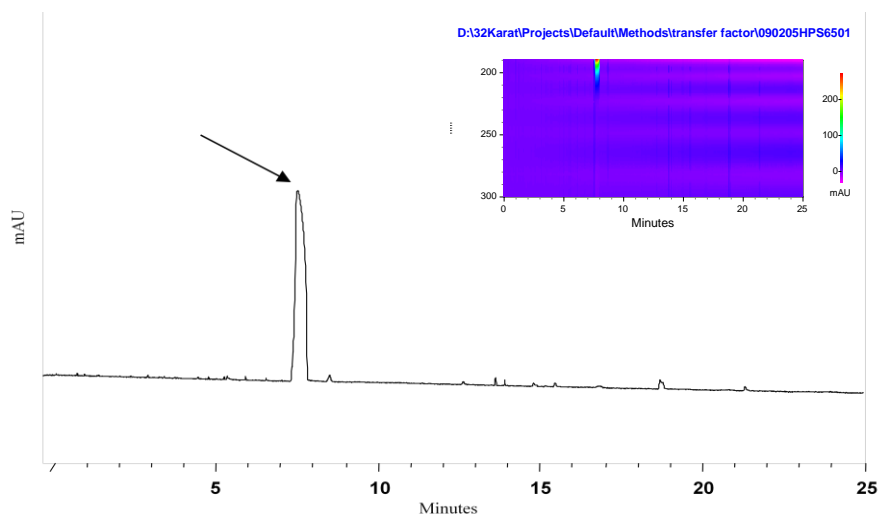


Figura 10. Electroferograma de la Muestra de HSP56. Método 1: Buffer Fosfatos, pH= 7.01, 8 min a 20 psi, muestra 5 seg a 0.5 psi, separar con voltaje de 15 kv por 25 min, polaridad normal, con detector de rearreglo de diodos.

También hay que observar el espectro de absorción correspondiente a este pico (Figura 11) como referencia, y se observa que su máximo de absorción esta en 191nm.

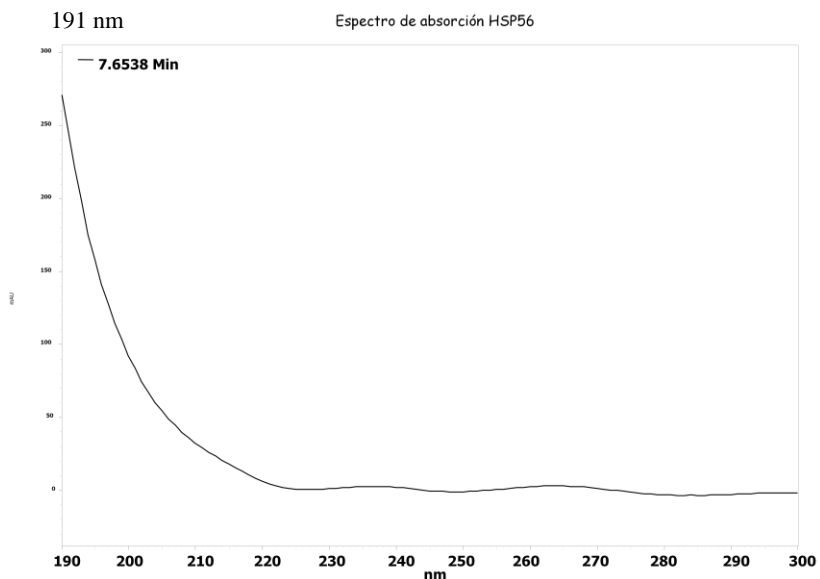


Figura 11. Espectro del tiempo 7.6538 de HSP56 con Buffer de fosfatos pH=7.01.

Posteriormente se realizó una corrida de Óxido de Mesitilo (Figura 12) y se obtuvo el siguiente electroferograma con fines de comparación y se encuentra incluido su espectro de absorción, cuyo máximo se encuentra a 242 nm.

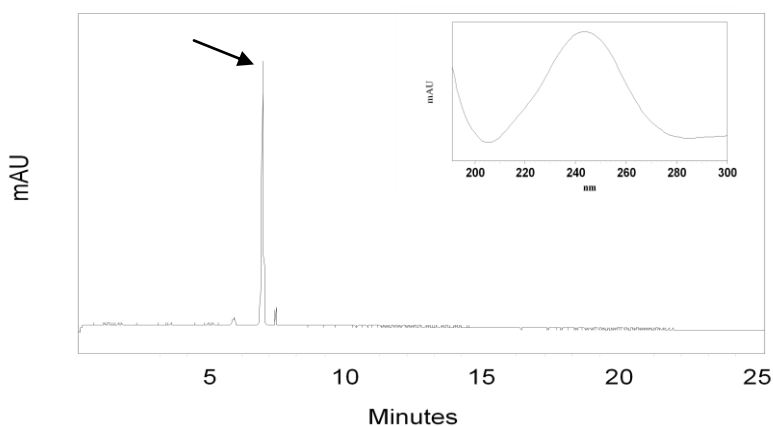


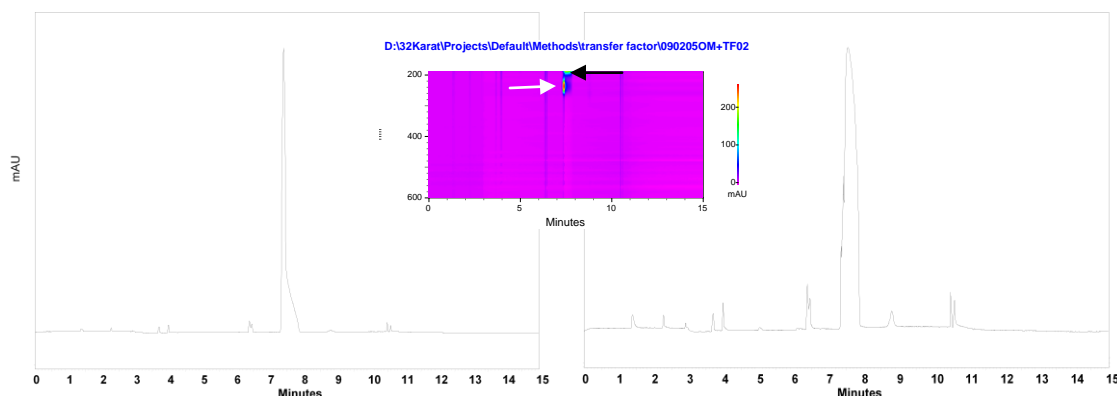
Figura 12. Electroferograma de la corrida del marcador neutro. Método 1: Buffer Fosfatos, pH= 7.01, buffer 8 min a 20 psi, muestra 3 seg a 0.5 psi, separar con voltaje de 15 kv por 25 min, polaridad normal, con detector de rearreglo de diodos y su espectro de absorción con λ_{\max} = 242 nm.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



Después se realizó una doble inyección con la muestra y el OM, es importante ver que el pico de la muestra sea muy próximo al del OM (Figura 13), lo cual nos indica que ese pico probablemente tenga una naturaleza neutra o muy cercana a la neutralidad.



$T_m = 7.42$ Correspondiente al OM que es el que sale primero a 242 nm.

$T_m = 7.65$ min Correspondiente a la Muestra, que sale poco después a 191 nm.

Figura 13. Electroferograma de la inyección doble de HSP56 y Om con Buffer de fosfatos pH=7.01.

Este electroferograma se corrió solo hasta los 15 min, esto para ahorrar tiempo y contiene un grafico de electroforesis y se aprecia cómo están sobre una misma zona ambos analitos, señalizados con una flecha cada uno.

Ahora, analizando los espectros de esta corrida (Figura 14), podemos observar como también se empalman los espectros de ambas muestras HSP56 y OM, teniendo los mismos máximos de 191 y 242 nm.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar

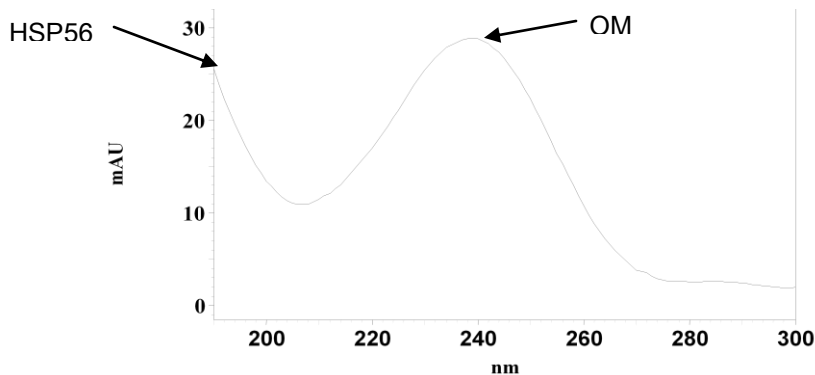


Figura 14. Espectro de la inyección doble de HSP56 y OM con Buffer de fosfatos pH=7.01.

Lo anterior dio la pauta para dejar de utilizar la ECZ, y utilizar buffers con un agente tensoactivo a una determinada concentración para la formación de micelas, especial para la separación de moléculas neutras, ya que el marcador neutro daría el indicio de la naturaleza iónica de los diferentes picos, así que ahora, lo que procedió fue hacer uso de MEKC para los métodos posteriores.

El otro buffer que dio algunos avances durante la evaluación por ECZ fue el Tris-Boratos 5mM, SDS 50mM, Zn 3mM, y Urea 2M pH= 6.95 especial para oligonucleótidos (Tomado de los manuales que venían con el equipo), ya que en este se comenzó a utilizar muestras de Balb sin el aditivo, el cual había evitado la observación de más picos (Figura 15).



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar

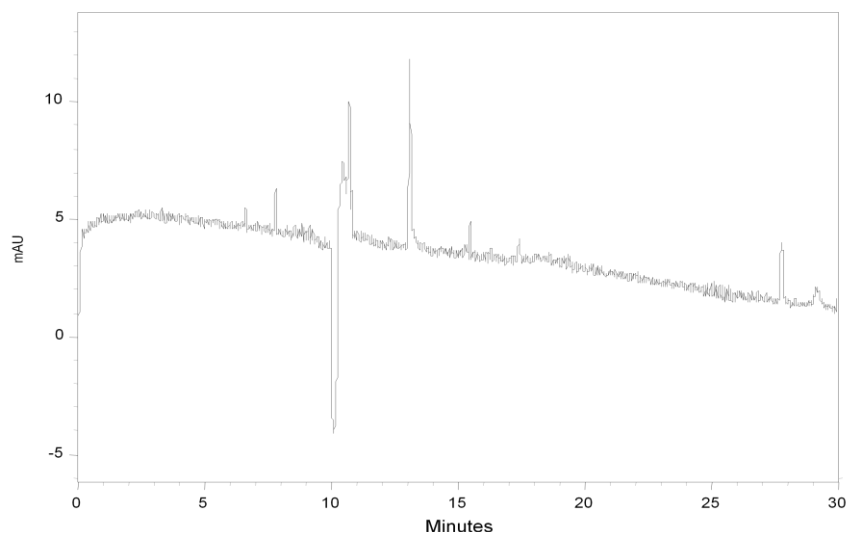


Figura 15. Electroferograma de la corrida de Balb. Método 1: Buffer para oligonucleótidos, pH= 6.95, 8 min a 20 psi, muestra 5 seg a 0.5 psi, separar con voltaje de 15 kv por 30 min, polaridad normal, con detector de rearreglo de diodos.

En el figura 16 se confirma lo de él aditivo, ya que aparecen más picos. Y estos son semejante a algunos encontrados más adelante por MEKC. Lo que después se realizó por ECZ, fue la utilización de muestras DLE sin aditivo con el buffer de fosfatos pH=7.01, y se aprecian los picos que no aparecieron en el electroferograma 1, como se muestra continuación y con una λ importantes entre 225 y 290.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar

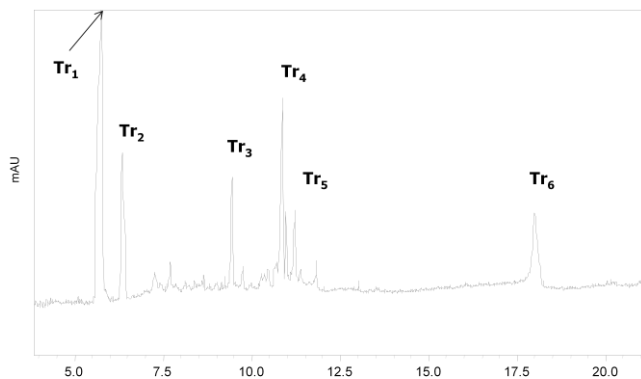


Figura 16. Electroferograma de la corrida de DLE s/aditivo. Método 1: Buffer Fosfatos, pH= 7.01, 8 min a 20 psi, muestra 5 seg a 0.5 psi, separar con voltaje de 15 KV por 25 min, polaridad normal, con detector de rearreglo de diodos

Por último se empleó un buffer de fosfatos pH=2.04 por la posible presencia de péptidos en las muestras, según la naturaleza química del TF, pero no se encontró la elución de ningún pico durante estas.



9.2.- MEKC (Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar)

El siguiente problema que se encontró fue, la baja cantidad de DLE en las muestras, por lo cual daba picos muy pequeños, por lo que se requería más de un bial de muestra para realizar una corrida, así que se procedió a obtener TF de bazo de cerdo de forma que no se tuviera que disolver como las muestras de ratón, así como muestras de calostro, en donde la cantidad de TF que se obtiene es mayor.

Esta técnica (MEKC) esta aplicada principalmente a la separación de compuestos neutros, aunque también se separan iones. En el caso de sustancias neutras, la separación está basada en las diferencias de interacción de los solutos entre una fase acuosa y una fase micelar (pseudoeestacionaria).

En esta técnica la fase móvil o acuosa es transportada por el flujo electrosmótico. La fase micelar es transportada por una combinación entre el EOF y la migración electroforética. Para el caso de las sustancias cargadas se basa en la interacción de los solutos con la fase acuosa y micelar, pero, también se basa en las diferencias de movilidades electroforéticas.

La eficiencia de la separación está determinada por las diferencias de interacción de los analitos con las dos fases, es decir, entre mayor diferencia de interacción exista entre los analitos la separación será mejor.



9.2.1.- Método 2

En la figura 17 se encuentran los controles a utilizar durante el proyecto, estos son el agua desionizada y libre de pirógenos y el buffer correspondiente de corrida, en este caso SDS-Boratos 50-20mM

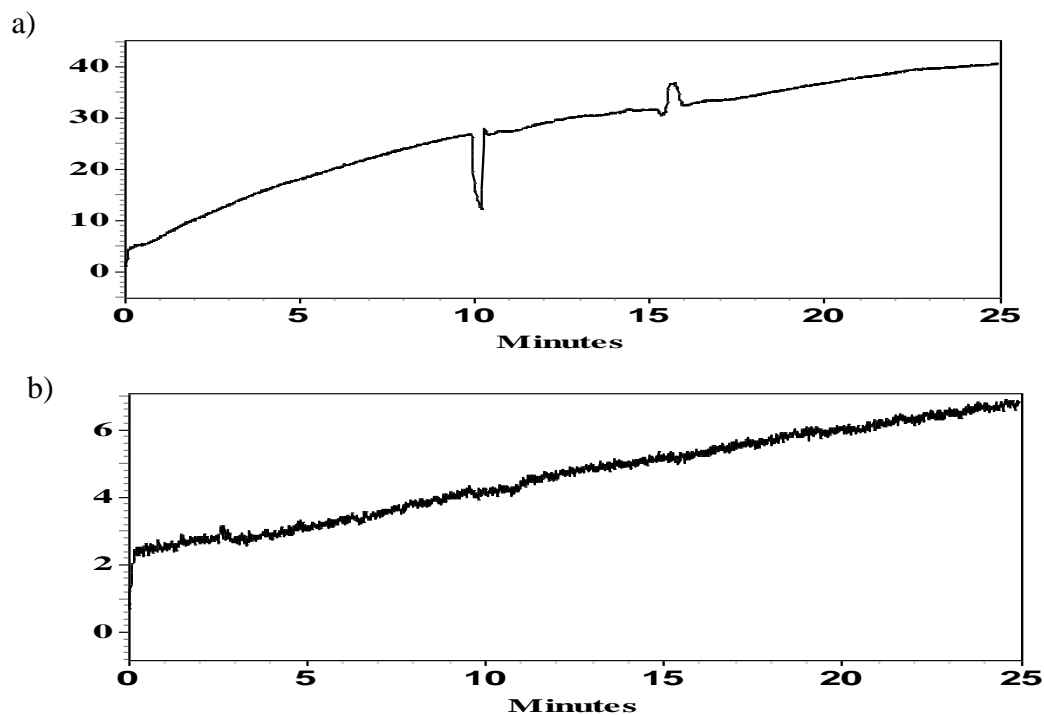


Figura 17. Electroferograma de la corrida controles a) Agua desionizada y b) Buffer de corrida SDS-Bo Método 2: Capilar de sílice fundida de 65 cm de longitud total y 50 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de SDS pH 9.17, 15 KV de voltaje aplicado durante 25 minutos a 215 nm.

En la figura 17 inciso a) se encuentra una señal negativa característica del agua con este buffer y en el b) no se observa ningún pico, por lo tanto, no hay ninguna señal que intervenga en las corridas del método 2, que se encuentra a continuación.



Hay un factor que se debe considerar que es el flujo del solvente dentro del capilar, que a su vez influye en la separación de las moléculas, llamado flujo electrosmótico (EOF), característico del fenómeno llamado electroósmosis, que está relacionada con una propiedad importante de los analitos en EC, conocida como constante de movilidad (μ_{efectiva}) (Rouessac, 2000, Dale, 1995, Skoog, 1995).

Dentro del capilar de sílice fundida, la superficie sólida se carga negativamente debido a la ionización de los grupos silanol. Los contra-iones de estos aniones forman una doble capa (éstos están presentes en el buffer), estos contra-iones son atraídos por las paredes del capilar, pero al mismo tiempo migran hacia el cátodo al generarse un campo eléctrico en la solución y dada su solvatación 'acarrear' en su movimiento al electrolito soporte y a los diferentes compuestos con ellos (Figuras 4 y 5). Este flujo de líquido que se origina bajo la presencia de un campo eléctrico, cuando una solución iónica está en contacto con una superficie sólida cargada, se denomina flujo electrosmótico (Rouessac, 2000, Dale, 1995, Skoog, 1995).

Debido a que las condiciones de corrida exigen que el capilar así como los biales en cada uno de sus extremos se llenen con un buffer, que sirve de medio conductor para el flujo de la corriente eléctrica, la diferencia de potencial impuesta entre los dos electrodos que generalmente son de platino permite la separación de los analitos cargados.



La muestra que está formada por un conjunto de aniones y cationes es introducida dentro de este sistema, ocupando así una sola franja o zona. Al someter este sistema a la acción de un campo eléctrico, las especies iónicas del electrolito y de la muestra migran hacia el electrodo correspondiente, es decir, se establece un movimiento de los iones que forman el sistema. A causa de la alta concentración del electrolito comparada con la de la muestra, algunas propiedades físicas como la conductancia serán influenciadas por el electrolito, pues la influencia de la muestra se hace despreciable.

Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los dos electrodos de platino separados por un medio conductor que es el buffer, el equilibrio de las velocidades electroforéticas de los iones de la muestra se alcanza en un periodo muy corto, con lo que se puede afirmar que las velocidades con las que se mueve cada molécula son constantes durante prácticamente todo el tiempo de análisis. Entonces la separación se da por las diferentes movilidades de los analitos, ya que cada ion tiene su propia constante de movilidad (μ_{efectiva}). [Khaledi, 1998; LI, 1992; Wher, 1999, Strege, 2004).

El EOF puede modificar la migración de los compuestos, por lo tanto, si se mueven a la misma dirección que los analitos, la velocidad de éstos será mayor, si por otro lado, se mueven en contra del EOF su velocidad será disminuida. Las moléculas neutras se moverán a la misma velocidad que el EOF y este hecho permite determinar experimentalmente la velocidad del EOF mediante la adición de un marcador neutro. Debido a que el EOF posee un perfil de flujo plano, éste



no contribuye de una forma significativa a la dispersión de las zonas de los componentes de la muestra (Rouessac, 2000)..

Por tal motivo, se realizaron estas determinaciones en las muestras de inyección doble, por medio de la formula:

$$\mu = \frac{L_i l}{V} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T_o} \right)$$

Donde:
Li = Longitud del capilar
l = Longitud efectiva
V = Voltaje
Tm = Tiempo de migración
To = Tiempo marcador neutro

----- (Formula 1)
(Rouessac, 2000)

En las tabla 1a I y 1a II se muestran los tiempos de migración de los diferentes analitos encontrados en estas corridas utilizando el método 2, (ver página 47), así como también, en la 1a II se encuentran los datos estadísticos de sus constantes de movilidad (En los anexos correspondientes se encuentran las constantes de movilidad individuales de cada tiempo obtenido). En el caso del Factor de bazo de cerdo, se utilizaron 3 corridas de las tabla 1a I para la elaboración del figura 18, para realizar la evaluación y comparación de los picos. Como se puede observar, el método quedo bien estandarizado, ya que las variaciones en los tiempos de elusión de cada pico son muy pequeñas, esto de acuerdo a los coeficientes de variación (**CV**) incluidos.



Cuando se realiza un análisis por medio de electroforesis capilar, se puede aceptar hasta un coeficiente de variación de 2 %, para muestras procedentes de un proceso estandarizado, donde las diferentes variantes para su producción están controladas, por ejemplo, en Medicamentos, aunque las muestras empleadas aquí también vienen de un proceso estandarizado, son muestras biológicas, procedentes de animales y en tales casos se puede ajustar el coeficiente de variación hasta un 15 %, para considerar las muestras como homogéneas (Farmacopea USA, 2003) .

En la gráfica 18 tenemos algunos picos importantes considerando sus absorbancias, estos son los No. 7 y 9 que absorben entre 110 y 130 μ AU y el No. 11 que absorbe 150 μ AU. Los demás picos están en un rango entre 5 y 70 μ AU. Aunque la absorbancia de los picos no es importante para este trabajo, pues no se puede determinar concentraciones, si lo es para tener un indicio de cuáles analitos de las diferentes muestras están en mayor cantidad.

El pico 8 no está bien definido lo cual indica que la diferencia de interacción de este analito con las dos fases del buffer respecto de los picos 6, 7 y 9 no es muy grande, pero no será descartado como analito ya que su λ máxima es muy importante de 258 nm.

En este electroferograma se puede apreciar que prácticamente las corridas son iguales y los componentes que eluyen son prácticamente los mismos; pero la importancia de éstos no lo es, pues muchos de ellos absorben de forma máxima;



de 190 a 200 nm, y esto no es de relevancia para el estudio desarrollado, pues podría tratarse de analitos de cualquier especie y no necesariamente componentes del TF incluido en el DLE; por lo cual serán descartados, aunque cabe mencionar, como se verá más adelante, que son parte de un patrón de comportamiento de las muestras del DLE y que llamaremos huellas digitales **(Patrón electroforético)**.

Muchos picos aumentan o disminuyen su intensidad según el software, ya que este expresa el electroferograma dependiendo la λ en que se posicione, por ello se escogió 215 nm, que es donde todos los analitos que eluyen, se pueden observar, inclusive los que no son de importancia, por la razón anteriormente mencionada. Por lo tanto, los picos seleccionados como posibles componentes del TF son: el 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13 y 15, correspondientes a la muestra sola de Factor de transferencia de cerdo (TFC) y cuyas λ son muy importantes, como se aprecia en la tabla 1a I.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar

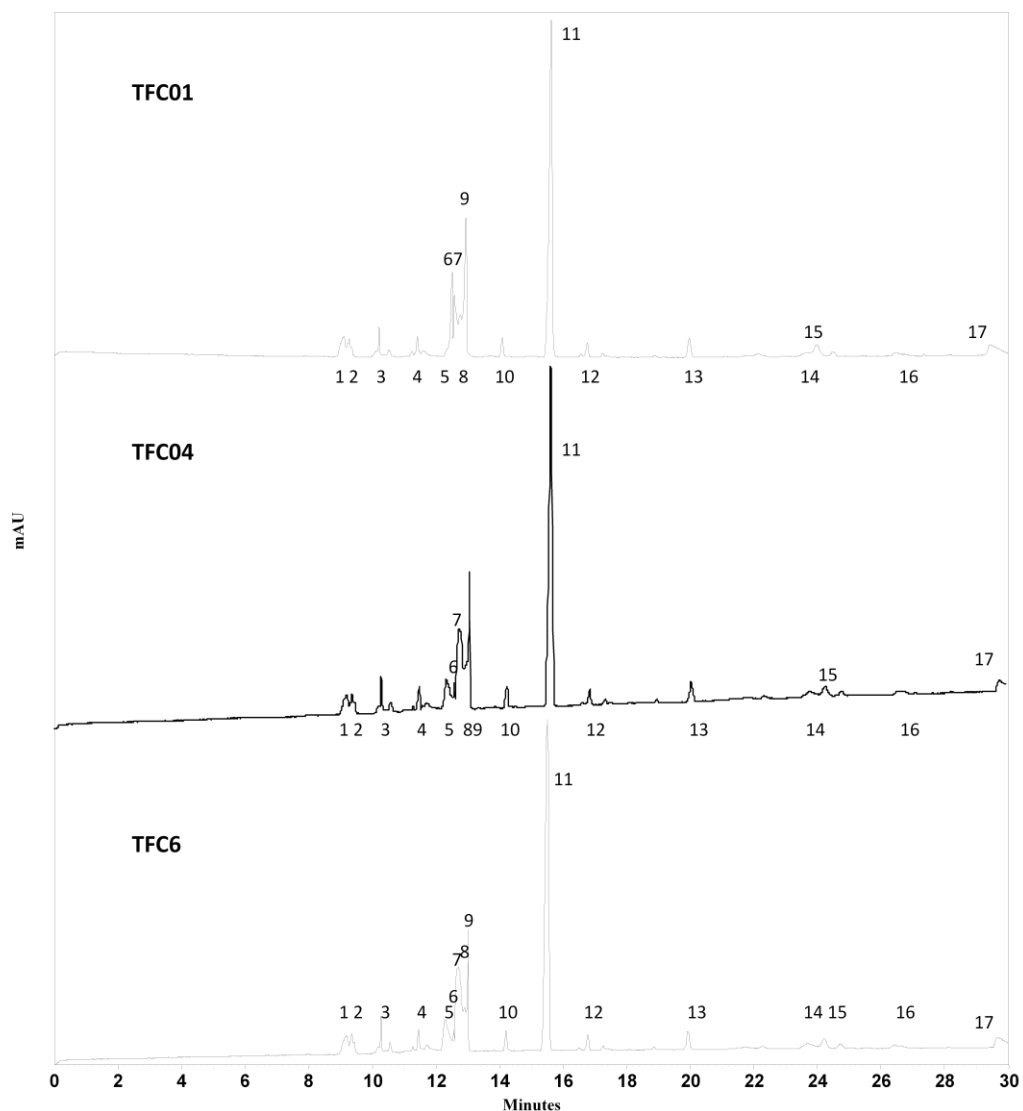


Figura 18. Electroferograma perteneciente a las muestras de TFC, a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 65 cm de longitud total y 50 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de SDS pH 9.17, 15 KV de voltaje aplicado durante 30 minutos.



Con respecto a los datos de la inyección doble de TFC y Óxido de Mesitilo (Om), los picos importantes son: 2, 3, 4 que pertenece al Om, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 y 15 que absorben a λ importantes (Tabla 1a II), donde está incluido el promedio de las movilidades efectivas (μ_x) de cada grupo de picos, ya que estas son características de cada uno y cuyos coeficientes de variación muestran la homogeneidad de estos, es decir, que las $\mu_{efectiva}$ son prácticamente las mismas en cada grupo de picos, lo que indica que se trata de los mismos analitos en cada grupo.

La figura 19 muestra estos picos, y su patrón es semejante al de la figura 18 e incluye una muestra de factor de cerdo sólo (inyección simple), como comparativo y se puede observar esta semejanza, mostrando también un **orden de salida** antes del marcador neutro y después de este, en otras palabras, lo que sale antes del marcador neutro son los cationes y después del marcador salen los aniones.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



TABLA No. 1a. MÉTODO 2.
Buffer de SDS [50mM] - BO [20mM]; pH=9.17; Voltaje de 15KV; Capilar Largo; Polaridad Normal

I	TF1	TF2	TF3	TF4	TF5	TF6	λ_{max}	X	δ_{xn}^{-1}	CV
1	9.1212	9.2332	9.1721	9.1571	9.2027	9.1959	198	9.18036	0.03909	0.42584
2	9.2795	9.3890	9.3290	9.3542	9.3077	9.3417	217	9.33351	0.03788	0.40594
3	10.2140	10.3103	10.2493	10.2227	10.2321	10.2656	270	10.2490	0.03531	0.34456
4	11.4134	11.4470	11.4200	11.4367	11.4221	11.4379	198	11.4295	0.01290	0.11292
5	No sale	12.3412	12.2662	12.3246	12.3021	12.2914	217	12.3051	0.02912	0.23670
6	12.5150	12.6231	12.5260	12.5377	12.5903	12.5421	190	12.5557	0.04192	0.33389
7	12.5854	12.7528	12.5713	12.6011	12.6845	12.5935	258	12.63143	0.07161	0.56692
8	12.7521	12.9690	12.8507	12.7827	12.9060	12.8769	217	12.85623	0.07987	0.62130
9	12.9323	13.0921	12.9796	12.9565	12.9733	13.0241	260	12.99298	0.05722	0.44041
10	14.0912	14.2598	14.1693	14.1230	14.2127	14.1937	190	14.17400	0.06118	0.43167
11	15.6254	15.6621	15.4696	15.6381	15.6291	15.4913	252	15.58593	0.08298	0.53243
12	16.5615	16.7087	16.7267	16.5777	16.6832	16.7388	223	16.66610	0.07722	0.46338
13	19.9623	20.0701	19.8734	20.0311	19.8823	19.8979	256	19.95285	0.08278	0.41491
14	23.5751	23.8236	23.6191	23.6314	23.7742	23.6456	190	23.67816	0.09770	0.41264
15	23.9852	24.3157	24.1619	24.2143	23.9947	24.1839	270	24.14261	0.12948	0.53633
16	26.4450	26.4139	26.3628	26.4937	26.3746	26.3717	200	26.41028	0.05136	0.19449
17	29.4506	29.7228	29.5865	29.4601	29.5674	29.6025	191	29.56498	0.10086	0.34115
	Om01	Om02	Om03	Om4	Om5	Om6	λ_{max}			
1	10.1750	9.8746	9.9067	10.2567	10.2068	10.1573	242			

Tabla 1a I. Tiempos de migración de las corridas de TF provenientes de Bazo de Cerdo, empleando buffer de SDS- BO pH=9.17 a 14 KV, así como también, sus valores estadísticos.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



TABLA No. 1a. MÉTODO 2.
 Buffer de SDS [50mM] - BO [20mM]; pH=9.17; Voltaje de 15KV; Capilar Largo; Polaridad Normal

II	TF-Om1	TF-Om2	TF-Om3	TF-Om4	TF-Om5	TF-Om6	λ_{max}	μ_x	$\delta_{\mu_x n^{-1}}$	CV_{μ_x}
1	9.1147	9.1131	9.1192	9.1215	9.1198	9.114	190	3.42902	0.01696	0.49475
2	9.2272	9.2266	9.2648	9.2682	9.2576	9.2471	217	3.09111	0.02524	0.81680
3	10.196	10.1952	10.1983	10.1937	10.1922	10.1904	270	0.91773	0.02618	2.85376
4 ^{OM}	10.6441	10.6343	10.662	10.6642	10.6663	10.6553	242			
5	11.3619	11.3615	11.3606	11.367	11.364	11.3561	190	-1.26630	0.02320	-1.83265
	No sale	No sale	No sale	No sale	No sale	No sale				
6	12.4156	12.4154	12.4119	12.414	12.4111	12.4091	190	-2.88094	0.02662	-0.92406
7	12.4978	12.4973	12.4968	12.4995	12.4927	12.4913	258	-2.99695	0.02566	-0.85631
8	12.721	12.7217	12.7205	12.7236	12.7219	12.7184	258	-3.30401	0.02402	-0.72723
9	12.8346	12.834	12.8393	12.8398	12.8345	12.8326	260	-3.45609	0.02252	-0.65178
10	14.0535	14.0435	14.0582	14.0637	14.0455	14.0184	190	-4.91169	0.02688	-0.54735
11	15.1936	15.1928	15.1943	15.1956	15.1884	15.18	252	-6.07293	0.02534	-0.41738
12	16.4806	16.4793	16.765	16.5087	16.4889	16.4768	223	-7.23052	0.08399	-1.16163
13	19.5235	19.5227	19.5407	19.548	19.534	19.5232	256	-9.24307	0.02006	-0.21707
14	23.1499	23.1369	23.1832	23.1873	23.1721	23.1629	190	-10.98292	0.01709	-0.15568
15	23.8827	23.8361	23.9215	23.9236	23.9163	23.8971	270	-11.26896	0.01246	-0.11057
16	25.8305	25.8256	25.8169	25.8181	25.8133	25.8114	190	-11.94431	0.02609	-0.21849
17	29.1049	29.0659	29.141	29.1426	29.1363	29.1176	190	-12.89498	0.01704	-0.13218

Tabla 1a II. Tiempos de migración de las corridas de la inyección doble de TF provenientes de Bazo de Cerdo y el marcador neutro, con buffer de SDS-Boratos, así como también, los valores estadísticos de sus $\mu_{efectiva}$.

Nota. Los valores completos de las constantes de movilidad efectiva de cada pico se encuentra en el Anexo A.

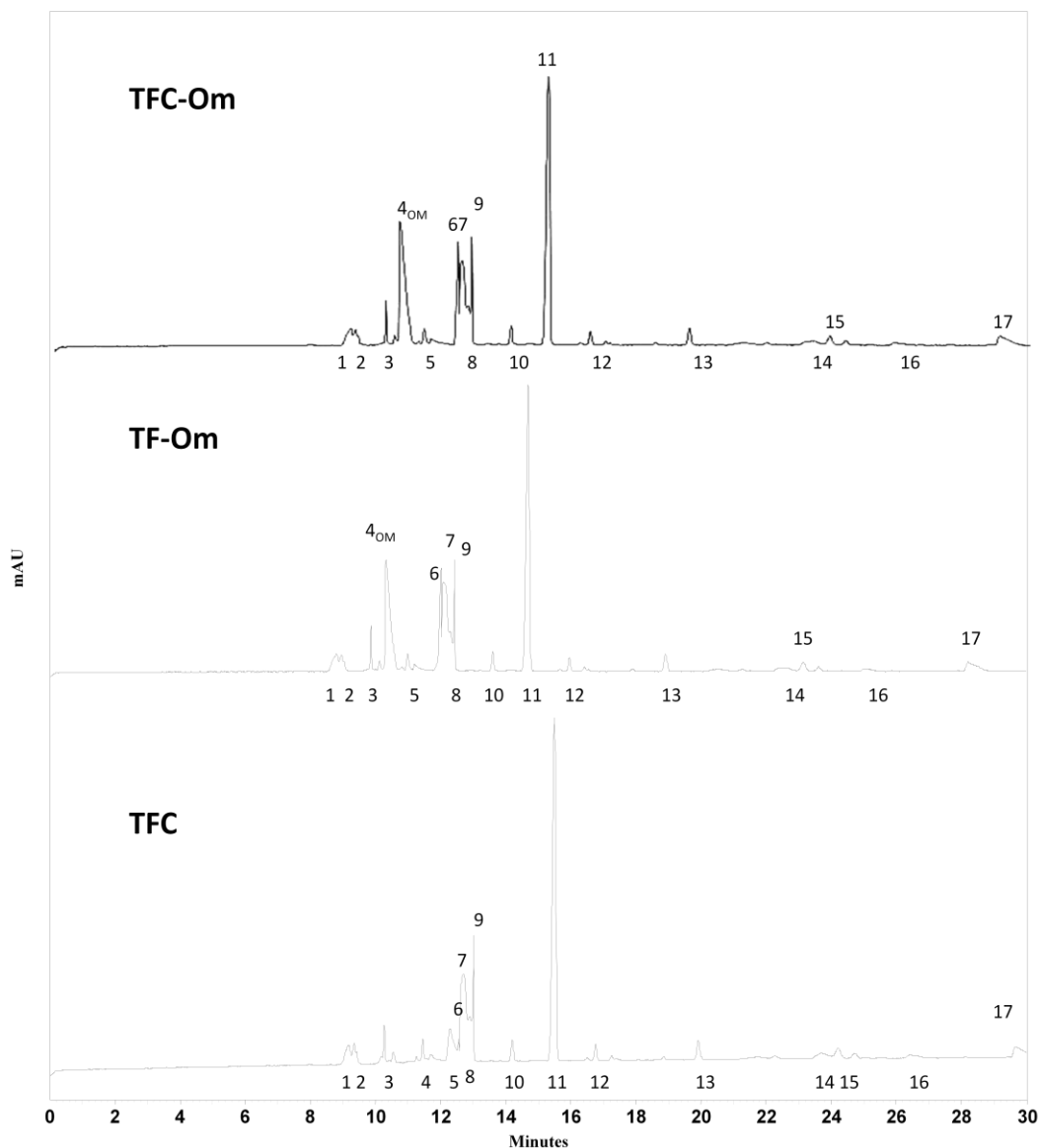


Figura 19. Electroferograma pertenecientes a las muestras de TFC-OM y TFC, a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 65 cm de longitud total y 50 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de SDS pH 9.17, 15 KV de voltaje aplicado durante 30 minutos.

Los coeficientes de variación de las muestras de inyección doble confirman el que cada grupo de picos son los mismos y el que muestra la figura 19 también.



Siguiendo con las diferentes muestras, se tomaron las corridas de Calostro y Calostro-OM para elaborar al figura 20, que como en los dos electroferogramas anteriores, las variaciones entre los picos obtenidos son muy pequeñas, tanto en las muestras solas con los tiempos de migración y las de la inyección doble con la μ_{efectiva} y se puede observar con los CV respectivos en la tabla **1b I** y **1b II**.

Al igual que ocurre con la muestra de TFC también hay picos cuyas λ son representativas en este trabajo y son: 2, 4, 5, 7, 8 y 10 de la muestra sola y el 3_{Om} , 5, 6, 8, 9 y 11 para la inyección doble.

Se hace mucho énfasis acerca de la longitud de onda de los diferentes analitos en cada muestra, por la naturaleza del **Factor de Transferencia** reportada en los diferentes estudios realizados a nivel mundial, y cuya composición está formada por Péptidos y Oligonucleótido, por lo que longitudes de onda menores a 258-260 nm, tienen que ser descartados como componentes del **Factor de Transferencia (TF)** y su relevancia radica solo en ser parte del **Extracto Dializable de Leucocitos (DLE)** y del patrón de salida de las muestras, es decir, de las huellas digitales encontradas.

Con ambas muestras TFC y Calostro hay que recordar que son muestras concentradas en comparación con las de ratón, y los picos más grandes daban lecturas de hasta 200 μAU (micro unidades de absorbancia).



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



TABLA No. 1b. MÉTODO 2.
Buffer de SDS [50mM] - BO [20mM]; pH=9.17; Voltaje de 15KV; Capilar Largo; Polaridad Normal

I	Cal01	Cal02	Cal03	Cal04	Cal05	Cal06	λ_{max}	X	δ_{Xn}^{-1}	CV
1	8.0540	8.0627	8.0150	8.0101	8.0227	8.0180	190	8.03041	0.02219	0.27635
2	9.1640	9.1718	9.1094	9.1205	9.1420	9.1264	268	9.13901	0.02484	0.27188
3	10.5390	10.5510	10.4393	10.4554	10.4627	10.4480	198	10.48256	0.04912	0.46865
4	10.8544	10.9106	10.8237	10.8250	10.8512	10.8319	252	10.84946	0.03266	0.30109
5	11.1765	11.2122	11.1334	11.1253	11.1327	11.1257	263	11.15096	0.03561	0.31935
6	12.1345	12.1497	12.0486	12.0528	12.1216	12.1032	190	12.10173	0.04240	0.35036
7	14.3564	14.4182	14.3215	14.2871	14.3014	14.2846	224	14.32820	0.05147	0.35925
8	16.561	16.6117	16.5037	16.5485	16.5719	16.5514	253	16.55803	0.03512	0.21212
9	18.8709	18.9673	18.8121	18.8357	18.9371	18.8740	191	18.88285	0.05920	0.31352
10	21.4789	21.5100	21.3506	21.6030	21.6089	21.5633	260	21.51911	0.09710	0.45125
II	Cal-Om1	Cal-Om2	Cal-Om3	Cal-Om4	Cal-Om5	Cal-Om6	λ_{max}	μ_x	$\delta_{\mu_x n}^{-1}$	CV $_{\mu_x}$
1	8.0716	8.0826	8.0737	8.0555	8.0701	8.0596	190	4.04936	0.03573	0.88254
2	9.1309	9.1385	9.1225	9.1237	9.1337	9.1287	268	0.92925	0.02318	2.49498
3 ^{OM}	9.5031	9.5048	9.5039	9.502	9.4903	9.0	242			
4	10.478	10.476	10.4633	10.4554	10.4723	10.4698	198	-2.10729	0.02255	-1.07028
5	10.801	10.807	10.7965	10.7845	10.7989	10.789	252	-2.73397	0.02174	-0.79521
6	11.141	11.139	11.1307	11.1257	11.1357	11.1341	262	-3.34351	0.01710	-0.51171
7	12.094	12.086	12.0549	12.0469	12.0833	12.0785	190	-4.85767	0.03254	-0.66996
8	14.307	14.297	14.2005	14.1845	14.2137	14.2064	224	-7.58197	0.05552	-0.73228
9	16.575	16.574	16.1103	16.1087	16.4571	16.3125	254	-9.55427	0.17652	-1.84760
10	18.92	18.919	18.2111	18.2066	18.3486	18.2174	191	-11.06895	0.21937	-1.98191
11	21.506	21.502	21.3037	21.2176	21.2716	21.2952	260	-12.65397	0.05543	-0.43810

Tabla 1b I. Tiempos de migración de las corridas de Calostro provenientes de glioma, así como también, **1b II** con la inyección de estas y el marcador neutro, con buffer de SDS-Boratos, incluyendo los valores estadísticos de SUS $\mu_{efectiva}$.

Nota. Los valores completos de las constantes de movilidad efectiva de cada pico se encuentra en el Anexo A.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



TABLA No. 1c. MÉTODO 2.
Buffer de SDS [50mM] - BO [20mM]; pH=9.17; Voltaje de 15KV; Capilar Largo; Polaridad Normal

I	Balb1	Balb2	Balb3	Balb4	Balb5	Balb6	λ_{max}	X	$\delta_{Xn^{-1}}$	CV
	8.5416	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale				
1	10.6183	10.6204	10.6160	10.6170	10.6152	10.6146	190	10.61691	0.0021	0.02029
2	10.8441	10.8553	10.7430	10.8315	10.7243	10.8265	198	10.80411	0.05581	0.51658
3	11.0751	11.0754	11.0704	11.0686	11.0675	11.0454	256	11.06706	0.01110	0.10038
4	12.5004	12.4973	12.4954	12.4956	12.4824	12.4822	200	12.49058	0.00759	0.06080
5	13.2943	13.2673	13.2738	13.2875	13.2632	13.2715	252	13.27626	0.01209	0.09109
6	15.0209	15.0207	15.0280	15.0365	15.0375	15.0310	266	15.02910	0.00732	0.04870
	15.8637	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale				
7	18.9275	19.0434	18.6244	18.9096	19.0686	18.8945	266	18.91133	0.15814	0.83625
8	19.4053	19.5600	19.4068	19.5321	19.5473	19.4945	268	19.49100	0.06937	0.35594
9	21.6058	21.7314	21.5739	21.6005	21.7176	21.5976	266	21.63780	0.06818	0.31510
II	Balb-Om1	Balb-Om2	Balb-Om3	Balb-Om4	Balb-Om5	Balb-Om6	λ_{max}	μ_X	$\delta_{\mu_X n^{-1}}$	CV_{μ_X}
	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale				
1 ^{OM}	9.5883	9.581	9.5924	9.5956	9.5943	9.5873	242			
2	10.5842	10.5823	10.5983	10.6068	10.5967	10.5835	190	-2.13764	0.01008	-0.47175
3	10.8252	10.8165	10.9364	10.8575	10.8354	10.8565	198	-2.63230	0.07455	-2.83234
4	11.0963	11.0935	11.1175	11.1783	11.1286	11.1684	256	-3.12709	0.05689	-1.81942
5	12.5008	12.4986	12.6243	12.7062	12.6267	12.5657	200	-5.37936	0.09975	-1.85433
6	13.1814	13.1789	13.2176	13.3456	13.2245	13.2046	252	-6.21054	0.06738	-1.08493
7	14.9697	14.9632	15.1627	15.2692	15.1965	14.9354	268	-8.22716	0.12546	-1.52498
	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale				
8	19.0059	19.0015	19.1852	19.3746	19.2054	19.4154	266	-11.30672	0.09705	-0.85840
9	19.5265	19.5169	19.9845	19.8535	19.9935	19.5374	268	-11.61354	0.11954	-1.02936
10	21.7107	21.7076	22.1745	21.9935	21.1765	21.7385	266	-12.62980	0.15633	-1.23785

Tabla 1c I. Tiempos de migración (Tm) de los diferentes picos de los balb y sus datos estadísticos, así como también, la **1c II** con la inyección doble de estas y el marcador neutro. Incluyendo la estadística de sus movilidades efectivas.

Nota. Los valores completos de las constantes de movilidad efectiva de cada pico se encuentra en el Anexo A.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucocitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar

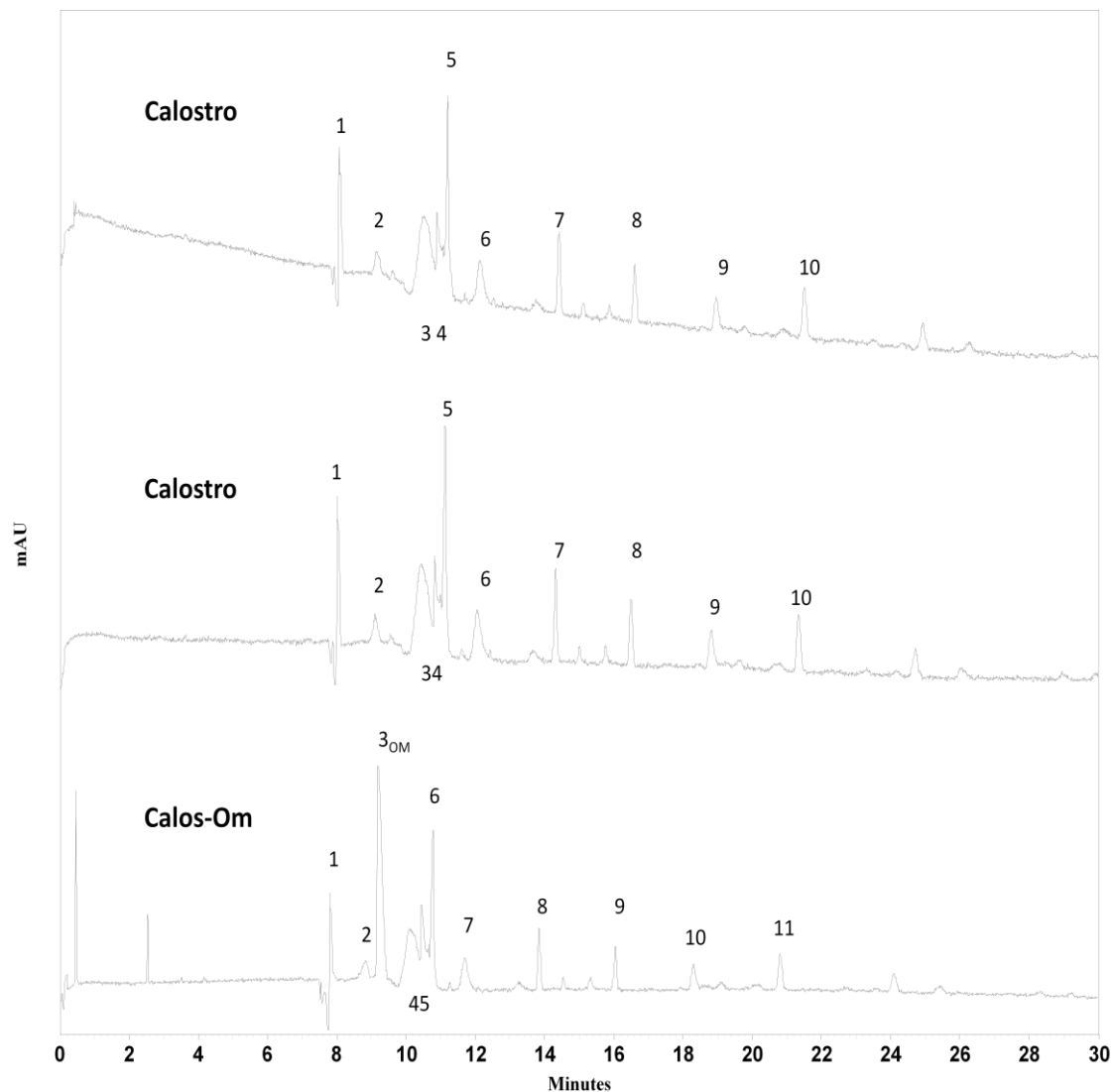


Figura 20. Electroferograma perteneciente a las muestras de Calostro y Calostro-OM, a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 65 cm de longitud total y 50 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de SDS pH 9.17, 15 KV de voltaje aplicado durante 30 minutos.



Las últimas corridas desarrolladas en esta parte del proyecto, fueron las de ratón sin aditivo, los datos de la figura 21, se encuentran ubicados en las tablas 1c I y II. Los picos importantes de esta muestra son 1, 3, 5, 6, 7, 8 y 9; y de la inyección doble: 1 correspondiente al Om, 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 10.

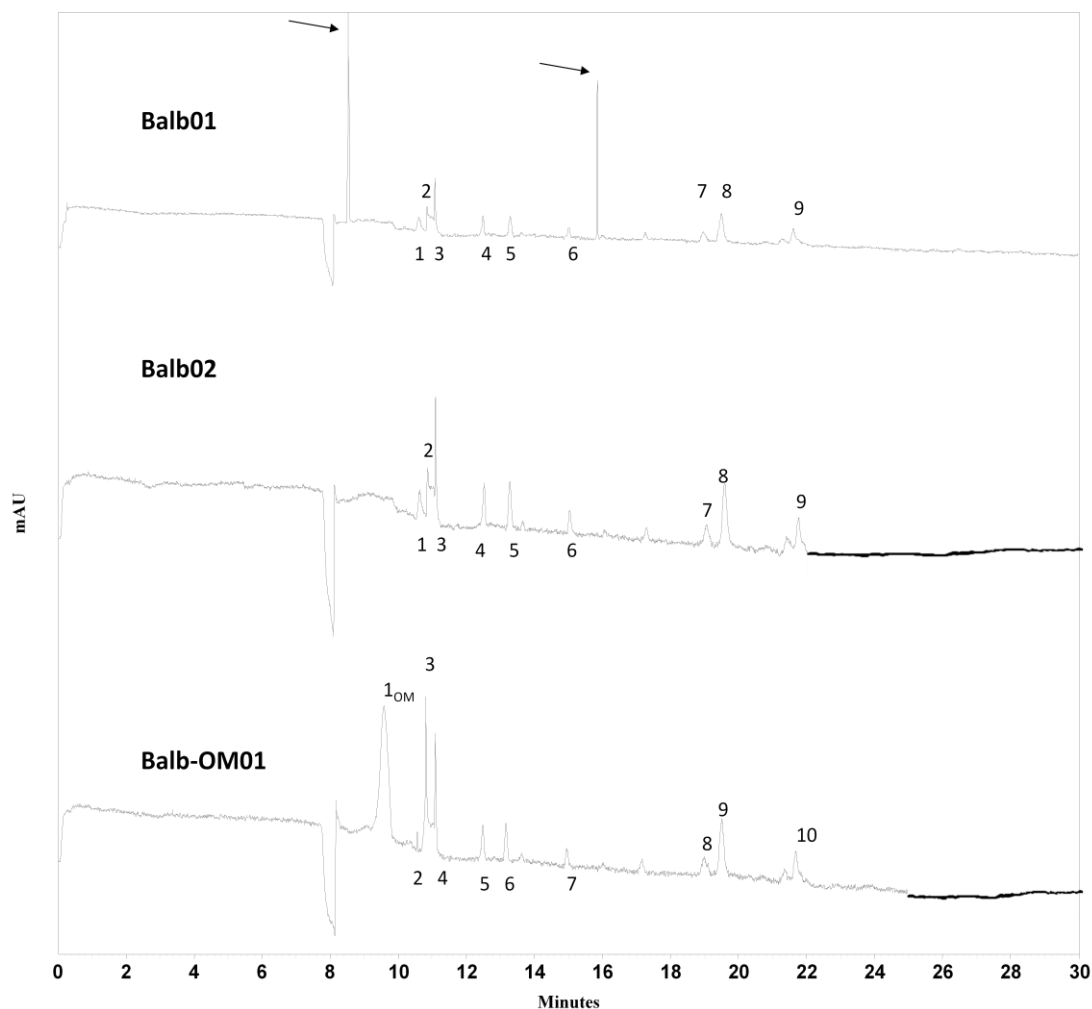


Figura 21. Electroferograma perteneciente a las muestras de Balb y Balb -OM, a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 65 cm de longitud total y 50 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de SDS pH 9.17, 15 KV de voltaje aplicado durante 30 minutos.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucocitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



En este se muestra, que en la primera corrida está eluyendo un pico poco después de los 8 minutos, pero en las siguientes corridas ya no aparece, por lo tanto no se toma en cuenta y después del pico 6 encontramos otro que de igual manera es eliminado. Por lo que respecta a los demás picos e igual que los electroferogramas anteriores las diferencias son mínimas y se consideran T_m próximos entre las muestras e igual con las constantes de movilidad y se emplea la misma analogía que los dos anteriores.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucocitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar

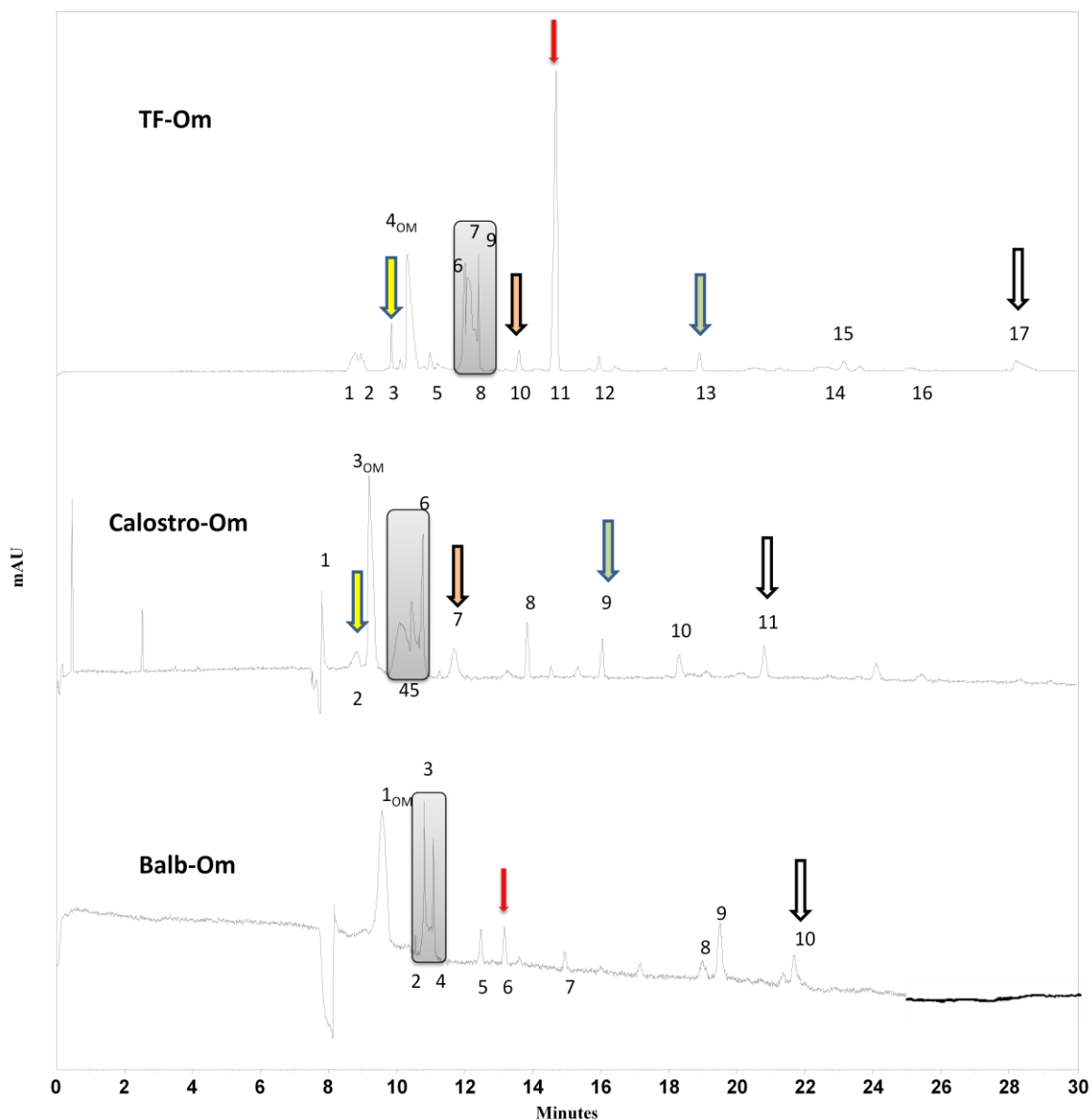


Figura 22. Electroferograma comparativo entre las muestras del método 2 y el OM, a una longitud de onda de 215 nm, Los solutos que eluyen y tienen indicativos del mismo color y forma, representan a aquellos que son iguales según arrojan los datos de la tabla 1e. Condiciones: capilar de sílice fundida de 65 cm de longitud total y 50 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de SDS pH 9.17, 15 KV de voltaje aplicado durante 30 minutos.



En la figura 22 se encuentran las diferentes muestras utilizadas, para realizar el comparativo entre ellas y se puede observar que los tiempos de migración si difieren entre los diferentes picos de las muestras, pero se encontró un patrón común entre ellas, este patrón está ubicado antes y después del OM.

Este patrón está señalado por las flechas de colores, en primer lugar, está un pico de $\lambda_{Max} = 270$ y 268 nm y que solo se encontró en las muestras de TFC y Calostro, después un grupo de 3 picos en el rectángulo, se puede apreciar un patrón de salida igual en las 3 muestras, pero más adelante en la **tabla 1e** se encontrará que no es así, hay pequeñas variaciones que indican que no son iguales en las 3 muestras, seguidas por los picos 7 y 10 para Calostro y TFC respectivamente, se puede asumir de algunos, que se trata de los mismos componentes (ver tabla 1e), posteriormente se encuentra el componente más grande en cuestión de unidades de absorbancia y también está presente en la muestra de ratón Balb y el último pico de las tres muestras también es el mismo según indica la tabla 1e, a pesar de la diferencia de T_m el patrón de salida es igual lo que de aquí en adelante denominaremos huellas digitales. Es importante mencionar de la muestra de TFC, el pico 8 no se encuentra en las otras muestras, este no está bien definido, pero será considerado como componente, debido a que su longitud de onda máxima es de 258 nm por lo que es importante.

También se comparan las diferentes μ efectivas y a continuación se encuentran los resultados de estos cálculos con la fórmula 1, expresados en 3 tablas correspondientes a las muestras evaluadas por medio del método 2; **tabla**



1d, en donde se encuentran las medias (Tm_x) de los respectivos Tm de cada pico expuestos en las tablas anteriores, y estos valores corresponden al término Tm de la formula anterior.

TFC				Calostro			
	Tm_x	μ_x	CV_{μ_x}		Tm_x	μ_x	CV_{μ_x}
1	9.11705	3.42902	0.49475	1	8.06885	4.04936	0.88254
2	9.24858	3.09111	0.81680	2	9.12966	0.92925	2.49498
3	10.19430	0.91773	2.85376	3^{Om}	9.50171	0	
4^{Om}	10.65436	0		4	10.46921	-2.10729	-1.07028
5	11.36185	-1.26630	-1.83265	5	10.79613	-2.73397	-0.79521
6	12.41285	-2.88094	-0.92406	6	11.13430	-3.34351	-0.51171
7	12.49590	-2.99695	-0.85631	7	12.07380	-4.85767	-0.66996
8	12.72118	-3.30401	-0.72723	8	14.23495	-7.58197	-0.73228
9	12.83580	-3.45609	-0.65178	9	16.35623	-9.55427	-1.84760
10	14.04713	-4.91169	-0.54735	10	18.47046	-11.06895	-1.98191
11	15.19078	-6.07293	-0.41738	11	21.34931	-12.65397	-0.43810
12	16.53321	-7.23052	-1.16163	Balb			
13	19.53201	-9.24307	-0.21707	C	Tm_x	μ_x	CV_{μ_x}
14	23.16538	-10.98292	-0.15568	1^{Om}	9.58981		
15	23.89621	-11.26896	-0.11057	2	10.59196	-2.13764	-0.47175
16	25.81930	-11.94431	-0.21849	3	10.85458	-2.63230	-2.83234
17	29.11805	-12.89498	-0.13218	4	11.13043	-3.12709	-1.81942
				5	12.58705	-5.37936	-1.85433
				6	13.22543	-6.21054	-1.08493
				7	15.08278	-8.22716	-1.52498
				8	19.19800	-11.30672	-0.85840
				9	19.73538	-11.61354	-1.02936
				10	21.75021	-12.62980	-1.23785

Tabla 1d (A-C). Resumen de los tiempos de migración promedio (Tm_x) y el **CV** de sus $\mu_{efectiva}$ promedio (μ_x), de las diferentes muestras usadas en el método 2.

Estos resultados confirman lo que se mencionó anteriormente con relación al orden de salida de los analitos, pues aquellos que tengan una μ_x positiva salen antes del Om y son iones de tipo catiónico y por el contrario los analitos con μ_x negativa salen después del marcador neutro cuya μ_x es cero, y son aniones. Esto es de gran importancia, ya que los diferentes estudios sobre TF indican que está compuesto de oligonucleótidos y de péptidos, por lo tanto, los analitos podrían



tener esa naturaleza. Por ello las λ de estos son importantes, los oligonucleótidos se detectan a partir de 260 nm y las péptidos a partir de los 254 y 280nm. [Sudhir, A. 1994; Dale, R. 1995]

De ser los analitos de estas naturalezas, tendrían un orden de elusión, en primer lugar los cationes (oligonucleótidos), seguidos de las moléculas neutras (Om) y finalmente los aniones (Péptidos). En la tabla siguiente (**Tabla 1e**) se encuentran los datos que relacionan la similitud de picos representativos entre todas las muestras con inyección doble, se uso la $\mu_{efectiva}$ promedio (μ_x) de estos, para verificar lo que se encuentra en la figura 22, y se realizaron otras determinaciones estadísticas con estas $\mu_{efectivas}$, para obtener los coeficientes de variación y ver si se trata de los mismos picos.

No.	Mtras	TFC	Calostro	Balb	CV_{μ_x}	λ (nm)	Similares
	Picos	$\mu_{efectiva}$ x					
1	3-2-x	0.91773	0.92925	-----	0.88207	270-268-x	✓
2	x-4-2		-2.10729	-2.13764	-1.01112	x-198-190	✓ *
3	x-5.3	-----	-2.73397	-2.63230	-2.67938	x-252-256	✓
4	9-6-x	-3.45609	-3.34351		-2.34149	260-262-x	✓
5	10-7-x	-4.91169	-4.85767		-0.78199	190-190-x	✓ *
6	11-x-6	-6.07293	-----	-6.21054	-1.58432	252-x-252	✓
7	12-8-x	-7.23052	-7.58197	-----	-3.35544	223-224-x	X
8	13-9-x	-9.24307	-9.55427	-----	-2.34130	256-254-x	✓
9	x-10-8	-----	-11.06895	-11.61354	-3.39542	x-190-266	X
10	17-11-10	12.89498	-12.65397	-12.62980	-1.15217	-260-266	✓

Tabla 1e. Valores de migración efectiva obtenidos de los picos semejantes del método 2. Utilizando las movilidades efectivas promedio de los diferentes picos



Efectivamente muchos de los analitos que eluyen de las diferentes muestras parecen ser los mismos, esto en base no solo observando la figura 22, en la cual claramente se aprecia un patrón similar de picos, también se empleó su constante de movilidad efectiva, así como, la longitud de onda máxima y muestra que la mayoría son muy similares (tabla 1e). A excepción del No. 9 de la tabla que no podría tratarse de los mismos picos, ya que sus λ difieren mucho entre ellas, los demás se puede decir que si lo son, pero los que tienen este símbolo (★) y cuyas λ no son importantes, son parte de las huellas digitales; siendo parte del DLE, pero no podrían ser ni péptidos ni oligonucleótidos, pues estos como se menciona anteriormente absorben entre 254, 280 y 260 nm respectivamente.

Aunque hay que recordar algo importante acerca del método establecido, y es que se empleo por la presencia de un analito neutro, encontrado durante la evaluación con el método 1, por ello se empleo MEKC, pero este también puede ser usado para separar compuestos ionizados y por ello, también se pueden separar péptidos largos [Dale, 1995].

Sin embargo esté no es un método específico para determinar ni péptidos ni oligonucleótidos, para ello existen otros más específicos, Electroforesis capilar en gel (ECG) para oligonucleótidos y también para péptidos y proteínas [Dale, 1995], que no se emplearon en este proyecto, y al final serán considerados como posibles alternativas o mejoras de este trabajo.



9.2.2.- Método 3

Había que solucionar el siguiente problema que se presentaba, este era la cantidad de tiempo que se requería para correr las muestras y el uso de otro formador de micelas, por lo que se requirió elaborar otro método. Se optó por un capilar más corto (50 cm y 34 cm de longitud efectiva) para recortar el tiempo de elución de los componentes de la muestra y el uso de Colatos como formador de micelas en lugar de SDS.

En este método se empleará el mismo proceso de análisis del anterior, empleando las longitudes de onda máximas en que absorban los analitos, posteriormente, se tomarán en cuenta las movilidades efectivas de cada analito, y se realizará un comparativo de estas, para determinar la semejanza entre los componentes entre las diferentes muestras, se calcularán CV de las movilidades efectivas promedio (μ_x) y se buscará la presencia de huellas digitales.

En la siguiente figura 23 se encuentran 3 diferentes muestras de OM, el primero es una disolución en agua de OM a 215 nm, la segunda esta disuelta en Buffer de Boratos-Colatos y se aprecia que no hay diferencias entre ambas y por último está una corrida pero a 242 nm, que es la longitud del onda máxima (λ_{max}) del OM. También está incluido el espectro de absorción del marcador neutro, que será empleado posteriormente para el análisis del pico 1 de las muestras de la figura 24, correspondiente a la corrida de Calostro de Glioma.



Después de la salida del marcador neutro se puede apreciar un pico inverso, que al igual que en el método anterior es característico del agua, considerando que se cambio el formador de micelas y este comportamiento del agua sigue apareciendo, indica que en MEKC esto aparece comúnmente. Más adelante en la figura 26 se podrá apreciar esto y también en la figura 27 se encuentra el comportamiento del buffer.

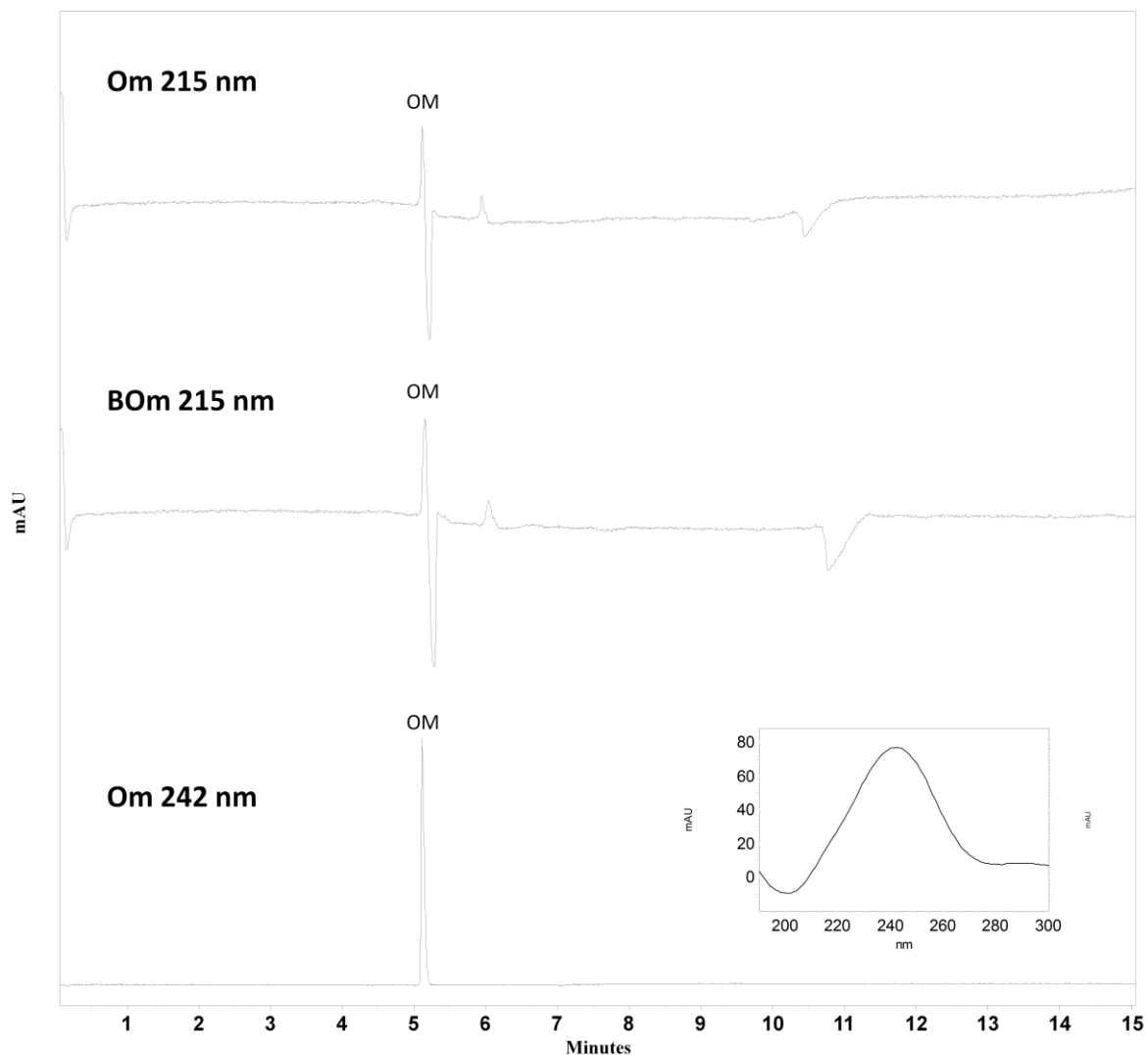


Figura 23. Electroferograma comparativo entre el OM a diferentes λ , Condiciones: capilar de sílice fundida de 50 cm de longitud total y 34 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de Colatos pH 9.15, 15 KV de voltaje aplicado durante 15 minutos.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



TABLA No. 2a. MÉTODO 3.
Buffer de Colatos [50mM] - BO [20mM]; pH=9.15; Voltaje de 15KV; Capilar Corto; Polaridad Normal

I	Calos1	Calos2	BCalos1	Calos4	Calos5	Calos6	λ_{max}	X	$\delta_{\chi n^{-1}}$	CV
1	4.9181	4.9417	4.9476	4.9480	4.9483	4.9342	190	4.93965	0.01188	0.24056
2	5.7456	5.7744	5.9431	5.9487	5.9491	5.7646	191	5.85425	0.10200	1.74248
3	6.3178	6.3403	6.4976	6.5023	6.5075	6.3364	263	6.41698	0.09400	1.46490
4	6.9271	6.9609	7.0342	7.0357	7.0423	6.9436	190	6.99063	0.05240	0.74963
5	8.0981	8.1362	8.2971	8.3045	8.3337	8.1298	224	8.21656	0.10579	1.28754
6	8.5275	8.5790	8.5435	8.5461	8.5387	8.5742	268	8.55150	0.02051	0.23991
7	9.3538	9.4331	9.6335	9.6364	9.6572	8.5564	235	9.54506	0.12488	1.30839
8	11.9318	12.0520	12.2726	12.2765	12.2976	11.9874	191	12.13631	0.16452	1.35567
9	12.9252	13.0706	13.3860	13.3889	13.4032	12.9836	225	13.19291	0.22376	1.69610
	Om1	BOm2	Om3	Om4	Om5	Om6	λ_{max}	X	$\delta_{\chi n^{-1}}$	CV
	5.0535	5.0939	5.1042	5.0874	5.0722	5.0957	242	5.0540	0.08761	1.61776
II	Cal-Om1	Cal-Om1	Cal-Om3	Cal-Om4	Cal-Om5	Cal-Om6	λ_{max}	μ_{χ}	$\delta_{\mu_{\chi} n^{-1}}$	$CV_{\mu_{\chi}}$
1	4.8909	4.8978	4.8954	4.8957	4.8910	4.896	191	0.19220	0.00417	2.17462
2 ^{om}	4.9321	4.9383	4.9353	4.9376	4.933	4.9363	242			
3	5.7824	5.7903	5.7868	5.7895	5.7827	5.7875	191	-3.37748	0.00128	-0.03814
4	6.3368	6.3354	6.3327	6.3321	6.3303	6.335	263	-5.06953	0.01328	-0.26212
5	6.9732	6.9836	6.9754	6.9767	6.975	6.9817	191	-6.72072	0.00713	-0.10620
6	8.1331	8.1444	8.1395	8.142	8.1395	8.1433	223	-9.04067	0.00636	-0.07039
7	8.584	8.5992	8.5945	8.596	8.5914	8.598	266	-9.77544	0.00524	-0.05367
8	9.4406	9.4604	9.4497	9.4561	9.4492	9.4567	230	-10.97290	0.00450	-0.04103
9	12.0861	12.1298	12.1057	12.1145	12.0935	12.1028	191	-13.60093	0.00403	-0.02969
10	13.0948	13.15	13.1387	13.1467	13.1026	13.1186	224	-14.32837	0.00661	-0.04614

Tabla 2a I. Tiempos de migración de las corridas de TF provenientes Calostro, así como también del OM incluyendo sus valores estadísticos, y la **2a II** con la inyección doble de estas y el marcador neutro con buffer de Colatos-Boratos, así como también, los valores estadísticos de sus $\mu_{efectiva}$.

Nota. Los valores completos de las constantes de movilidad efectiva de cada pico se encuentra en el Anexo B.



La figura 24 muestra el comportamiento del calostro en buffer de Colatos-Boratos, y al igual que el anterior, la segunda de las muestras fue disuelta en el buffer y no hay cambios en los tiempos en que eluyen los componentes del calostro. La tabla **2a II** se encuentran las estadísticas de los valores de la movilidad efectivas promedio de cada grupo de picos y muestran que las movilidades son homogéneas en cada grupo.

Empleando los criterios del método dos, hay picos importantes por su longitud de onda, en el caso de la inyección simple están los picos del analito 3, 5, 6, 7 y 9, y de la inyección doble están los picos 4, 6, 7, 8 y 10. Podrían ser de naturaleza peptica ya que salen después del marcador de flujo, pero no se puede asegurar.

El pico 1 no tiene una λ importante, pero este pico no sale en el método anterior y además está empalmado con el Om, lo que indica una naturaleza neutra y será evaluado para poder ejemplificar los cambios en el espectro de absorción entre los picos, lo cual es indicativo de presencia de un analito, ya que difiere del espectro que muestra el buffer de corrida, donde no hay nada que absorba, por lo cual se toma como patrón.

Todos los picos son de naturaleza aniónica, pues eluyen después del Om solo el primero es diferente pues eluye junto con el marcador.

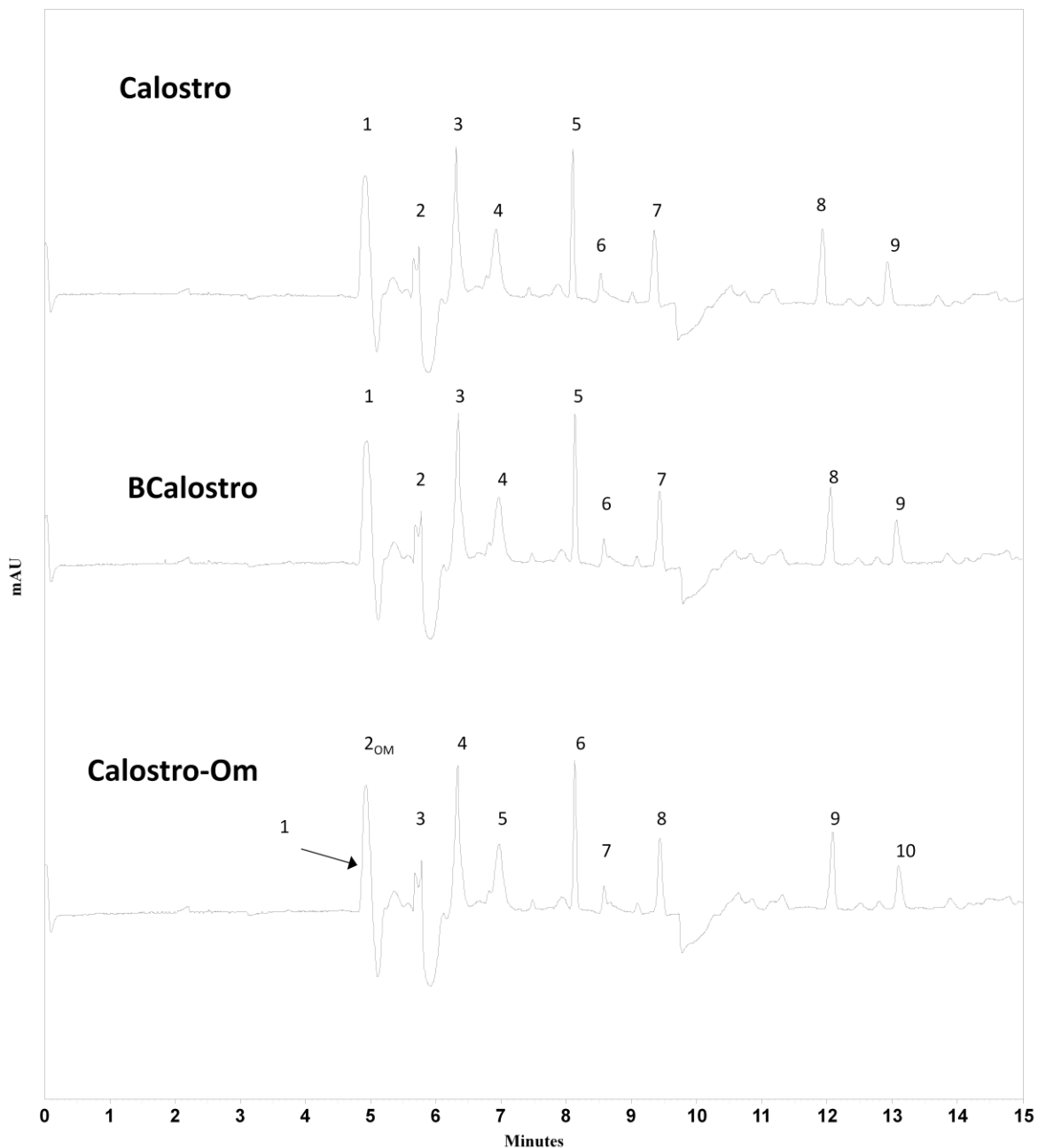


Figura 24. Electroferograma comparativo entre el Calostro y Calostro-OM a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 50 cm de longitud total y 34 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de Colatos pH 9.15, 15 KV de voltaje aplicado durante 15 minutos.



Parecería que las muestras de calostro (Dos primeras), comparado con la de Calostro-OM son iguales, pero no es así, ya que el primer pico de estas es reemplazado por él OM en la tercera, esto se aprecia comparando los espectros de absorción (Ver figura 25). En este pico correspondiente al OM, hay una pequeña parte en donde el espectro de absorción cambia y es igual respecto a él primer pico de las muestras de calostro solo, lo cual implica que ese componente del calostro tiene una naturaleza neutra al igual que el marcador como se mencionó anteriormente y por ello se sobreponen, además, el pico hacia abajo encontrado después de estos, corresponde al agua que también es de naturaleza neutra.

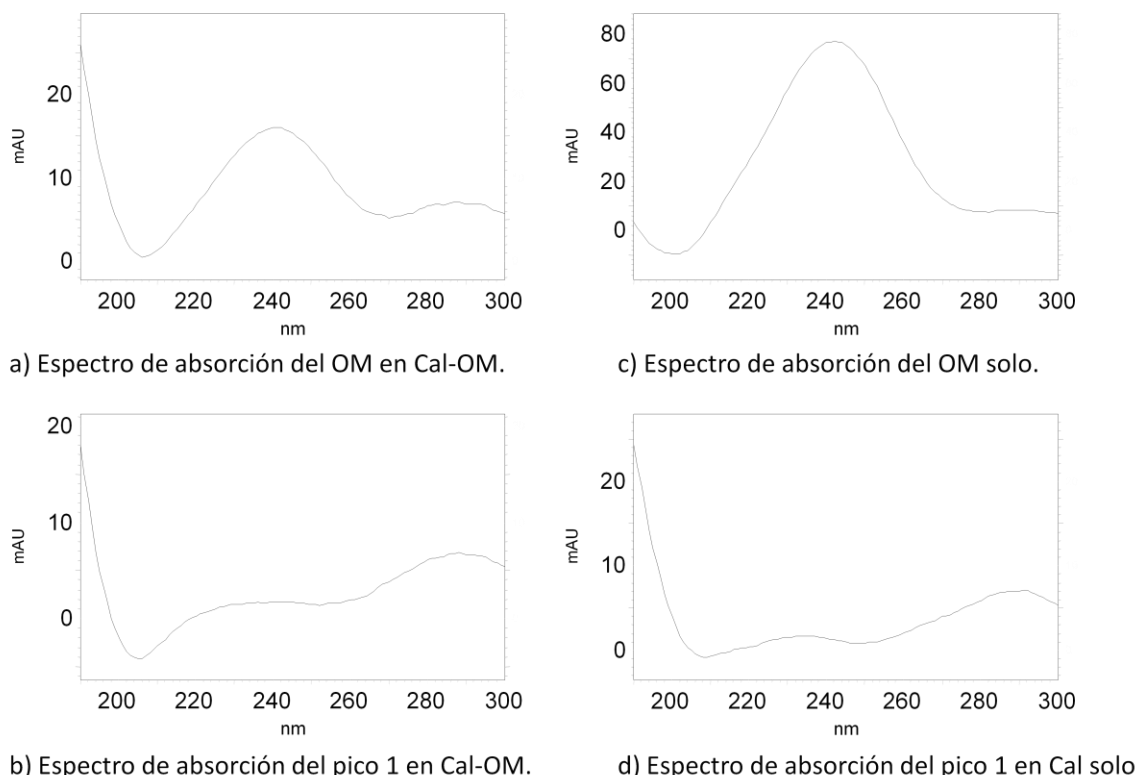


Figura 25. Espectros correspondientes al pico 1 de la muestra de calostro y al de la inyección doble.



En la figura 25 se aprecia lo mencionado anteriormente, a) corresponde al espectro de absorción del Om en la inyección doble junto con la muestra de calostro y se observa que tiene una absorción máxima a 242 nm, comparándolo con el c) espectro de la muestra de Om solo, se aprecia que es el mismo, pues también absorbe a 242 nm. El b) espectro corresponde al pequeño pico sobrepuesto con el OM de la inyección doble y se observa que es igual al espectro de absorción del componente 1 de la muestra de calostro solo (Espectro inciso d), lo que muestra que se trata del mismo pico.

En este método se incorporó una muestra más, diferente a las empleadas en el método 2, se trata de una muestra de ratón diferente al Balb ya usado, y que también se empleará aquí más adelante. Los Tm de los componentes del C57 (Muestra antes mencionada) se encuentran en la tabla **2b I** y **2b II**. Ahí se encuentran los datos estadísticos que indican que cada grupo de picos es homogéneo tanto en sus Tm como en sus constantes de movilidad efectiva promedio.

Se decidió incorporar otra muestra para tener mayor rango de comparación, así como también otra muestra de Balb con una diálisis de 6-8 KDa. La primera se comportó como las anteriores, encontrando diferencias mínimas en los Tm. Todos los picos eluyen después de marcador de flujo (Ver figura 28), indicativo de naturaleza aniónica. En estas muestras los cambios de los espectros y las λ están mejor definidos que los encontrados hasta el momento, con respecto a las



muestras de ratón sin aditivo., la preparación de estas es igual que las de Balb (Ver pag 49).

Todos los componentes que eluyen son importantes a excepción del 2 de la muestra sola de C57 con λ de 215 nm, los demás a partir de 268 nm, y son datos homogéneos en cada grupo, como lo indican sus respectivos CV en la tabla **2b I** y **2b II** e igual que la muestra anterior todos son aniones.

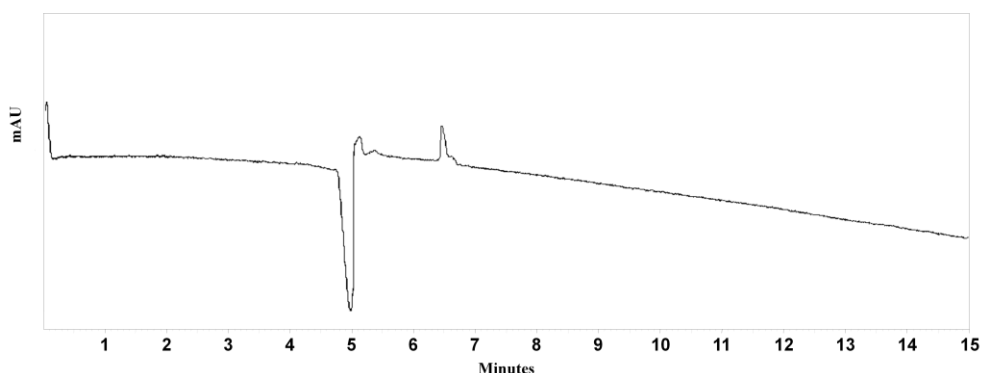


Figura 26 Electroferograma de la corrida de agua con el método 3 a 215 nm de longitud de onda.

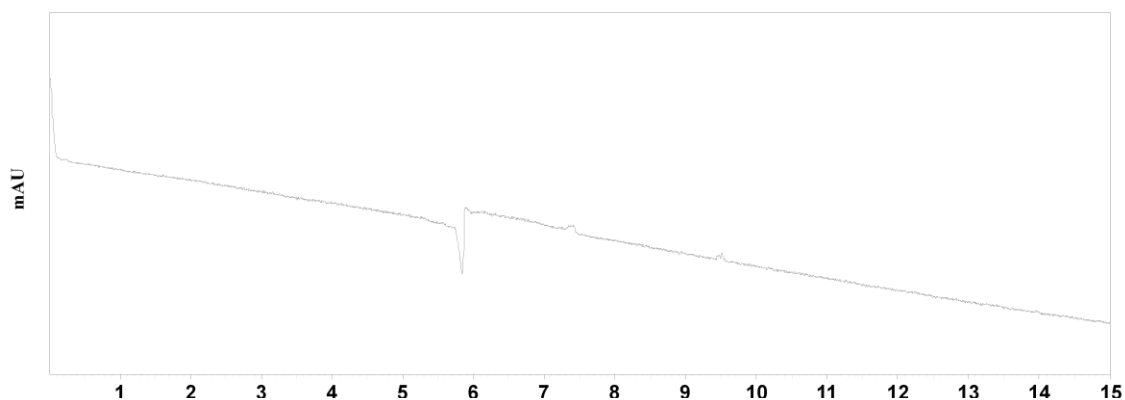


Figura 27. Electroferograma de la corrida de buffer con el método 3 a 215 nm de longitud de onda.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



TABLA No. 2b. MÉTODO 3.
Buffer de Colatos [50mM] - BO [20mM]; pH=9.15; Voltaje de 15KV; Capilar Corto; Polaridad Normal

I	C5701	C5702	C5703	C5704	C5705	C5706	λ_{max}	X	$\delta_{Xn^{-1}}$	CV
1	5.8256	5.8346	5.8365	5.8482	5.8424	5.8304	269	5.83628	0.00813	0.13941
2	5.8919	5.9164	5.9169	5.9166	5.9145	5.9120	215	5.91138	0.00972	0.16444
3	6.3004	6.3094	6.3015	6.2961	6.2974	6.3000	268	6.30580	0.01273	0.20195
4	6.5604	6.5763	6.5875	6.5648	6.5626	6.5681	268	6.56995	0.01023	0.15574
5	7.4158	7.4447	7.4492	7.4405	7.4359	7.4414	268	7.43791	0.01170	0.15740
6	7.6319	7.6418	7.6471	7.6108	7.6073	7.6373	266	7.62936	0.01655	0.21696
7	8.5784	8.5962	8.5994	8.5868	8.5838	8.5879	268	8.58875	0.00781	0.09094
8	9.6330	9.6495	9.6421	9.6360	9.6327	9.6377	268	9.63850	0.00639	0.06639
9	10.3812	10.3972	10.3906	10.4159	10.3792	10.3860	295	10.39168	0.01353	0.13025
10	10.6907	10.7232	10.7185	10.7390	10.6985	10.7042	270	10.71235	0.01784	0.16661
II	C57-Om1	C57-Om2	C57-Om3	C57-Om3	C57-Om3	C57-Om3	λ_{max}	μ_X	$\delta_{\mu_X n^{-1}}$	CV_{μ_X}
1^{om}	4.8575	4.8787	4.8722	4.8713	4.8834	4.885	242			
2	5.852	5.8062	5.8126	5.8109	5.8216	5.8264	270	-3.78164	0.09184	-2.42859
3	5.9202	5.925	5.9322	5.9286	5.932	5.9386	268	-4.13573	0.03454	-0.83538
4	6.2699	6.2361	6.2414	6.2374	6.2546	6.2597	268	-5.11560	0.07059	-1.37992
5	6.5994	6.5964	6.5974	6.5964	6.5953	6.5984	268	-6.07047	0.05061	-0.83385
6	7.4518	7.3347	7.3576	7.352	7.3675	7.3768	270	-7.87847	0.12287	-1.55959
7	7.5959	7.4918	7.5007	7.4916	7.5036	7.5087	262	-8.16889	0.12043	-1.47430
8	8.5822	8.4333	8.4589	8.4541	8.4625	8.4673	266	-9.87851	0.12439	-1.25921
9	9.6397	9.6438	9.6528	9.6484	9.6428	9.6483	268	-11.50012	0.04692	-0.40803
10	10.4424	10.2557	10.2738	10.2679	10.281	10.2948	293	-12.24854	0.11469	-0.93640
11	10.7415	10.5208	10.5581	10.5515	10.5673	10.5796	268	-12.54344	0.11912	-0.94970

Tabla 2b I. Tiempos de migración de las corridas de C57 de ratón y su estadística, así como también, con la inyección doble de estas y el marcador neutro **Tabla 2b II**, con buffer de micelas, incluyendo la estadística de sus movilidades efectivas..

Nota. Los valores completos de las constantes de movilidad efectiva de cada pico se encuentran en el Anexo B.

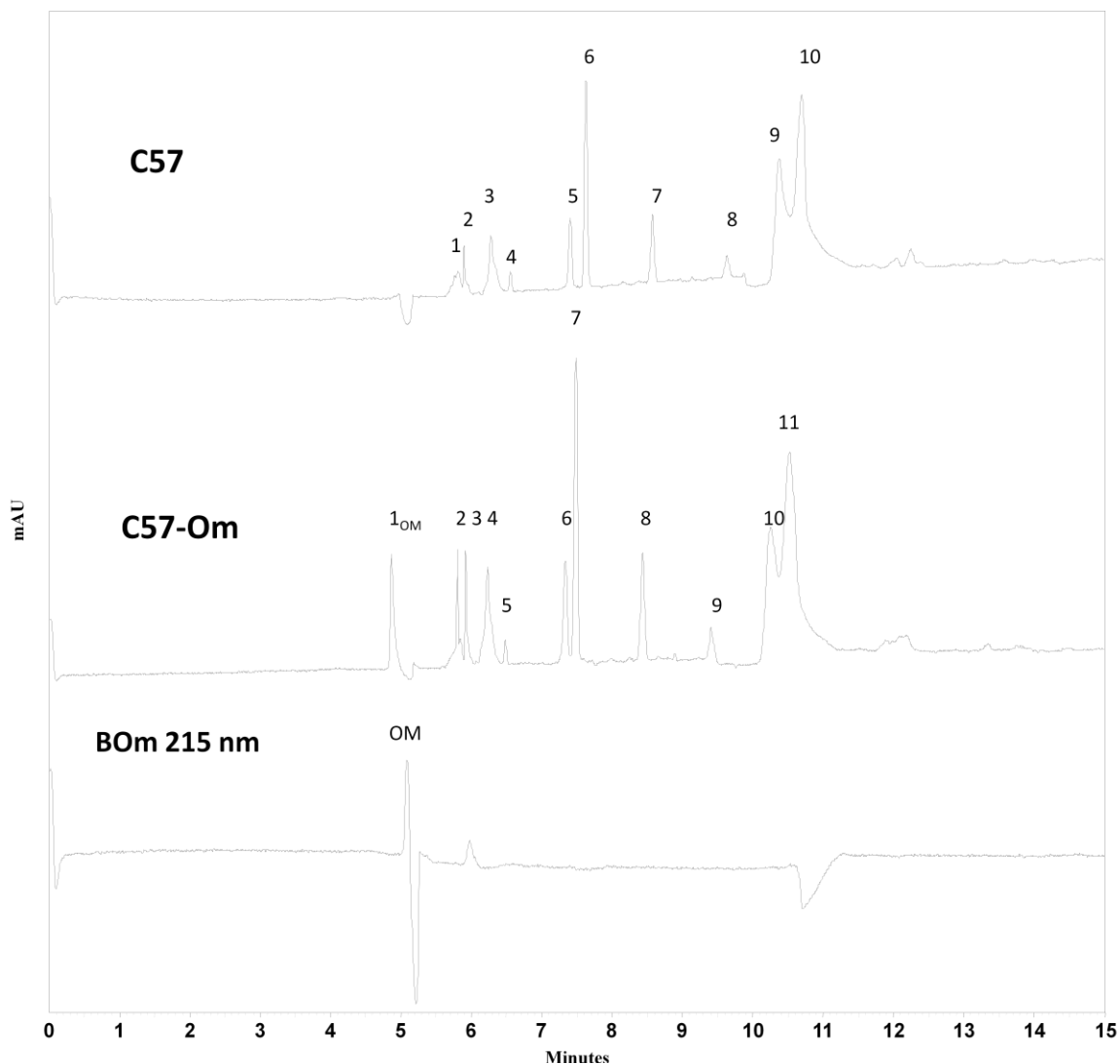


Figura 28. Electroferograma comparativo entre el C57 y C57-OM a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 50 cm de longitud total y 34 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de Colatos pH 9.15, 15 KV de voltaje aplicado durante 15 minutos.

Los picos representativos de la tabla **2c I**, son la mayoría pero no todos son iguales entre esas muestras, el analito No. 7 de las muestras de Balb se repite en las muestras de inyección doble (Pico 6), en ambos casos tienen una λ de 292 nm, pero en las corridas de Balb 6-8 KDa no se presenta.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



TABLA No. 2c. MÉTODO 3.
Buffer de Colatos [50mM] - BO [20mM]; pH=9.15; Voltaje de 15KV; Capilar Corto; Polaridad Normal

I	Balb1	Balb2	Balb3	Balb4	Balb5	Balb6	λ_{max}	X	δ_{xn}^{-1}	CV
1	5.6260	5.6327	5.6312	5.6282	5.6349	5.6330	290	5.63100	0.00331	0.05888
2	5.6769	5.6837	5.6833	5.6790	5.6872	5.6844	266	5.68202	0.00408	0.07182
3	6.0653	6.0807	6.0801	6.0733	6.0767	6.0698	290	6.07431	0.00604	0.09948
4	7.1218	7.1372	7.1352	7.1279	7.1289	7.1282	290	7.12986	0.00556	0.07805
5	7.2418	7.2613	7.2611	7.2483	7.2546	7.2505	282	7.25293	0.00762	0.10514
6	8.1571	8.1721	8.1721	8.1646	8.1640	8.1648	266	8.16578	0.00567	0.06943
7	9.1294	9.1401	9.1455	9.1371	9.1332	9.1333	292	9.13643	0.00575	0.06303
	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale	283			
8	10.1675	10.1756	10.1762	10.1696	10.1749	10.1760	289	10.17330	0.00376	0.03700
9	11.6960	11.7121	11.7147	11.6999	11.7086	11.6991	268	11.70506	0.00773	0.06609
	Balb 6-8KDa1	Balb 6-8KDa2	Balb 6-8KDa3	Balb 6-8KDa4	Balb 6-8KDa5	Balb 6-8KDa6	λ_{max}	X	δ_{xn}^{-1}	CV
1	5.8637	5.8653	5.8674	5.8739	5.8629	5.8730	290	5.86770	0.00472	0.08045
2	5.9286	5.9328	5.9320	5.9344	5.9248	5.9374	266	5.93166	0.00443	0.07474
3	6.2787	6.2845	6.2862	6.2888	6.2763	6.2882	290	6.28378	0.00515	0.08203
4	7.5619	7.5689	7.5692	7.5697	7.5610	7.5731	268	7.56730	0.00478	0.06321
5	7.6498	7.6537	7.6548	7.6561	7.6439	7.6589	283	7.65286	0.00531	0.06941
6	8.7024	8.7082	8.7036	8.7069	8.7005	8.7120	266	8.70560	0.00423	0.04864
	No sale	anterior					292			
7	10.6246	10.6296	10.6282	10.6272	10.6217	10.6321	283	10.62723	0.00368	0.03464
8	10.9438	10.9476	10.9487	10.9481	10.9422	10.9533	289	10.94728	0.00392	0.03583
9	12.6632	12.6677	12.6692	12.6667	12.6640	12.6670	268	12.66630	0.00227	0.01797

Tabla 2c I. Tiempos de migración de las corridas de TF provenientes Balb y Balb 6-8KDa, con buffer de Colatos-Boratos pH=9.17 a 15 KV, además de sus datos estadísticos.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



TABLA No. 2c. MÉTODO 3.
 Buffer de Colatos [50mM] - BO [20mM]; pH=9.15; Voltaje de 15KV; Capilar Corto; Polaridad Normal

II	Balb-Om1	Balb-Om2	Balb-Om3	Balb-Om4	Balb-Om5	Balb-Om6	λ_{max}	μ_x	$\delta_{\mu_x} \eta^{-1}$	CV_{μ_x}
1 ^{Om}	4.3794	4.3974	4.3729	4.3862	4.3756	4.3843	242	0		
2	5.1084	5.109	5.1148	5.1193	5.1067	5.116	290	-3.69123	0.05538	-1.50041
3	5.3813	5.3849	5.3889	5.3862	5.3824	5.3841	290	-4.81216	0.05357	-1.11322
	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale	No Sale				
4	6.2553	6.2614	6.2673	6.2614	6.2592	6.2600	283	-7.75755	0.05470	-0.70519
5	7.0051	7.0134	7.0154	7.0104	7.0074	7.0134	266	-9.69427	0.0069	-0.52294
6	7.6932	7.6987	7.7038	7.7011	7.6946	7.6989	292	-11.13798	0.05222	-0.46892
7	7.9702	7.9743	7.9926	No Sale	No Sale	No Sale				
8	8.5164	8.5207	8.5261	8.5307	8.5174	8.5221	289	-12.56114	0.05181	-0.41251
9	9.6866	9.6932	9.697	9.6938	9.7006	9.703	268	-14.17065	0.05372	-0.37914

Tabla 2c II. Tiempos de migración de las corridas de la inyección doble de Balb y Om con buffer de Colatos-Boratos pH=9.17 a 15 KV, incluyendo la estadística de sus movilidades efectivas.

Nota. Los valores completos de las constantes de movilidad efectiva de cada pico se encuentran en el Anexo B.

En la figura 29, se aprecia claramente que las muestras individuales son prácticamente iguales entre sí, pensando que la primera tiene una diálisis de 12-14 KDa y la segunda de 6-8 KDa, se puede asumir que pesar de la diálisis que tenga la muestra, los componentes del DLE se mantienen toda vía a 12 y 14 KDa.

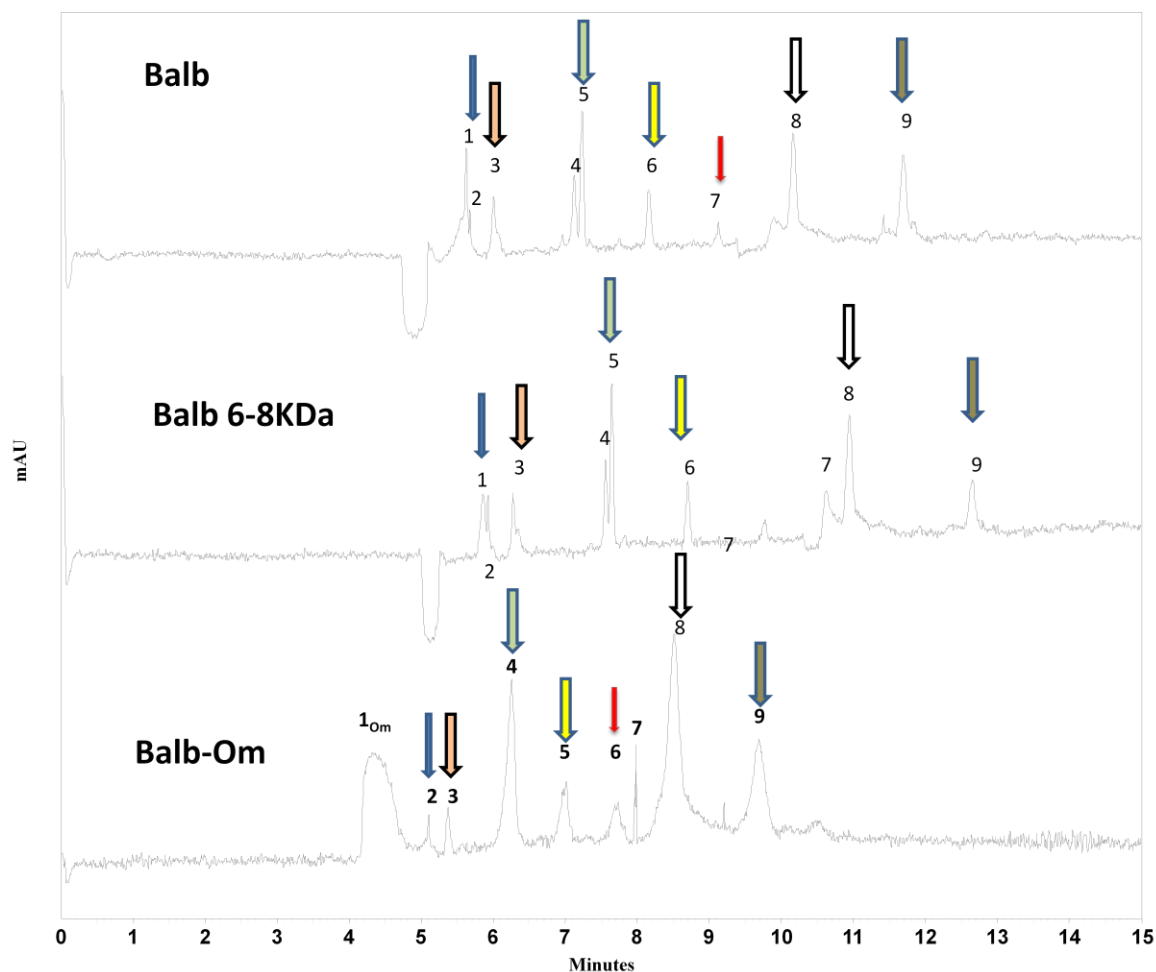


Figura 29. Electroferograma comparativo entre el Balb, Balb 6-8KDa y Balb-OM a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 50 cm de longitud total y 34 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de Colatos pH 9.15, 15 KV de voltaje aplicado durante 15 minutos, indicando los similares.

Por el contrario en las muestras de Balb 6-8 KDa el pico No. 7 de estas, absorbe a 283 nm y en Balb no absorbe sino 190 máx., y en el de la inyección doble no aparece. Por estas variaciones, es complicado realizar una comparación entre estas muestras, así que para ello solo, se utilizaran los picos que aparecen



en la muestra con el marcador neutro y se pueden ver en la figura 29, aún así se aprecia un orden de salida similar entre las muestras solas (patrón electroforético).

Por otra parte en las muestra con el marcador de flujo aparece un pico marcado con el número 7 que no aparece en las corridas de las muestras solas, ni en las últimas 3 corridas de Balb-Om, además el Om no se comporta como lo venía haciendo, pues no está bien definido, por lo cual se cree, que el marcador usado comenzaba a descomponerse y por ello sale ese pico 7 y no se toma en cuenta.

Las últimas muestras corresponden al TFC se ha corregido el problema que ocurrió con las muestras anteriores, se usó una nueva preparación de **Om**, pero se presenta otra alteración, se usaron muestras que fueron concentradas por medio de liofilización, es por ello que se presenta una gran diferencia de absorbancias de algunos de los analitos con respecto a los demás, por ello la mayoría se aprecian demasiado pequeños, pero aún así, tienen longitudes de onda muy importantes. Además, también se obtuvieron ventajas con respecto a las muestras empleadas en el método 2; es una mejor separación de los picos, que se puede ver la figura 30, y un cambio más evidente en los diferentes espectros de absorción.

Como se ha venido diciendo, hay picos que son más representativos para este estudio y que se toman más en cuenta, en el caso de estas corridas se



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucocitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



emplearan los picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 de la inyección simple; y los picos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 debido a sus λ .

El analito 11 de la muestra sola es descartado primero por su longitud de 190 nm y en segundo término por no aparecer en la inyección doble, se muestran también que son homogéneos entre cada grupo, debido a sus CV, lo cual es de vital importancia para su posterior comparación entre todas las muestras.

Todos los analitos que eluyen son de carga aniónica, a diferencia de las obtenidas en el método anterior, donde sí se presentan cationes, lo cual indica que el formador de micelas del método 3 no interacciona bien con estas moléculas de la muestra del factor de cerdo.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



TABLA No. 2d. MÉTODO 3.
Buffer de Colatos [50mM] - BO [20mM]; pH=9.15; Voltaje de 15KV; Capilar Corto; Polaridad Normal

I	TF1	TF2	TF3	TF4	TF5	TF6	λ_{max}	X	$\delta_{Xn^{-1}}$	CV
1	5.5218	5.5459	5.5375	5.5273	5.541	5.5254	270	5.53315	0.00965	0.17451
2	6.0972	6.1208	6.1137	6.1063	6.1161	6.0981	282	6.10870	0.00976	0.15981
3	6.1242	6.1521	6.1392	6.1291	6.1451	6.126	268	6.13595	0.01130	0.18425
4	6.2429	6.2539	6.247	6.2487	6.2514	6.2476	275	6.24858	0.00379	0.06072
5	6.5808	6.5973	6.5925	6.5874	6.589	6.5847	220	6.58861	0.00580	0.08812
6	6.7631	6.7835	6.7763	6.7693	6.7785	6.7652	252	6.77265	0.00803	0.11871
7	7.6688	7.7071	7.6827	7.6772	7.7026	7.6687	272	7.68451	0.01667	0.21705
8	7.8749	7.8869	7.8826	7.8795	7.8833	7.8792	280	7.88106	0.00413	0.05241
9	8.6453	8.6711	8.6583	8.6524	8.6684	8.6429	267	8.65640	0.01170	0.13523
10	9.9829	10.0278	9.9952	9.854	10.0176	9.986	190	9.97725	0.06293	0.63079
11	11.6523	11.6813	11.6692	11.6582	11.6788	11.6551	190	11.66581	0.01245	0.10674
12	14.4934	14.5734	14.5472	14.5016	14.5662	14.4944	190	14.52936	0.03715	0.25569
II	TF-Om1	TF-Om2	TF-Om3	TF-Om4	TF-Om5	TF-Om6	λ_{max}	μ_X	$\delta_{\mu_X n^{-1}}$	CV_{μ_X}
1^{Om}	5.1137	5.1164	5.1145	5.1045	5.1073	5.1173	242	0	0	
2	5.7612	5.7574	5.7552	5.7472	5.7474	5.7576	278	-2.47352	0.01097	-0.44363
3	6.217	6.2173	6.2165	6.2064	6.2082	6.2192	282	-3.93073	0.00738	-0.18794
4	6.5814	6.583	6.5928	6.5783	6.579	6.5852	268	-4.95350	0.01743	-0.35189
5	6.7531	6.7536	6.754	6.7418	6.7473	6.7536	280	-5.38011	0.01126	-0.20934
6	7.1829	7.1882	7.1861	7.1739	7.1759	7.1912	220	-6.39089	0.00812	-0.12709
7	7.6248	7.6337	7.623	7.6073	7.6081	7.6198	248	-7.29458	0.01156	-0.15851
8	9.2241	9.2273	9.225	9.2142	9.2178	9.2262	280	-9.87994	0.01563	-0.15821
9	9.436	9.4387	9.4372	9.4294	9.429	9.4462	270	-10.15818	0.01545	-0.15210
10	11.0744	11.0773	11.0758	11.0606	11.0637	11.0818	190	-11.93302	0.01493	-0.12518
	No sale	No sale	No sale	No sale	No sale	No sale				
	No sale	No sale	No sale	No sale	No sale	No sale				
11	14.1074	14.1084	14.1079	14.0963	14.098	14.2627	190	-14.14797	0.03092	-0.21860

Tabla 2d I. Tm de las corridas de TF provenientes Bazo de cerdo y sus datos estadísticos, así como también, la **Tabla 2d II** con la inyección doble de estas y el Om, incluyendo los valores estadísticos de sus $\mu_{efectiva}$.

Nota. Los valores completos de las constantes de movilidad efectiva de cada pico se encuentran en el Anexo B.

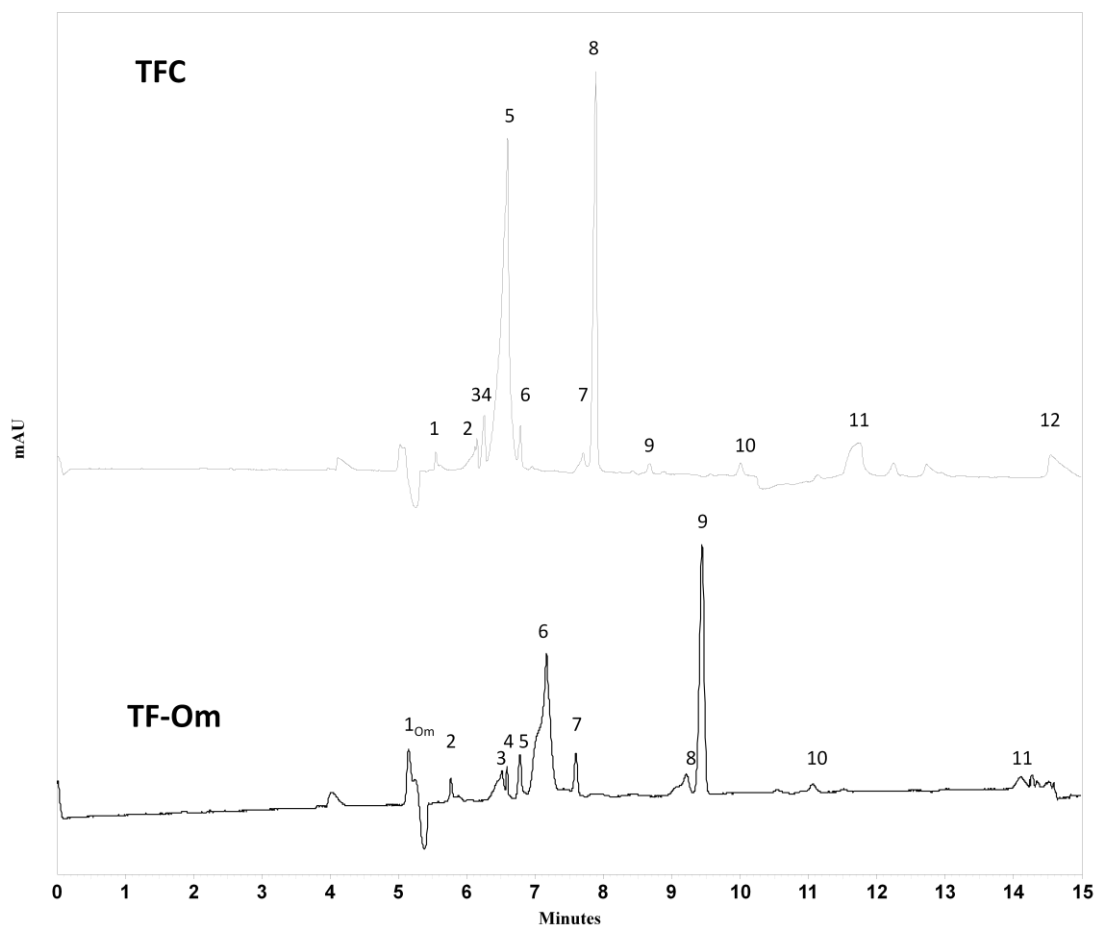


Figura 30. Electroferograma comparativo entre el TFC y TFC-OM a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 50 cm de longitud total y 34 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de Colatos pH 9.15, 15 KV de voltaje aplicado durante 15 minutos.

Por lo que respecta al método 3 se realizó el comparativo entre muestras, para ello se usarán las diferentes movilidades efectivas de cada grupo de picos como se realizó en el método anterior, para ello primero se incluye una tabla resumen de las movilidades y CV de las diferentes muestras (**Tabla 2e**).



Calostro			
A	Tm_x	μ_x	CV_{μ_x}
1	4.89446	0.19220	2.17462
2 ^{Om}	4.93543	0	
3	5.78653	-3.37748	-0.03814
4	6.33371	-5.06953	-0.26212
5	6.97760	-6.72072	-0.10620
6	8.14030	-9.04067	-0.07039
7	8.59385	-9.77544	-0.05367
8	9.45211	-10.97290	-0.04103
9	12.10540	-13.60093	-0.02969
10	13.12523	-14.32837	-0.04614

C57			
B	Tm_x	μ_x	CV_{μ_x}
1 ^{Om}	4.87468	0	
2	5.82161	-3.78164	-2.42859
3	5.92943	-4.13573	-0.83538
4	6.24985	-5.11560	-1.37992
5	6.59721	-6.07047	-0.83385
6	7.37340	-7.87847	-1.55959
7	7.51538	-8.16889	-1.47430
8	8.47638	-9.87851	-1.25921
9	9.64596	-11.50012	-0.40803
10	10.30260	-12.24854	-0.93640
11	10.58646	-12.54344	-0.94970

Balb			
C	Tm_x	μ_x	CV_{μ_x}
1	4.38263	0	
2	5.11236	-3.691233	-1.50041
3	5.38463	-4.812162	-1.11322
4	6.26076	-7.757551	-0.70519
5	7.01085	-9.694277	-0.52294
6	7.69838	-11.13798	-0.46892
7	7.97020		
8	8.52223	-12.56114	-0.41251
9	9.69570	-14.17065	-0.37914

TFC			
D	Tm_x	μ_x	CV_{μ_x}
1	5.11228	0	
2	5.75433	-2.47352	-0.44363
3	6.21410	-3.93073	-0.18794
4	6.58328	-4.95350	-0.35189
5	6.75056	-5.38011	-0.20934
6	7.18303	-6.39089	-0.12709
7	7.61945	-7.29458	-0.15851
8	9.22243	-9.87994	-0.15821
9	9.43608	-10.15818	-0.15210
10	11.07226	-11.93302	-0.12518
11	14.13011	-14.14797	-0.21860

Tabla 2e(A-D). Resumen de los tiempos de migración promedio (**Tm_x**) y el **CV** de sus **μ_{efectiva}** promedio (**μ_x**), de las diferentes muestras usadas en el método 3.

En la tabla anterior se resumen los resultados de todas las muestras analizadas con él método 3, los resultados de la movilidad promedio muestran signo negativo y debido a que las corridas se realizaron con una polaridad normal,



es indicativo que se trata de aniones (Excepción pico 1 del calostro) como se mencionó anteriormente.

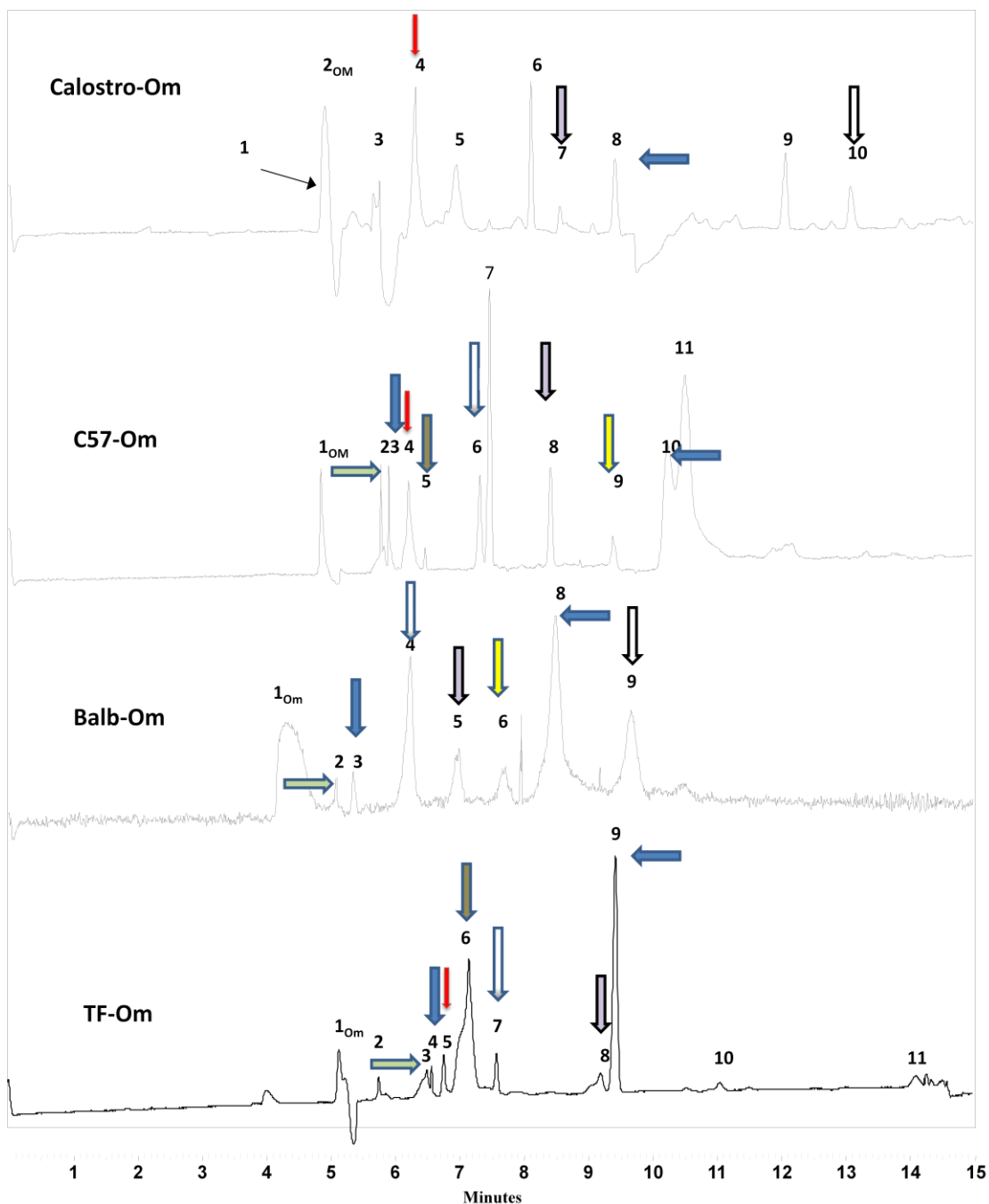


Figura 31. Electroferograma comparativo entre las muestras del método 3 y el OM, a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 50 cm de longitud total y 34 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de



Colatos pH 9.15, el OM se inyectó a 0.2 psi de presión por 1.5 segundos y las muestras a 0.5 psi de presión por 10 segundos, con 15 KV de voltaje aplicado durante 15 minutos.

La tabla siguiente muestra la estadística realizada a las movilidades promedio de cada grupo de analitos que se cree que son similares y que resultan ser importantes por su λ de cada muestra según la figura 31.

Hay un 58% de grupos importantes que resultan en este método marcados con (✓) en la casilla similares, estas son el grupo 1 (excepción el pico del Calostro) como muestra la **tabla 2f**, con λ_{Max} que van desde 270 a 290 nm, parecen longitudes correspondientes a péptidos, pero no puede afirmarse categóricamente, ya que el método no lo permite, por las razones ya mencionadas en el método 2.

Así mismo sucede con los grupos 2, 4, 5, 7, 8 y 10, hay otros grupos cuyos elementos absorben de forma máxima a longitudes muy bajas, estos están marcados con (✓★) en la casilla de similares, además no se encontró un patrón igual en la comparación entre las diferentes muestras que puedan considerarse huellas digitales.

Lo anterior se puede adjudicar a que el buffer no interacciona de manera eficiente con los componentes de la muestras, ya que se observan muchas variaciones entre los diferentes resultados o inclusive el estado del Om, puede también estar influyendo en este comportamiento, como sucedió con las muestras de Balb-Om.



Con respecto a las muestras de TFC, hay que recordar que son muestras concentradas, por lo que su viscosidad se ve aumentada y es un factor que pudo haber afectado la salida de los diferentes componentes en esta.

Existieron muchas variaciones que en definitiva afectaron los resultados del método, se debió mantener las mismas condiciones de las muestras del método 2, pero también fue un acierto incorporar las muestras de C57 ya que estas resultaron con λ de onda 262- 290 nm, por lo que será importante seguir evaluándola posteriormente.

Los picos marcados con (*) no pertenecen al mismo grupo a pesar de que el $CV_{x\mu x}$ entra dentro de los límites establecidos, por tratarse de una muestra biológica. Pues sus longitudes de onda no son importantes según lo mencionado anteriormente, por ello no son considerados en la figura 31. Por lo cual serán considerados como patrón electroforético de cada grupo de muestras individuales, es decir entre las muestras de la misma procedencia, no así para los resultados grupales.



No	Mtras Picos	Cal.	C57	Balb	TFC	$\mu_{\text{efectiva x}}$	$CV_{x\mu x}$	λ (nm)	Similares
1	(3*)-2-2 -3	-3.37748	-3.78164	-3.69123	-3.93073	-6.32545	-6.32545	191-270-290-282	✓ *
2	4-4-x-5	-5.06953	-5.11560		-5.38011	-3.23034	-3.23034	263-268-x-280	✓
3	(5*)-5-x-6	-6.72072	-6.07047		-6.39089	-5.08499	-5.08499	191-268-x-220	✓ *
4	7-8-5-8	-9.77544	-9.87851	-9.69427	-9.87994	-0.91461	-0.91461	266-266-266-280	✓
5	8--x-x-9	-10.97290			-10.15818	-5.45260	-5.45260	280-x-x-270	✓
6	10-x-9-(11*)	-14.32837		-14.17065	-14.14797	-0.69122	-0.69122	224-x-268-190	✓ *
7	x-3-3-4		-4.13573	-4.81216	-4.95350	-9.43255	-9.43255	x-268-290-268	✓
8	x-6-4-7		-7.87847	-7.75755	-7.29458	-4.03200	-4.03200	x-270-283-248	✓
9	x-9-6-(10*)		-11.50012	-11.13798	-11.93302	-3.45411	-3.45411	x-268-290-190	✓ *
10	x-10-8-x		-12.24854	-12.56114		-1.78186	-1.78186	x-293-289-x	✓
11	(9*)-11-X-X	-13.60093	-12.54344			-5.72024	-5.72024	191-268-x-x	X
12	(6*)-7-X-X	-9.040672	-8.168899			-7.16388	-7.16388	223-262-x-x	X

Tabla 2f. Valores de migración efectiva obtenidos de los picos semejantes del método 3.



9.2.3.- Método 4

El último método implementado fue muy parecido al Método 2, la diferencia se basa en la longitud del capilar, para acortar los tiempos que se obtuvieron en ese método, se empleó un capilar cuyas especificaciones fueran iguales al método 3, y que fue de lo poco satisfactorio de este, para así, poder comparar los resultados con los de el último método.

En primer lugar se tratarán las muestras de TFC, que son iguales a las empleadas en el método 2 y no fueron concentradas por liofilización, en la figura 32, se encuentran una muestra de inyección simple y otra de inyección doble a 215 nm, y como el marcador de flujo no se observa se dispuso de la misma corrida pero a 242 nm, y en esta se hace evidente su presencia, y se colocó un recuadro que muestra la zona donde se encuentra esté en la muestra.

Ocurre un fenómeno inesperado, el Om se ha desplazado de posición en comparación con los 2 métodos anteriores, donde solamente en la muestra de TFC Método 2 salían componentes antes del marcador y aquí no sucede igual.

Se desconoce la causa por la cual sucede este fenómeno, se atribuye a la preparación del buffer, así que después, se prepara uno nuevo a las mismas condiciones y se repitió lo ocurrido, sucede lo mismo con las otras muestras y se comentará más adelante.



En la **tabla 3a I** se encuentra la estadística de los T_m y se aprecia que cada grupo es homogéneo, ya que todos sus coeficientes de variación entran dentro del rango establecido anteriormente, en la **3a II** se encuentra la estadística de su movilidad efectiva, que como ya se sabe es única entre cada componente, y los grupos resultan ser homogéneos entre sí.

Las excepciones son el grupo del pico 8 y 10, que aunque caen dentro del rango establecido, se encuentran mucho más cerca del límite que los otros grupos, pero esto es hasta cierta forma lógico, ya que el O_m se encuentra exactamente entre ambos picos en un periodo de tiempo extremadamente corto, por ello varían mucho sus movilidades entre cada corrida.

A pesar del fenómeno desconocido que presenta O_m con respecto a lo anteriormente visto en este proyecto, el comportamiento de las corridas se mantiene (huellas digitales).

Hay componentes que tienen mayor relevancia que otros, estos son: de la inyección simple el 2, 5, 6, 7, 11, 13, y el 16, con respecto a la inyección doble se encuentran: 1,4, 5, 6, 11, 13 y 15. Desde el pico 1 hasta 8 parecen que se trata de cationes en la muestra doble y del 10 al 17 tienen naturaleza aniónica, es de resaltar que en lo que se lleva de proyecto solo en una ocasión se ha encontrado componentes neutros, en el Calostro con el método anterior y nada más, y se usó MEKC por la presencia de moléculas en el método 1.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucocitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar

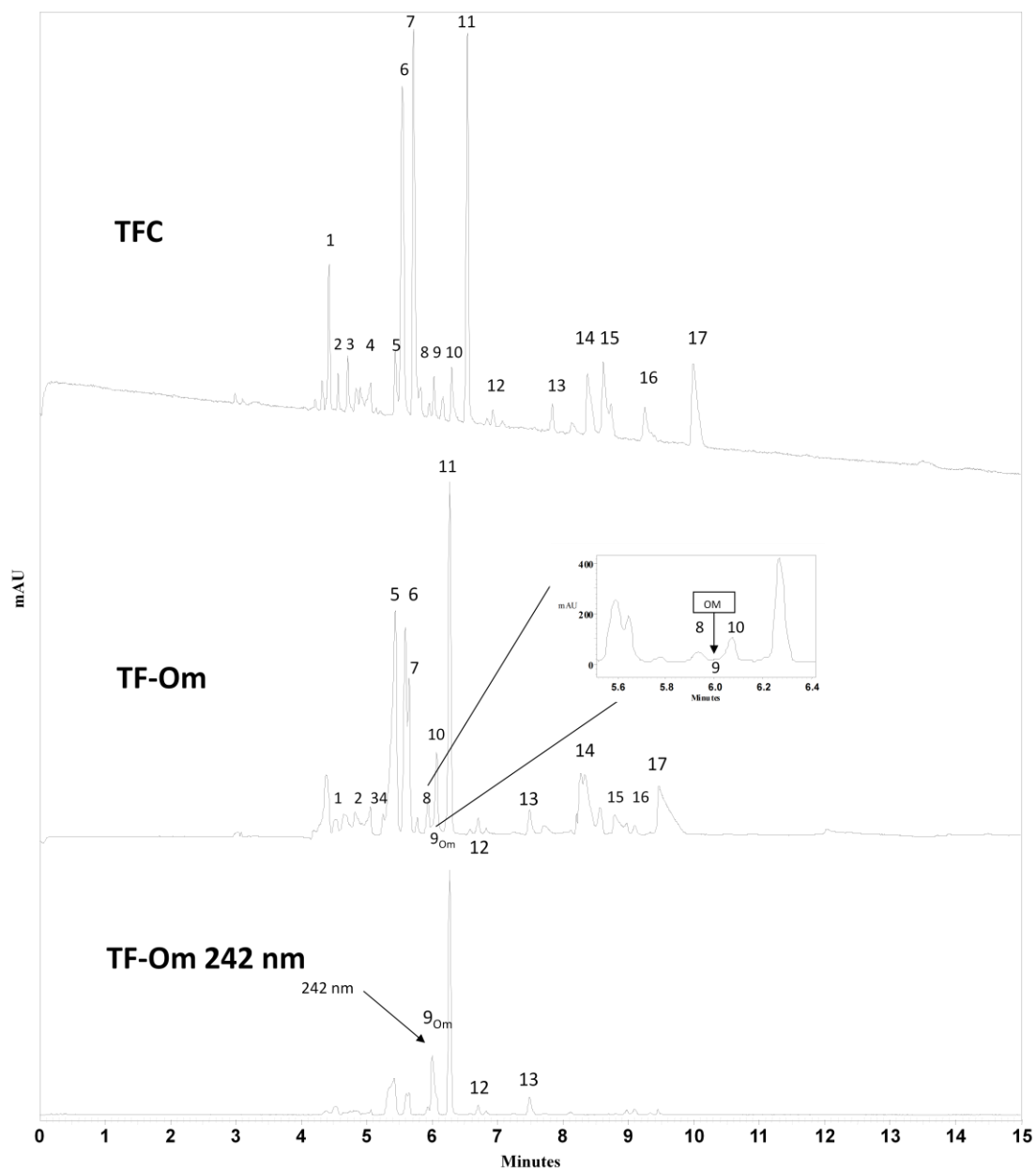


Figura 32. Electroferograma comparativo entre el TFC y TFC-OM a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 50 cm de longitud total y 34 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de SDS pH 9.15 a 15 KV de voltaje aplicado durante 15 minutos.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



TABLA No. 3a. MÉTODO 4.
Buffer de SDS [50mM] - BO [20mM]; pH=9.15; Voltaje de 15KV; Capilar Corto; Polaridad Normal

I	TF1	TF2	TF3	TF4	TF5	TF6	λ_{max}	X	δ_{xn}^{-1}	CV
1	4.4637	4.4682	4.4497	4.4609	4.4593	4.4520	196	4.45896	0.00701	0.15727
2	4.5925	4.5964	4.5891	4.5909	4.5936	4.5927	270	4.59253	0.00247	0.05384
3	4.7440	4.7462	4.7372	4.7415	4.7360	4.7380	196	4.74048	0.00407	0.08601
4	4.8705	4.8796	4.8725	4.8661	4.8740	4.8760	198	4.87311	0.00463	0.09518
5	5.4549	5.4685	5.4536	5.4498	5.4625	5.4628	266	5.45868	0.00702	0.12874
6	5.5510	5.5757	5.5571	5.5466	5.5720	5.5690	258	5.56190	0.01199	0.21557
7	5.7327	5.7515	5.7360	5.7273	5.7483	5.7428	200	5.73976	0.00937	0.16329
8	5.8312	5.8539	5.8374	5.8317	5.8426	5.8401	192	5.83948	0.00838	0.14357
9	6.0560	6.0571	6.0502	6.0449	6.0550	6.0560	216	6.05320	0.00473	0.07819
10	6.3167	6.3090	6.3095	6.3097	6.3114	6.3126	191	6.31148	0.00288	0.04578
11	6.5367	6.5641	6.5417	6.5280	6.5610	6.5479	258	6.54656	0.01402	0.21420
12	6.9428	6.9432	6.9380	6.9367	6.9429	6.9390	230	6.94043	0.00287	0.04138
13	7.8293	7.8598	7.8224	7.8225	7.8490	7.8301	256	7.83551	0.01536	0.19613
14	8.4029	8.3987	8.3943	8.4141	8.3917	8.3981	198	8.39996	0.00792	0.09432
15	8.6105	8.6302	8.6081	8.6022	8.6229	8.6123	198	8.61436	0.01029	0.11952
16	9.2807	9.2548	9.2433	9.2448	9.2510	9.2460	275	9.25343	0.01402	0.151583
17	9.9954	10.0067	9.9847	9.9885	9.9914	9.9857	198	9.99206	0.00816	0.08169
	Om1	Om2	Om1	Om4	Om5	Om6	λ_{max}			
	6.0423	6.0381	6.0450	6.0432	6.0518	6.0497	242			

Tabla 3a I. Tiempos de migración de las corridas de TF provenientes Bazo de cerdo y del marcador, buffer de SDS-Boratos pH 9.15 a 15 KV.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar

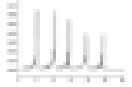


TABLA No. 3a. MÉTODO 4.
Buffer de SDS [50mM] - BO [20mM]; pH=9.15; Voltaje de 15KV; Capilar Corto; Polaridad Normal

II	TF-Om1	TF-Om2	TF-Om3	TF-Om4	TF-Om5	TF-Om6	λ_{max}	μ_x	$\delta_{\mu_x n^{-1}}$	CV_{μ_x}
1	4.5171	4.5402	4.522	4.5247	4.5285	4.5227	270	6.15114	0.04890	0.79511
2	4.8269	4.8812	4.8386	4.8371	4.8625	4.8349	198	4.49299	0.09017	2.00698
3	5.0532	5.0592	5.0637	5.0665	5.066	5.0625	191	3.49956	0.02954	0.84432
4	5.2472	5.248	5.2517	5.252	5.2487	5.2477	266	2.70037	0.03617	1.33964
5	5.428	5.4367	5.4406	5.4449	5.4419	5.449	256	1.94250	0.03705	1.90776
6	5.5835	5.5902	5.5961	5.5936	5.6026	5.5883	258	1.37553	0.02072	1.50696
7	5.6397	5.6466	5.6507	5.6596	5.6784	5.6502	191	1.15404	0.02273	1.96979
8	5.9254	5.9403	5.9379	5.9397	5.9432	5.9374	217	0.19817	0.02734	13.7967
9^{Om}	5.991	5.996	5.9965	5.9942	6.0213	5.9987	242	0	0	
10	6.0635	6.0718	6.0745	6.0768	6.0825	6.0765	191	-0.23218	0.02324	-10.0132
11	6.254	6.2692	6.2732	6.2783	6.279	6.271	256	-0.81687	0.02919	-3.57451
12	6.7049	6.7111	6.7169	6.7237	6.7218	6.716	223	-2.01433	0.02944	-1.46199
13	7.4804	7.4896	7.4933	7.494	7.498	7.4932	252	-3.76170	0.02758	-0.73329
14	8.297	8.3089	8.314	8.3188	8.3275	8.3097	191	-5.25627	0.02377	-0.45229
15	8.978	8.9881	8.9931	8.9974	8.9973	8.9964	275	-6.28592	0.03026	-0.48153
16	9.0927	9.1014	9.106	9.114	9.1149	9.1072	191	-6.44415	0.02873	-0.44591
17	9.4532	9.4662	9.4738	9.4751	9.4732	9.4682	199	-6.92033	0.03134	-0.45290

Tabla 3a II. Tiempos de migración de las corridas, con la inyección doble de TF provenientes Bazo de cerdo y el marcador neutro, con buffer de SDS Boratos, incluyendo los valores estadísticos de sus $\mu_{efectiva}$.

Nota. Los valores completos de las constantes de movilidad efectiva de cada pico se encuentran en el Anexo C.

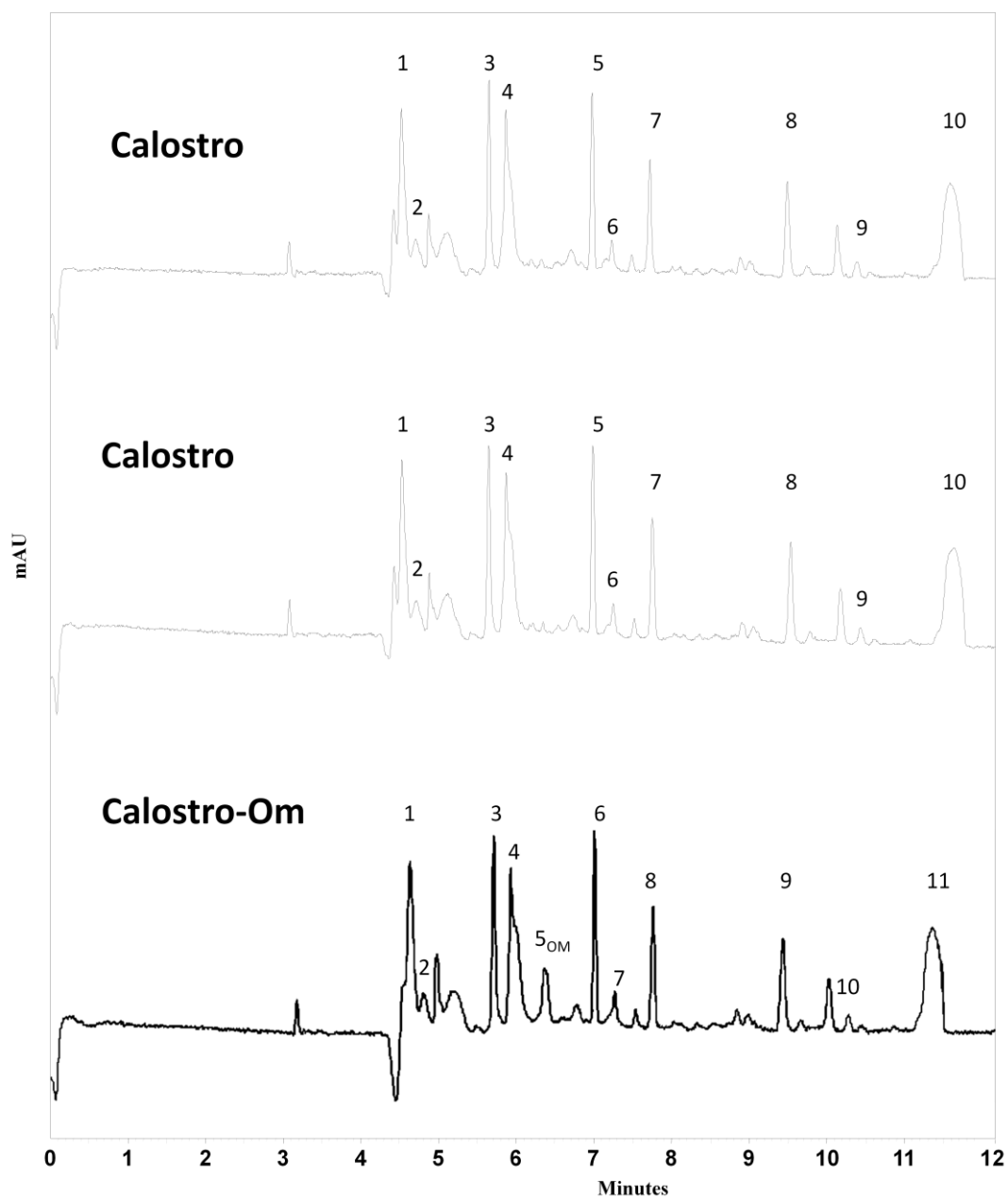


Figura 33. Electroferograma comparativo entre el Calostro y Calostro-OM a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 50 cm de longitud total y 34 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de SDS pH 9.15, 15 KV de voltaje aplicado durante 15 minutos.



En lo que respecta a la muestra de calostro se corrió solo hasta los 12 minutos en comparación con las demás para ahorrar tiempo, pues después de este tiempo ya no eluyen más componentes.

La estadística en ambas corridas muestra homogeneidad (**Tabla 3b I y II**) tanto en los T_m como en las movilidades correspondientes en cada grupo y como hasta ahora se ha visto, hay picos importantes y son: 3, 6, 9, 10 por la inyección doble y 3, 7, 10 y 11, que se tomarán en cuenta para el análisis final del método.

En la figura 33 se puede apreciar una similitud con las muestras del método 2, exceptuando el último componente que no aparecía antes. Aquí también el marcador de flujo se desplaza hacia la derecha.

Ahora es turno de las muestras de balb de 12-14 KDa, ya no se usaron las de 6-8 Da, pues ya se observó que independientemente de la diálisis los componentes no varían, además que la estadística muestra nuevamente un comportamiento homogéneo en los diferentes grupos. Los picos importantes son el 1,3,6, 7, 8 y 9, así como los componentes de la inyección doble que son el 1, 3, 5, 6, 7 y 8, y se usarán para la comparación final de las diferentes muestras.

Se elaboró el siguiente electroferograma basado en los datos de la **tabla 3c I y II**, en este se tomaron electroferogramas (ver figura 34) de la muestra de la inyección doble (Muestra y Marcador Neutro) a 215 nm y la misma pero a 242 nm, para verificar la localización del **Om**, en las primeras.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



TABLA No. 3b. MÉTODO 4.
Buffer de SDS [50mM] - BO [20mM]; pH=9.15; Voltaje de 15KV; Capilar Corto; Polaridad Normal

I	Cal0s1	Calos2	Cal0s3	Cal0s4	Cal0s5	Cal0s6	λ_{max}	X	$\delta_{\chi n^{-1}}$	CV
1	4.3642	4.3647	4.3645	4.3682	4.3680	4.3674	190	4.36616	0.00188	0.04323
2	4.4661	4.4600	4.4587	4.4690	4.4590	4.4653	190	4.46301	0.00434	0.09735
3	5.5715	5.5712	5.5706	5.5740	5.5735	5.5739	258	5.57245	0.00151	0.02720
4	5.7870	5.7913	5.7897	5.7890	5.7904	5.7884	258	5.78930	0.00152	0.02626
5	6.8822	6.8913	6.8902	6.8873	6.8883	6.8890	228	6.85471	0.08124	1.18525
6	7.1361	7.1504	7.1484	7.1428	7.1440	7.1423	264	7.14400	0.00504	0.07056
7	7.6141	7.6460	7.6478	7.6382	7.6413	7.6293	228	7.63611	0.01262	0.16529
8	9.3559	9.4002	9.3957	9.3672	9.3684	7.3865	190	9.04565	0.81299	8.98773
9	10.2369	10.2832	10.2795	10.2485	10.2573	10.2638	272	10.26153	0.01784	0.17388
10	11.4318	11.4688	11.4624	11.4390	11.4418	11.4376	278	11.44690	0.01498	0.13091
II	Calos-Om1	Calos-Om2	Calos-Om3	Calos-Om4	Calos-Om5	Calos-Om6	λ_{max}	μ_{χ}	$\delta_{\mu_{\chi} n^{-1}}$	$CV_{\mu_{\chi}}$
1	4.383	4.3927	4.394	4.3898	4.3907	4.3973	190	7.01749	0.01246	0.17762
2	4.9138	4.9261	4.9278	4.916	4.9216	4.926	190	4.23502	0.00535	0.12654
3	5.4021	5.4119	5.4137	5.4077	5.414	5.4178	260	2.15281	0.01335	0.62037
4	5.6087	5.6178	5.6212	5.6073	5.6173	5.6221	258	1.39000	0.00988	0.71141
5 ^{OM}	6.0204	6.0376	6.038	6.0240	6.0285	6.0383	242	0	0	
6	6.6294	6.6349	6.6372	6.6305	6.6368	6.6439	190	-1.71141	0.01610	-0.94093
7	6.8769	6.8831	6.8882	6.8745	6.8874	6.8891	264	-2.32618	0.01577	-0.67834
8	7.3405	7.3509	7.3541	7.3428	7.3552	7.357	190	-3.37206	0.01518	-0.45040
9	8.9231	8.9318	8.9362	8.926	8.9378	8.9327	190	-6.10188	0.01997	-0.32735
10	9.48	9.4896	9.4936	9.4852	9.4865	9.4964	272	-6.84716	0.01792	-0.26183
11	10.7149	10.7289	10.7303	10.7179	10.7286	10.7268	276	-8.22374	0.01934	-0.23525

Tabla 3b I. Tiempos de migración de las corridas de Calostro y sus datos estadísticos, así como también, la **Tabla 3b II** con la inyección doble de estas y el marcador neutro, con buffer de SDS-Boratos, incluyendo los valores estadísticos de sus $\mu_{efectiva}$.

Nota. Los valores completos de las constantes de movilidad efectiva de cada pico se encuentran en el Anexo C.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



TABLA No. 3c. MÉTODO 4.
Buffer de SDS [50mM] - BO [20mM]; pH=9.15; Voltaje de 15KV; Capilar Corto; Polaridad Normal

I	Balb1	Balb2	Balb3	Balb4	Balb5	Balb6	λ_{max}	X	δ_{xn}^{-1}	CV
1	4.9100	4.9118	4.9150	4.9185	4.9147	4.9233	266	4.91555	0.00478	0.09741
2	5.5437	5.5433	5.5470	5.5491	5.5450	5.5518	192	5.54665	0.00332	0.05995
3	5.7322	5.7317	5.7367	5.7340	5.7371	5.7453	252	5.73616	0.00499	0.08714
4	6.0456	6.0591	6.0573	6.0570	6.0486	6.0609	190	6.05475	0.00616	0.10177
5	6.1785	6.1817	6.1829	6.1869	6.1834	6.1883	198	6.18361	0.00355	0.05746
6	6.5547	6.5399	6.5590	6.5433	6.5560	6.5635	256	6.55273	0.00920	0.14043
7	7.0833	7.0913	7.0931	7.0981	7.0855	7.1029	262	7.09236	0.00741	0.10453
8	8.1925	8.1910	8.2003	8.1976	8.1983	8.2031	290	8.19713	0.00461	0.05624
9	8.3794	8.3790	8.3835	8.3842	8.3820	8.3895	276	8.38293	0.00384	0.04585
II	Balb-Om1	Balb-Om2	Balb-Om3	Balb-Om4	Balb-Om5	Balb-Om6	λ_{max}	μ_x	$\delta_{\mu x n}^{-1}$	$CV_{\mu x}$
1	4.8189	4.816	4.8234	4.8205	4.8214	4.8172	266	4.53865	0.02356	0.51924
2	5.3888	5.3837	5.3952	5.3943	5.3921	5.3859	192	2.05001	0.02464	1.20202
3	5.5873	5.5821	5.5953	5.5919	5.5884	5.5848	256	1.30388	0.02566	1.96865
4 ^{Om}	5.9578	5.9723	5.9821	5.9739	5.9815	5.9661	242	0		
	No sale	No sale	No sale	No sale	No sale	No sale				
	No sale	No sale	No sale	No sale	No sale	No sale				
5	6.3221	6.3228	6.3474	6.3395	6.3366	6.3273	256	-1.07978	0.01845	-1.70930
6	6.8445	6.8428	6.8565	6.8542	6.8494	6.8458	262	-2.42882	0.02295	-0.94525
7	7.9131	7.9135	7.9331	7.9304	7.9287	7.9167	292	-4.67146	0.01872	-0.40086
8	8.0897	8.0822	8.1003	8.0941	8.0935	8.0872	276	-4.96952	0.02521	-0.50730

Tabla 3c I. Tiempos de migración de las corridas de Balb y sus datos estadísticos, y **Tabla 3b II** de la inyección doble de estas y el marcador neutro, con buffer de SDS-Boratos, incluyendo los valores estadísticos de sus $\mu_{efectiva}$.

Nota. Los valores completos de las constantes de movilidad efectiva de cada pico se encuentran en el Anexo C.



Se puede observar que los picos 4 y 5 de la muestra sola, desaparecen cuando se inyecta la muestra y el marcador neutro juntas y en su lugar se encuentra posicionado el OM, que continua eluyendo diferente que en los métodos anteriores.

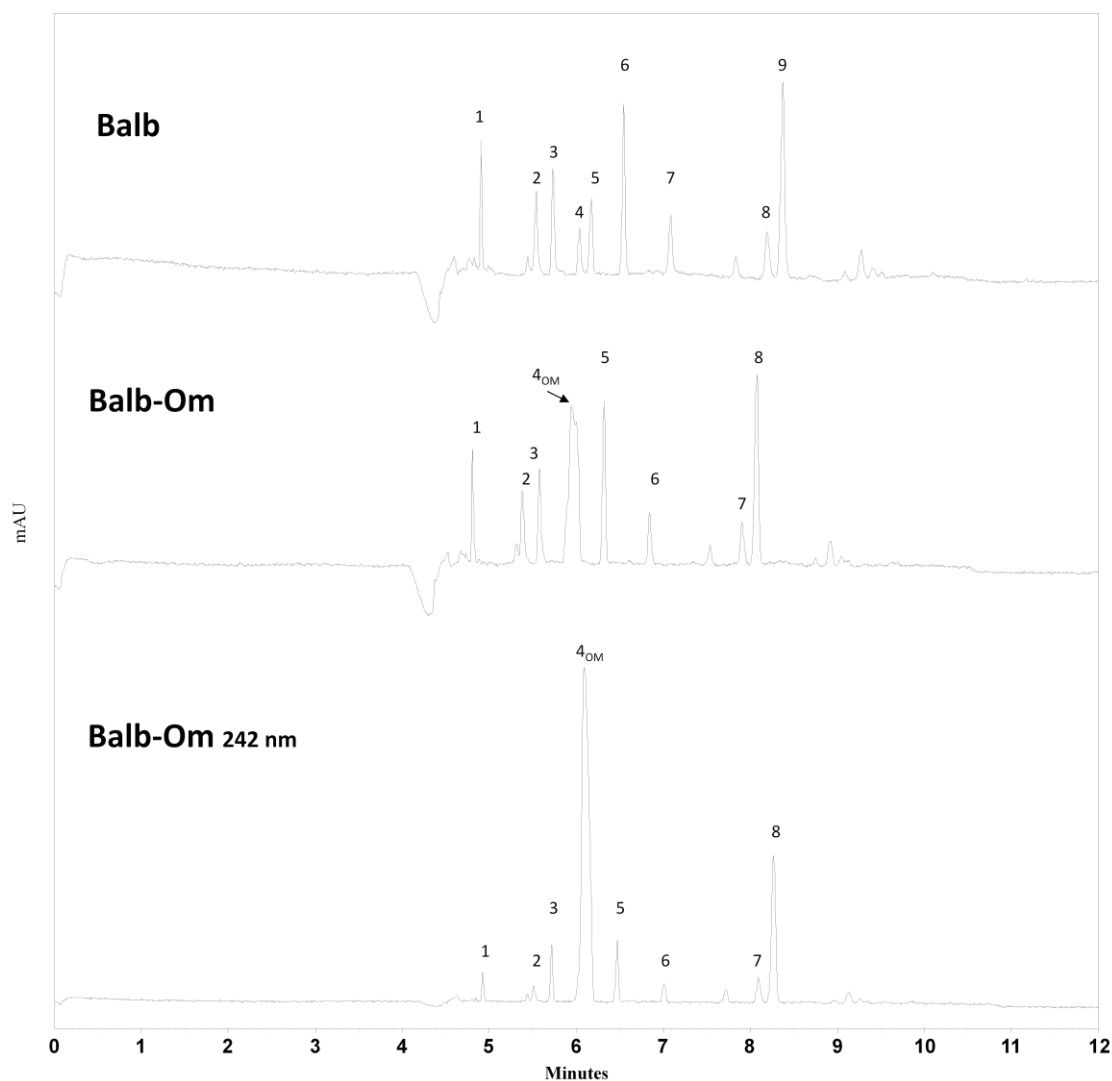


Figura 34. Electroferograma comparativo entre el Balb y Balb-OM a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 50 cm de longitud total y 34 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de SDS pH 9.15, 15 KV de voltaje aplicado durante 15 minutos.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



TABLA No. 3d. MÉTODO 4.
Buffer de SDS [50mM] - BO [20mM]; pH=9.15; Voltaje de 15KV; Capilar Corto; Polaridad Normal

I	C5705**	C57 2	C57 3	C57 4	C57 5	C57 6	λ_{max}	X	$\delta_{\chi n^{-1}}$	CV
1	5.8186	5.8294	5.8263	5.8278	5.8176	5.8282	270	5.82465	0.00517	0.08891
2	5.8646	5.8783	5.8753	5.8762	5.8692	5.8783	292	5.87365	0.00555	0.09453
3	5.9378	5.9452	5.9421	5.9481	5.9357	5.9454	268	5.94238	0.00480	0.08086
4	6.3132	6.3283	6.3272	6.3271	6.3182	6.3292	286	6.32386	0.00656	0.10382
5	6.5531	6.5672	6.5681	6.5642	6.5571	6.5643	191	6.56233	0.00594	0.09064
6	7.3892	7.3962	7.3917	7.3948	7.3890	7.3973	273	7.39303	0.00358	0.04842
7	7.6077	7.6194	7.6166	7.6171	7.6081	7.6182	258	7.61451	0.00521	0.06850
8	8.5271	8.5328	8.5367	8.5327	8.5282	8.5358	266	8.53221	0.00389	0.04564
9	9.3331	9.3451	9.3439	9.3481	9.3376	9.34746	191	9.34254	0.00595	0.06369
10	10.3765	10.3853	10.3865	10.3897	10.3743	10.3872	292	10.38325	0.00628	0.06054
11	10.6532	10.6685	10.6673	10.6678	10.6597	10.6674	276	10.66398	0.00620	0.05814
II	C57-0m1	C57-0m2	C57-0m3	C57-0m4	C57-0m5	C57-0m6	λ_{max}	μ_{χ}	$\delta_{\mu \chi n^{-1}}$	CV $_{\mu \chi}$
1 ^{0m}	6.0935	6.0928	6.1013	6.1028	6.0943	6.0976	242			
2	8.3736	8.374	7.3823	8.374	8.3764	8.3829	190	-5.05942	0.01207	-0.23876
3	9.4436	9.4463	9.4482	9.4471	9.447	9.4511	190	-6.59173	0.01186	-0.17993

Tabla 3d I. Tiempos de migración de las corridas de C57 de ratón, así como también sus datos estadísticos y la **Tabla 3d II** inyección doble de estas y el marcador neutro, con buffer de micelas. incluyendo los valores estadísticos de sus movilidades efectivas.

Nota. Los valores completos de las constantes de movilidad efectiva de cada pico se encuentran en el Anexo C.



TABLA No. 3d. MÉTODO 4.
Buffer de SDS [50mM] - BO [20mM]; pH=9.15; Voltaje de 15KV; Capilar Corto; Polaridad Normal

III	C57-0m1	C57-0m2	C57-0m3	λ_{max}	μ_x	$\delta_{\mu_x n^{-1}}$	CV_{μ_x}
1	6.9048	6.9083	6.9134	266	5.59009	0.00852	0.15246
2	7.2848	7.2863	7.2926	258	4.73687	0.00703	0.14852
3	7.421	7.4252	7.4329	191	4.44692	0.01062	0.23903
4	7.7258	7.7275	7.7345	250	3.84886	0.00695	0.18061
5	8.1589	8.2599	8.2667	191	2.95974	0.10022	3.38621
6	8.3454	8.3481	8.3517	270	2.76143	0.00342	0.12394
7	9.0152	9.0171	9.0226	255	1.75302	0.00356	0.20327
8	9.9813	9.9848	9.9914	262	0.53540	0.00406	0.75858
9^{0m}	10.4789	10.4796	10.4822	242			
10	11.4191	11.4219	11.4284	251	-0.89261	0.00236	-0.26478
11	12.5523	12.5546	12.5635	290	-1.78834	0.00245	-0.13738
12	12.9228	12.9253	12.933	295	-2.04684	0.00181	-0.08857

Tabla 3d III. Tiempos de migración de la inyección doble de las corridas de C57 y el marcador neutro, con buffer de SDS-Boratos pH=9.15 a 15 KV incluyendo los valores estadísticos de sus movilidades efectivas.

Nota. Los valores completos de las constantes de movilidad efectiva de cada pico se encuentran en el Anexo C.



A lo correspondiente con las muestras de C57, hay que tomar en cuenta dos aspectos importantes pues hubo situaciones que afectan los resultados de estas muestras, el primero es la continua variación que está sufriendo el marcador de flujo y que además en las corridas realizadas correspondientes a la **tabla 3d II**, no aparece prácticamente ningún pico además del Om, así que se preparó más buffer de corrida para tratar de corregir este problema, pero se presentó uno más, que fue trascendental.

Esta es la alteración completa del **Om** que eluyó mucho después de lo que lo venía haciendo, y no se pudo corregir el problema, así que solo se tienen 3 muestras (**Tabla 3d III**) para comparar con las demás del método, y no son confiables. De todas maneras serán incorporadas en el comparativo final, pues los componentes que aparecen son iguales a los de la muestra simple, con lo que se mantiene hasta ahora sus huellas digitales y la homogeneidad de las muestras.

En la Tabla I en los resultados no hay problema alguno, e incluso las λ que presentan la mayoría de los componentes son importantes, Los componentes a evaluar son 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10 y 11, y por la doble inyección el 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11 y 12. Ver la figura 35.

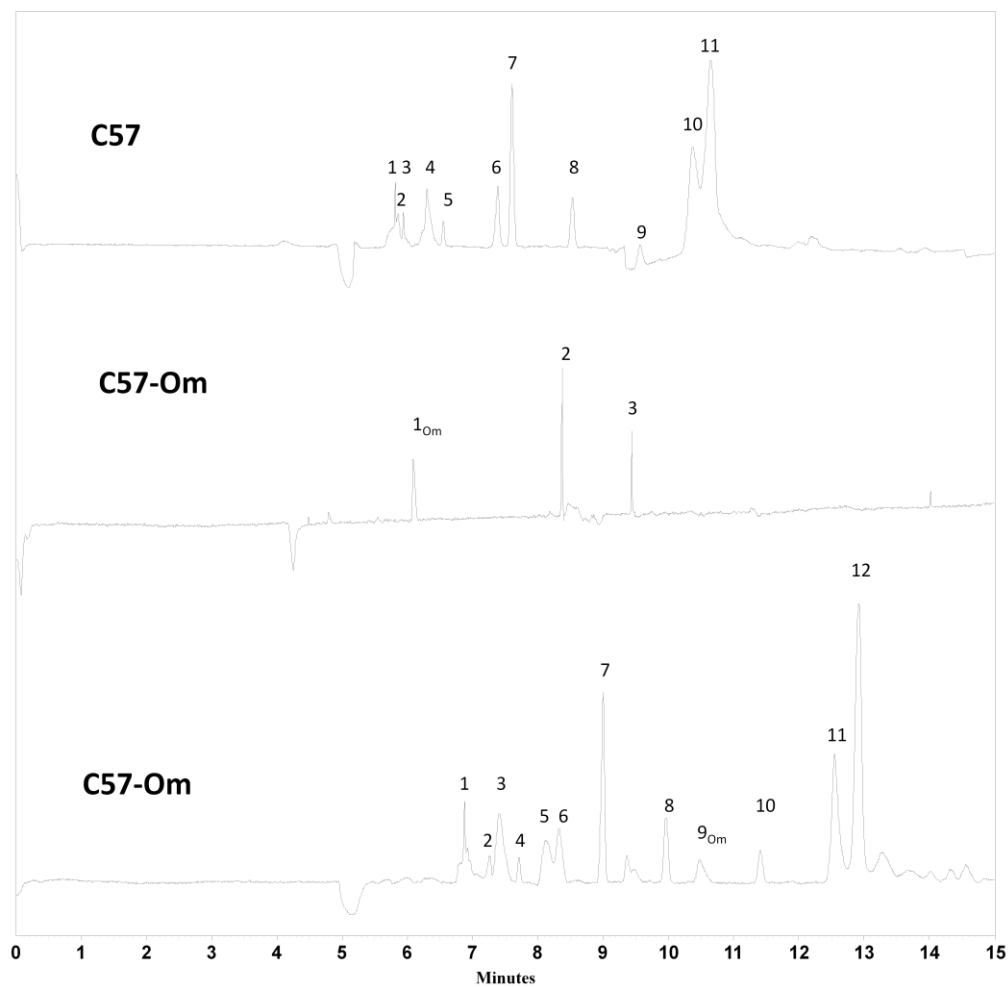


Figura 35. Electroferograma comparativo entre el C57 y C57-OM a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 50 cm de longitud total y 34 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de SDS pH 9.15 a 15 KV de voltaje aplicado durante 15 minutos.



Calostro			
A	Tm_x	μ_x	CV_{μ_x}
1	4.39125	7.01749	0.17762
2	4.92188	4.23502	0.12654
3	5.41120	2.15281	0.62037
4	5.61573	1.39000	0.71141
5 ^{Om}	6.03113	0	
6	6.63545	-1.71141	-0.94093
7	6.88320	-2.32618	-0.67834
8	7.35008	-3.37206	-0.45040
9	8.93126	-6.10188	-0.32735
10	9.48855	-6.84716	-0.26183
11	10.72456	-8.22374	-0.23525

TFC			
B	Tm_x	μ_x	CV_{μ_x}
1	4.52586	6.15114	0.79511
2	4.84686	4.49299	2.00698
3	5.06185	3.49956	0.84432
4	5.24921	2.70037	1.33964
5	5.44018	1.94250	1.90776
6	5.59238	1.37553	1.50696
7	5.65420	1.15404	1.96979
8	5.93731	0.19817	13.79675
9 ^{Om}	5.99961	0	
10	6.07426	-0.23218	-10.01328
11	6.27078	-0.81687	-3.574511
12	6.71573	-2.01433	-1.461990
13	7.49141	-3.76170	-0.733293
14	8.31265	-5.25627	-0.452298
15	8.99171	-6.28592	-0.481537
16	9.10603	-6.44415	-0.445917
17	9.46828	-6.92033	-0.452904

C57			
C	Tm_x	μ_x	CV_{μ_x}
1	6.90883	5.59009	0.15246
2	7.28790	4.73687	0.14852
3	7.42636	4.44692	0.23903
4	7.72926	3.84886	0.18061
5	8.22850	2.95974	3.38621
6	8.34840	2.76143	0.12394
7	9.01830	1.75302	0.20327
8	9.98583	0.53540	0.75858
9 ^{Om}	10.48023	0	
10	11.42313	-0.89261	-0.26478
11	12.55680	-1.78834	-0.13738
12	12.92703	-2.04684	-0.08857

Balb			
D	Tm_x	μ_x	CV_{μ_x}
1	4.81956	4.53865	0.51924
2	5.39000	2.05001	1.20202
3	5.58830	1.30388	1.96865
4 ^{Om}	5.97228	0	0
5	-1.07978	-1.07978	-1.70930
6	-2.42882	-2.42882	-0.94525
7	-4.67146	-4.67146	-0.40086
8	-4.96952	-4.96952	-0.50730

Tabla 3e(A-D). Resumen de los tiempos de migración promedio (**Tm_x**) y el **CV** de sus **μ_{efectiva}** promedio (**μ_x**), de las diferentes muestras usadas en el método 4.



No	Mtras Picos	TFC	Calostro	Balb	C57	$CV_{x\mu X}$	λ (nm)	Similares
		μ efectiva x						
1	2-2-1	4.49299	4.23502	4.53865	4.44692	3.70227	198-190-266	✓ *
2	3-x-x	3.49956			3.84886		191	X
3	4-X-X-	2.70037			2.76143		266	X
4	6 -4-3-	1.37553	1.39000	1.30388	1.75302	3.39943	258-258-256	✓
5	11 -x-x	-0.81687			-0.89261		256	X
6	x-6-X-		-1.71141		-1.78834		190	X
7	12-7-6	-2.01433	-2.32618	-2.42882	-2.04684	-9.56659	223-254-262	✓
8	13-8-x	-3.76170	-3.37206			-7.72434	252-190	✓
9	15-9-x	-6.28592	-6.10188			-2.10108	275-190	✓
10	16-10-x	-6.44415	-6.847164			-4.28802	191-272	✓ *
11	5-3-2-	1.94250	2.152816	2.05001		5.13379	257-260-193	X*

Tabla 3f. Valores de migración efectiva obtenidos de los picos semejantes del método 4.

Los datos correspondientes al C57, no serán utilizados para construir la figura 36, pues afectan los valores del $CV_{x\mu X}$, por el desplazamiento que sufrió el marcador de flujo, y por lo cual nos son confiables matemáticamente, pero aun así, se puede apreciar un comportamiento de los picos como ha venido sucediendo como huellas digitales. No se puede asegurar que se trate de los mismos componentes por la variabilidad de las longitudes de onda.

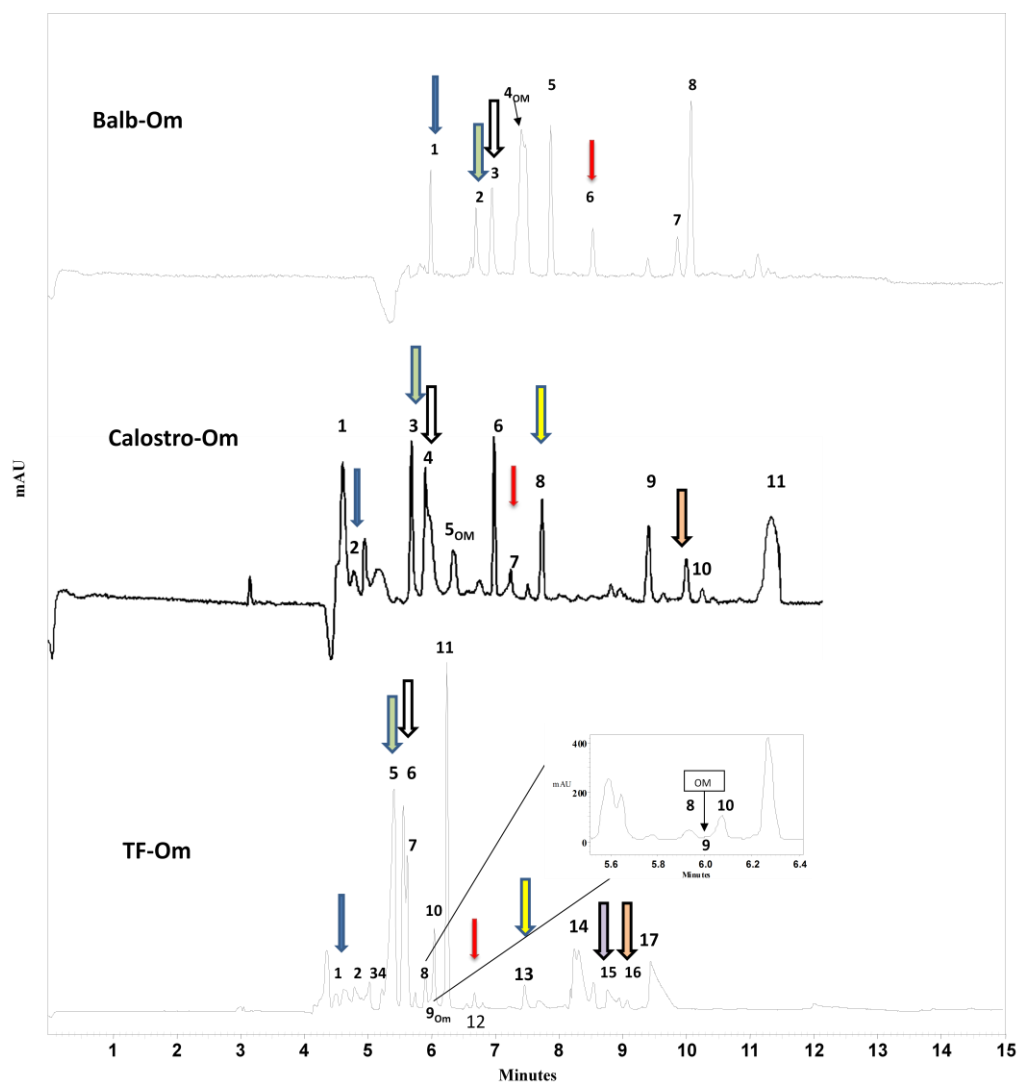


Figura 36. Electroferograma comparativo entre las muestras del método 4 y el OM, a una longitud de onda de 215 nm, Condiciones: capilar de sílice fundida de 50 cm de longitud total y 34 cm de longitud efectiva, buffer de boratos 20 mM con la adición de 50 mM de SDS pH 9.15, 15 KV de voltaje aplicado durante 15 minutos.

De los grupos de componentes marcados en la **tabla 3f**, solo se puede considerar el 4 con λ de 256-258 nm, del grupo 7 los componentes de Calostro y balb y por último el grupo 11 (TFC y calostro).



Muchos de los componentes presentes en las diferentes muestras se detectan a longitudes que entran en los parámetros de las detecciones de proteínas, péptidos y oligonucleótidos, los buffers de corrida utilizados en el presente trabajo no son los más indicados para la determinación del factor por su composición reportada.

Muchos parámetros pueden ser variados para optimizar separaciones por electroforesis, como son el tipo de buffer, pH soluciones orgánicas, agentes desnaturizantes, temperatura, longitud interna y externa de del capilar, tipo y tiempo de inyección, interacción de la pared del capilar con proteínas y otros. Frecuentemente, esto es muy importante para tener una máxima separación de los compuestos, porque la selectividad y resolución de la separación de mezclas reales es baja, debido a las contaminaciones con impurezas (Strege, 2004).

El desarrollo de MEKC es el mayor avance en electroforesis para la separación de compuestos eléctricamente neutros. Sin MEKC, la electroforesis capilar se ve estrictamente restringida para la separación de estos compuestos, en ECZ la viscosidad impide el arrastre de diferentes tamaños de moléculas, por ello usualmente no es una buena técnica para la separación de moléculas neutras. Usando MEKC, se regula extremadamente compuestos hidrofóbicos tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos y pueden ser separados y también puede ser usado para separar compuestos ionizados. También péptidos largos pueden ser separados por esta (Dale, 1995).



La determinación de proteínas por EC se ve afectada por la interacción de estas con la pared interna del capilar de silica fundida y esto es el mayor obstáculo para su separación. Esta característica de la silica fundida provoca dos consecuencias para el análisis de proteínas. Primero, las proteínas con residuos de aminoácidos básicos posicionados en la superficie de las proteínas pueden participar en interacciones electrostáticas con los grupos silanol ionizados. Las proteínas se absorben en la pared del capilar puede y resultar ensanchamiento de bandas, cola y en caso de interacciones más fuertes reducen la respuesta del detector o en la completa ausencia de picos (Wehr, 1999).

En segundo lugar, cambios sobre el estado de la pared del capilar durante un análisis o de corrida a corrida alteran la magnitud del flujo electroosmótico, resultando en cambios en los tiempos de migración y áreas de picos. La absorción de las proteínas puede alterar el potencial zeta de la pared del capilar, cambiando el flujo electroosmótico y degradando la reproducibilidad. Tres estrategias pueden ser empleadas para minimizar la interacción de proteínas con la pared del capilar: operar a pH extremos (pH de 2 principalmente), usar aditivos para buffer y capilares con pared recubierta (Wehr, 1999).

La unión del SDS a proteínas solubles en agua en una estequiometría aproximada para las cadenas de polipéptidos, con una molécula de SDS por dos residuos de aminoácidos (Wehr, 1999). También se pueden agregar a los buffers de corrida aditivos para reducir la absorción de proteínas, como aminas con bases orgánicas, el agregar alquil aminas para bajar las condiciones cuando ellas



son protonadas, participan en las interacciones electroestáticas con los grupos silanol de la pared del celular, estabilizan el estado de la doble capa y el nivel del flujo electrosmótico.

La absorbancia de detección a 280 nm es típicamente usada para monitorear las separaciones. La señal del detector a estas longitudes de onda es debido a la absorbancia de residuos aromáticos en los polipéptidos, por ejemplo triptófano, tirosina, fenilalanina (alcance láser). Estas longitudes de detección son lo suficientemente selectivas para polipéptidos y no hay interferencia por componentes no proteicos pues estos no son detectados (Wehr, 1999).

Las proteínas usualmente difieren en la relación tamaño-carga, y pueden ser separadas por electroforesis (ECZ) en presencia de 2-mercapto etanol, un agente reductor, dodecil sulfato de sodio (SDS) causa que las proteínas se disocian en polipéptidos y el SDS se enlace a ellos, produciendo moléculas similares con relación carga-masa. Pero, estos solutos no son bien separados por ECZ, así que ellos pueden ser separados por electroforesis capilar en gel, un proceso más específico para este tipo de moléculas (Dale, 1995).

Se necesita una mezcla de SDS y gel de poliacrilamida para electroforesis (SDS-PAGE), que es el formato más usado para la separación de proteína en base a los pesos moleculares con altas resoluciones. Con respecto a los oligonucleótidos, estos pueden ser separados por electroforesis en gel y requiere de buffer de Tris-boratos a 0.1 M y Urea / M pH cercanos a 8, muy similar al



empleado en el método 1. Estas separaciones también pueden llevarse a cabo por MEKC con SDS y un modificador de buffer de corrida como sales de tetraalquil amonio para separación de aniones, cationes y compuestos multi-iónicos, agregando bajas concentraciones de metales divalentes al buffer para realizar la separación de Oligonucleótidos (Dale, 1995).

10.- CONCLUSIONES

1. No se pudo estandarizar un método por Electroforesis Capilar de Zonas, en el que se pudiese establecer la presencia de algún componente importante, teóricamente un buffer de pH extremos como 2, es adecuado para poder determinar péptidos, pero en el proyecto no se obtuvieron resultados satisfactorios con buffer de fosfatos con pH de 2.04.
2. La presencia de aditivo en las muestras otorgadas por la ENCB compuesto de Sacarosa y Glicina, no permite detectar nada en las muestras de DLE por Electroforesis Capilar.
3. Se estandarizaron métodos por MEKC, para evaluar las muestras de DLE con variabilidad de resultados en los métodos 3 y 4 y bastante satisfactorios en el método 2.
4. Se encontraron componentes que son absorbidos de manera máxima a longitudes de ondas que concuerdan con las reportadas de los componentes



del TF, es decir péptidos y Oligonucleótidos. La mayoría de los componentes encontrados durante el estudio tienen una naturaleza aniónica. Por las condiciones de pH establecidas los aniones representarían a las primeras, y los cationes a los Oligonucleótidos.

5. El SDS resultó ser el mejor formador de micelas para las muestras utilizadas, en comparación con los Colatos donde los resultados variaron.
6. No se puede ser categórico respecto a la naturaleza de los componentes, ya que los métodos no resultaron ser los mejores para el tipo de composición reportados del TF. Hay otros que son específicos para tales casos.
7. A pesar de las variaciones que sufrieron algunos de los Buffers, se encontró un patrón de comportamiento de las diferentes muestras que se denominaron patrón electroforético. Estas incluyen a la mayoría de los componentes que se encontraron. Y se repite en los diferentes métodos.
8. A pesar del tiempo de corrida que se lleva para realizar las determinaciones del DLE, por medio de él método 2, este resultó ser el mejor, ya que las variaciones se ven reducidas por la buena estandarización de este.
9. El Calostro fue la muestra que menos componentes similares resultaron comparándolo con las otras muestras, pero mantuvo el mismo carácter iónico de sus componentes. La similitud entre las muestras de Balb y C57 se debe a que proceden del mismo tipo de TF proveniente de ratón, aunque las C57 resultó tener mayor número de componentes con λ importantes.



10. Las condiciones óptimas de trabajo para la evaluación de las muestras por MEKC fueron las siguientes

11. Se confirmó que independientemente del grado de la diálisis de la muestras de DLE, sus componentes parecen ser los mismos (Muestras de Balb Método 3).

Tipo de Buffer	SDS- Boratos
Concentración	50-20 mM
pH del buffer	9.17
Capilar	Sílice fundida con longitud total 65cm. y 50 cm al detector, 75µm de diámetro interno.
λ optima	215, 268 y 280 nm
Tipo de detección	Directa
Voltaje aplicado	15 KV
Tipo de inyección	Hidrodinámica (Presión)
Presión	0.5 psi
Tiempo	25 min

11.- SUGERENCIAS

1. Las modificaciones que se deben de realizar para continuar con el proyecto, son repetir el método 4, para optimizar el tiempo de corrida y modificar el comportamiento del Om presentado aquí. También se puede utilizar metanol grado HPLC como marcador de flujo
2. Realizar EC en gel de poliacrilamida (ECG) o también SDS-PAGE (SDS –Gel) para las diferentes muestras de DLE, utilizar también un detector de fluorescencia inducida por láser (LIF), con estas modificaciones se puede detectar Péptidos y Oligonucleótidos, aun que, económicamente no sea



probable, por el alto costo de este tipo de detector. La derivatización de las muestras es importante también.

3. Por los resultados obtenidos se debe de realizar determinaciones de los puntos isoeléctricos de los componentes, para poder justificar la naturaleza peptídica, así como también se puede utilizar un detector de ultravioleta para esto.
4. Identificando los componentes ya pueden ser separados estos y realizar pruebas biológicas *in vivo* para ver si estos elevan la producción de Interleucina 2, interferon λ y osteopontina, para determinar si forman parte del Factor de Transferencia.



12.- ANEXOS

12.1.1. Anexo A

	TFC 1	TFC 2	TFC 3	TFC 4	TFC 5	TFC 6
1	3.41555851	3.40097345	3.43800243	3.43620372	3.44463162	3.43878038
2	3.12573596	3.10850434	3.06461426	3.06022746	3.09099481	3.09659974
3	0.89459845	0.87750732	0.92398007	0.93775949	0.94488769	0.92767233
4 ^{OM}	0	0	0	0	0	0
5	-1.28598385	-1.30407106	-1.24962758	-1.25617336	-1.24714133	-1.25484814
6	-2.90440026	-2.92287773	-2.86502393	-2.86378466	-2.85570638	-2.87386305
7	-3.01917928	-3.03724426	-2.98361789	-2.98317074	-2.96973544	-2.98876194
8	-3.32335975	-3.34305552	-3.28851615	-3.28847381	-3.28219822	-3.29848175
9	-3.47411301	-3.49208238	-3.44611857	-3.44258346	-3.43161502	-3.45008585
10	-4.93828876	-4.94606912	-4.90926901	-4.91110409	-4.88714097	-4.87829006
11	-6.09517253	-6.11318021	-6.06165538	-6.05868306	-6.04792378	-6.06100029
12	-7.20879198	-7.22651346	-7.39763846	-7.19280314	-7.17304319	-7.18436384
13	-9.25782498	-9.27612881	-9.23341924	-9.23336767	-9.22142382	-9.23625831
14	-10.9962697	-11.0097695	-10.9755391	-10.9729994	-10.9628699	-10.9801264
15	-11.2834435	-11.284466	-11.2639841	-11.2605869	-11.2538225	-11.2675141
16	-11.9675443	-11.9847114	-11.9289515	-11.9251493	-11.9195887	-11.9399412
17	-12.9112244	-12.9199943	-12.8862723	-12.8824883	-12.8768806	-12.8930752

Resultados de las movilidades efectivas de los diferentes picos encontrados en las muestras de Factor de Transferencia provenientes de Bazo Cerdo por medio de MEKC, usando el método 2.



12.1.2. Anexo A

	Calostro 1	Calostro 2	Calostro 3	Calostro 4	Calostro 5	Calostro 6
1	4.043508773	4.011054594	4.03844596	4.09451888	4.01774731	4.09091065
2	0.929371716	0.913715491	0.95314051	0.9454581	0.89134662	0.94252536
3 OM	0	0	0	0	0	0
4	-2.121922575	-2.113699787	-2.09036029	-2.07927263	-2.14082634	-2.09770024
5	-2.738777185	-2.747507164	-2.72942568	-2.71165417	-2.76655573	-2.70995937
6	-3.351716364	-3.343797363	-3.33197548	-3.32778598	-3.37338569	-3.33240384
7	-4.883763959	-4.867826821	-4.82432944	-4.81695244	-4.89924306	-4.85393141
8	-7.65568507	-7.641226993	-7.53997746	-7.5273255	-7.58681698	-7.54079823
9	-9.727521532	-9.722812702	-9.34870268	-9.35192543	-9.66478199	-9.50989198
10	-11.34808973	-11.34298285	-10.9001494	-10.9017674	-11.0219764	-10.898748
11	-12.72477224	-12.71891388	-12.6272773	-12.590565	-12.6445997	-12.617702

Resultados de las movilidades efectivas de los diferentes picos encontrados en las muestras de Factor de Transferencia provenientes de Calostro de Glioma por medio de MEKC, usando el método 2.



12.1.3. Anexo A

	Balb 1	Balb 2	Balb 3	Balb 4	Balb 5	Balb 6
1 OM	0	0	0	0	0	0
2	-2.12621927	-2.13976104	-2.14379517	-2.15264549	-2.13623533	-2.12722229
3	-2.58195706	-2.58307564	-2.77580894	-2.62430879	-2.58666687	-2.64201864
4	-3.07095538	-3.0832442	-3.09853118	-3.19700028	-3.11349682	-3.19936677
5	-5.26475883	-5.27892521	-5.42465664	-5.52774898	-5.42344575	-5.35663417
6	-6.15967956	-6.17377864	-6.19503914	-6.34472782	-6.19911889	-6.19091626
7	-8.12330074	-8.13423058	-8.297872	-8.39000583	-8.32518147	-8.09241808
8	-11.1970123	-11.2115897	-11.293895	-11.3967634	-11.3013002	-11.4398117
9	-11.5009491	-11.5127084	-11.7455868	-11.6665169	-11.7459941	-11.5094966
10	-12.6172625	-12.6330545	-12.8163389	-12.7283941	-12.3513819	-12.6323819

Resultados de las movilidades efectivas de los diferentes picos encontrados en las muestras de Factor de Transferencia provenientes de Ratón Balb por medio de MEKC, usando el método 2.



12.2.1. Anexo B

	Calostro 1	Calostro 2	Calostro 3	Calostro 4	Calostro 5	Calostro 6
1 om	0.19356772	0.18977233	0.18716625	0.19644442	0.19728629	0.18898115
2	1	0	0	0	0	0
3	-3.37900286	-3.37689413	-3.37900635	-3.3774431	-3.37582734	-3.37672311
4	-5.09375548	-5.06095374	-5.06727708	-5.05488447	-5.0711988	-5.0691226
5	-6.72599705	-6.72135103	-6.71622391	-6.70855457	-6.72599895	-6.726233
6	-9.04386505	-9.03434943	-9.03992269	-9.03350118	-9.05062949	-9.04176811
7	-9.77583087	-9.77031873	-9.77706178	-9.76866603	-9.78301047	-9.77777768
8	-10.9737987	-10.9700745	-10.9704601	-10.9678805	-10.9805323	-10.9746858
9	-13.6015144	-13.6064478	-13.6017975	-13.5979012	-13.6030599	-13.5949022
10	-14.3238405	-14.3313215	-14.3378595	-14.3324117	-14.3248004	-14.3199911

Resultados de las movilidades efectivas de los diferentes picos encontrados en las muestras de Factor de Transferencia provenientes de Calostro de Glioma por medio de MEKC, usando el método 3.



12.2.2. Anexo B

	C57 1	C57 2	C57 3	C57 4	C57 5	C57 6
1 ^{om}	0	0	0	0	0	0
2	-3.9650078	-3.71085683	-3.76334003	-3.76193351	-3.74013392	-3.74857077
3	-4.18810805	-4.10223128	-4.15643849	-4.14913524	-4.10244528	-4.11607714
4	-5.25582227	-5.05646547	-5.10288935	-5.09554221	-5.08786232	-5.09502395
5	-6.15832128	-6.04912563	-6.0827212	-6.08441461	-6.02390235	-6.0243742
6	-8.12274054	-7.77854339	-7.8576268	-7.8501916	-7.82497604	-7.83676799
7	-8.41126321	-8.10255759	-8.15149869	-8.13744272	-8.1039892	-8.10664657
8	-10.1259608	-9.791415	-9.86307736	-9.85976794	-9.8154279	-9.81541853
9	-11.574648	-11.478261	-11.5202095	-11.5191528	-11.4546845	-11.4537831
10	-12.4783928	-12.179431	-12.2298911	-12.2278501	-12.1842675	-12.191443
11	-12.7806019	-12.4578841	-12.5269321	-12.5245154	-12.4829283	-12.4877959

Resultados de las movilidades efectivas de los diferentes picos encontrados en las muestras de Factor de Transferencia provenientes de Ratón C57 por medio de MEKC, usando el método 3.



12.2.3. Anexo B

	Balb 1	Balb 2	Balb 3	Balb 4	Balb 5	Balb 6
1 ^{om}	0	0	0	0	0	0
2	-3.69304333	-3.58971897	-3.7592703	-3.70016076	-3.70813221	-3.69707823
3	-4.81813477	-4.72628465	-4.88630332	-4.79717408	-4.84491329	-4.80016467
4	-7.76074317	-7.67246422	-7.8339003	-7.73827394	-7.79450651	-7.74542346
5	-9.7000179	-9.61323466	-9.76223812	-9.67212915	-9.72780251	-9.69024188
6	-11.147078	-11.0516725	-11.2058146	-11.12207	-11.1722328	-11.1290622
8	-12.5710409	-12.4718268	-12.6246475	-12.5532284	-12.5950777	-12.5510191
9	-14.1786819	-14.0807184	-14.2296968	-14.1472518	-14.2180418	-14.1695346

Resultados de las movilidades efectivas de los diferentes picos encontrados en las muestras de Factor de Transferencia provenientes de Ratón Balb por medio de MEKC, usando el método 3.



12.2.4. Anexo B

	TFC 1	TFC 2	TFC 3	TFC 4	TFC 5	TFC 6
10m	0	0	0	0	0	0
2	-2.49085221	-2.4661729	-2.46687706	-2.48287678	-2.47139077	-2.46296091
3	-3.93309005	-3.92227412	-3.92815719	-3.94189995	-3.93502221	-3.92394731
4	-4.94242567	-4.9349155	-4.96873549	-4.9742551	-4.96391595	-4.93677129
5	-5.38025536	-5.36980229	-5.37902505	-5.39207065	-5.39360135	-5.36590652
6	-6.38445438	-6.38439239	-6.38801383	-6.40460431	-6.39683515	-6.38707405
7	-7.29888785	-7.30452167	-7.29191148	-7.30463937	-7.29403368	-7.27354317
8	-9.87600323	-9.86856865	-9.87373529	-9.90274652	-9.89537798	-9.8632085
9	-10.1519183	-10.1436585	-10.1499789	-10.1834559	-10.1707738	-10.1492961
10	-11.9288396	-11.9198232	-11.9266665	-11.9560155	-11.9467144	-11.920082
11	-14.1290368	-14.1179106	-14.1258549	-14.1626552	-14.1514524	-14.2009195

Resultados de las movilidades efectivas de los diferentes picos encontrados en las muestras de Factor de Transferencia provenientes de Bazo de Cerdo por medio de MEKC, usando el método 3.



12.3.1. Anexo C

	TFC 1	TFC 2	TFC 3	TFC 4	TFC 5	TFC 6
1	6.172560838	6.06068192	6.16272468	6.14051726	6.20459407	6.16577707
2	4.562249719	4.31683171	4.522826	4.52283749	4.48554266	4.54768211
3	3.51075729	3.49993352	3.48160195	3.46198088	3.54928368	3.49383863
4	2.681548285	2.69403065	2.68039195	2.67190731	2.77056965	2.70377271
5	1.962120256	1.94448327	1.93111627	1.90741348	2.00398309	1.90593538
6	1.380632708	1.37208007	1.35228163	1.35408116	1.40662866	1.38748048
7	1.178363312	1.1695819	1.15659493	1.11780321	1.13659992	1.16530123
8	0.209432092	0.17723177	0.18651909	0.17348309	0.2473414	0.19505784
90m	0	0	0	0	0	0
10	-0.22618911	-0.23596441	-0.24268482	-0.25699831	-0.18938057	-0.24189413
11	-0.79552702	-0.82368912	-0.83364005	-0.85556759	-0.772485	-0.82037059
12	-2.01419792	-2.01403878	-2.0270449	-2.05136114	-1.96150163	-2.01785235
13	-3.76654875	-3.76938451	-3.77528029	-3.78394501	-3.70691782	-3.768147
14	-5.25769366	-5.26148195	-5.26827297	-5.28339044	-5.21252854	-5.25428762
15	-6.29379636	-6.29220653	-6.297641	-6.31091575	-6.22568072	-6.29533221
16	-6.45303459	-6.4491742	-6.45388856	-6.47206522	-6.38819802	-6.44859704
17	-6.92835881	-6.92904833	-6.93707668	-6.94596995	-6.85847593	-6.92306981

Resultados de las movilidades efectivas de los diferentes picos encontrados en las muestras de Factor de Transferencia provenientes de Bazo de Cerdo por medio de MEKC, usando el método 4.



12.3.2. Anexo C

	Calostro 1	Calostro 2	Calostro 3	Calostro 4	Calostro 5	Calostro 6
1	7.03257469	7.02910457	7.02271489	7.00377029	7.01252176	7.00429105
2	4.23939836	4.23543763	4.22874431	4.2403266	4.22813839	4.23808076
3	2.15460501	2.17024338	2.1645241	2.14412944	2.13378548	2.14961417
4	1.38181434	1.40271102	1.3917523	1.39810932	1.37617165	1.38945731
5 ^{OM}	0	0	0	0	0	0
6	-1.72931499	-1.68985788	-1.69453357	-1.72090124	-1.72308303	-1.7108206
7	-2.34458346	-2.30579971	-2.3167471	-2.32758004	-2.34441459	-2.317964
8	-3.38541743	-3.35363256	-3.35909769	-3.37900365	-3.39098105	-3.3642398
9	-6.12374969	-6.08249271	-6.08749683	-6.11662629	-6.11934578	-6.0815951
10	-6.86987111	-6.82833671	-6.83212514	-6.86517519	-6.85276908	-6.8347124
11	-8.24768867	-8.2078622	-8.20799688	-8.23939937	-8.23590189	-8.2036181

Resultados de las movilidades efectivas de los diferentes picos encontrados en las muestras de Factor de Transferencia provenientes de Calostro de Glioma por medio de MEKC, usando el método 4.



12.3.3. Anexo C

	Balb 1	Balb 2	Balb 3	Balb 4	Balb 5	Balb 6
1	4.49581202	4.55615843	4.55114261	4.53927293	4.55898897	4.53057588
2	2.00858708	2.0746946	2.06091119	2.03841083	2.07108761	2.04637535
3	1.26141121	1.32649135	1.30968184	1.29599225	1.33279034	1.29695539
40m	0	0	0	0	0	0
5	-1.09614568	-1.05194576	-1.09032638	-1.09408136	-1.06179495	-1.08441414
6	-2.46436735	-2.41406911	-2.41607485	-2.43653338	-2.40084121	-2.44104756
7	-4.70042591	-4.65496528	-4.65926119	-4.68040242	-4.65323358	-4.68047455
8	-5.0130828	-4.95389787	-4.95414344	-4.96943141	-4.94428869	-4.98228787

Resultados de las movilidades efectivas de los diferentes picos encontrados en las muestras de Factor de Transferencia provenientes de Ratón Balb por medio de MEKC, usando el método 4.



12.3.4. Anexo C

	C57 1	C57 2	C57 3
1	5.59830151	5.59070818	5.58128845
2	4.74210936	4.73962903	4.72887433
3	4.45657825	4.44866224	4.43553292
4	3.85406659	3.85156184	3.84097087
5	3.07536781	2.90623796	2.89763394
6	2.76494298	2.76127317	2.75810373
7	1.75597123	1.75404474	1.74906558
8	0.53918022	0.53592251	0.53110715
90m	0	0	0
10	-0.89049003	-0.89220061	-0.89516162
11	-1.78648952	-1.78742118	-1.79113361
12	-2.04534935	-2.04632321	-2.0488612

Resultados de las movilidades efectivas de los diferentes picos encontrados en las muestras de Factor de Transferencia provenientes de Ratón C57 por medio de MEKC, usando el método 4.



12.4.1. Anexo D

Parámetros inmunológicos que se modifican por los DLEs

Año publicación	Reportado por	Actividad inmunológica	Modelo
1967	Fireman	Proliferación de linfocitos específicos para tuberculina empleando DLE.	<i>In vitro</i> células humanas.
1974	Gallin y Kirkpatrick CH	Actividad quimiotáctica para neutrófilos y monocitos.	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> en monos Rhesus
1975	Levin <i>et al.</i>	Producción de células T citotóxicas específicas para células de sarcoma osteogénico, en pacientes a los que se les administró DLEs de convivientes.	<i>In vitro</i> , pacientes con sarcoma
1979	Petersen & Kirkpatrick CH	Incremento en la expresión de SRBC-receptor (actualmente identificado como CD2).	<i>In vitro</i> células humanas
1979	Petersen & Kirkpatrick CH	Aumento en la capacidad de respuesta a mitógenos por parte de los linfocitos.	<i>In vitro</i> células humanas
1979	Borkowsky & Lawrence	Inhibición de la migración leucocitaria antígeno específica.	<i>In vitro</i> células humanas
1984	Farmer <i>et al.</i>	Identificación de una molécula por debajo de 3500 Da que actúa revertiendo la inhibición de la migración de macrófagos y de PMN que produce el DLE.	<i>In vitro</i> células humanas
1987	Dorfling <i>et al.</i>	Induce la producción de IL-1 y la activación de macrófagos.	<i>In vitro</i> macrófagos humanos
1988	Nekam	Incrementa la ADCC	<i>In vitro</i> células periféricas humanas
1995	Gottlieb <i>et al.</i>	Incremento de DTH, Incremento en el receptor para IL-2 (CD25) en células CD4+.	<i>In vitro</i> células periféricas mononucleares humanas.
1995	Alvarez & Kirkpatrick CH	Secreción de IFN γ y de IL-12, específicas de antígeno.	<i>In vitro</i> células de bazo de ratón
1995	Fernández-Ortega	Inhibición de la replicación de virus de VIH de manera dosis dependiente.	<i>In vitro</i> células MT4
1995	Fernández-Ortega	Inhibición de la producción de TNF α en células	<i>In vitro</i> monocitos aislados y en sangre



		activadas con LPS.	total
1995	Kirkpatrick CH	Producción de IFN?	<i>In vivo</i> ratones sensibilizados con DLEs específicos.
1997	Vacek <i>et al.</i>	Incrementa la sensibilidad de células progenitoras hematopoyéticas al tratamiento con GMCSF	<i>In vitro</i> células de médula ósea de ratón
2000	Vacek <i>et al.</i>	Favorece la rápida recuperación de la hematopoyesis posterior a la radiación. Estimula el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas para granulocitos y macrófagos	<i>In vivo</i> modelo en ratón con DLEs humanos
2002	Vacek <i>et al.</i>	Favorece la rápida recuperación de la hematopoyesis posterior a la radiación. Estimula el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas para granulocitos y macrófagos empleando DLEs obtenidos a partir de leucocitos de cerdo.	<i>In vivo</i> modelo en ratón con DLEs de cerdo
2004	Fabré <i>et al.</i>	Incrementa la RIC , incremento en la sobrevivencia, favorece un perfil de citocinas TH1, aumento de IFN γ , IL-12 e iNOS, disminución de IL-4, combinado con tratamiento antifímico acelera la disminución de área neumónicas y de unidades formadoras de colonias.	<i>In vivo</i> modelo murino de infección con <i>M. tuberculosis</i> .
2004	Moisés A <i>et al.</i>	DLEs bovinos protegen contra el choque endotóxico causada por LPS.	<i>In vivo</i> modelo murino
NP	Pérez-Tapia SM <i>et al.</i>	DLEs humanos modulan expresión de osteopontina en células mononucleares humanas.	<i>In vitro</i> células mononucleares humanas
NP	Pérez-Tapia SM <i>et al.</i>	DLEs humanos inducen la expresión de IFN γ y RANTES.	<i>In vitro</i> células mononucleares humanas
NP	Pérez-Tapia SM <i>et al.</i>	DLEs murinos regula la expresión diferencial de DAF Y GNRP.	<i>In vivo</i> modelo murino de infección con <i>M. tuberculosis</i> .

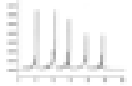
SRBC, sheep red blood cells; ADCC (antibody-dependent cell mediated); DAF (decay accelerator factor), GNRP (guanine nucleotide-releasing protein). • En 1995, Álvarez-Kirkpatrick CH propusieron en que la polarización hacia las respuestas tipo TH1 que se observan en las células tratadas con DLEs o en modelos " *in vivo* " se debe a la inhibición o supresión de las respuestas tipo TH2.



12.4.2. Anexo D

Padecimientos en los se emplean exitosamente los DLEs

I.- Inmunodeficiencias severas	III Cáncer (principalmente cuando tiene etiología viral) o para evitar metástasis específicas.
<ul style="list-style-type: none"> A.- Defectos congénitos • Síndrome de Wiskott-Aldrich • Ataxia telangiectasia • Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada • Síndrome parcial de Di George • Disgamaglobulinemia con defectos en inmunidad celular • Síndrome de Behcet 	<ul style="list-style-type: none"> • Melanoma • Cáncer de estómago • Cáncer de próstata • Cáncer de pulmón • Cáncer de colon • Osteosarcoma • Cáncer de mama • Carcinoma nasofaríngeo
II.- Enfermedades autoinmunes	IV Hipersensibilidad
<ul style="list-style-type: none"> A.- Enfermedades autoinmunes no órgano específico • Lupus eritematoso crónico discoide • Síndrome de Behcet 	<ul style="list-style-type: none"> • Asma bronquial • Dermatitis atópica • Síndrome de Hiper IgE • Alergias
	V Otros
	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de fatiga crónica • Depresión



VI.- Enfermedades Infecciosas producidas por		
A.- Hongos	B.- Virus	C.- Bacterias
<ul style="list-style-type: none">• Candidiasis mucocutánea crónica• Histoplasmosis diseminada• Coccidioidomicosis diseminada	<ul style="list-style-type: none">• Citomegalovirus• Herpes zoster• Sarampión• Varicela• Hepatitis	<ul style="list-style-type: none">• Tuberculosis• Lepra• Micobacteriosis por <i>avium</i>• Brucelosis• Gram positivas• Gram negativas
D.- Protozoarios		
<ul style="list-style-type: none">• Leishmaniasis cutánea		



12.4.3. Anexo D

Mejoría clínica observada por la administración de DLEs

Año	Reportado	Padecimiento empleado	Mejora clínica
1973	Biggard W.D.	Inmunodeficiencia severa combinada	Conversión de respuestas de DTH negativas a positivas.
1978	Spitler <i>et al.</i>	Síndrome de Wiskott- Aldrich	Conversión de respuestas de DTH negativas a positivas, mejoría clínica general
1972	Liburd <i>et al.</i>	Parasitosis por <i>Eimeria nieschulzi</i> .	La administración de DLEs obtenidos de células de ratas inmunes contra este parásito, protegió a animales no inmunes de ser infectados por el mismo
1991	Sumiyama <i>et al.</i>	Hepatitis B crónica en niños	Se observó seroconversión en los pacientes, menor detección del antígeno y no se observaron efectos adversos al compararse con el empleo de interferon alfa.
1995	Estrada-Parra <i>et al.</i>	Hepes Simplex Tipo I	Reducción en la recurrencia del padecimiento, disminución en la duración de la fase aguda del padecimiento
2001	Martín Sosa <i>et al.</i>	Dermatitis atópica	Disminución en la severidad de las lesiones comparado con el tratamiento con talidomida, disminución en el número de eosinófilos, disminución en la concentración de IgE totales, incremento en IL-2 e IFN?
1996	Pizza <i>et al.</i>	Herpes genital y labial	Reducción en la recurrencia y prevención empleando DLEs bovinos específicos para el virus.
1996	Pilotti <i>et al.</i>	Cáncer de pulmón	Adyuvante en el tratamiento, suprime micrometástasis.
1996	Pizza <i>et a</i>	Cáncer de próstata	Adyuvante a quimioterapia, dando como resultado remisión total
1998	Estrada-Parra <i>et al.</i>	Herpes zoster	Disminución del dolor en 7.85 comparado con los 12.71 del tratamiento convencional con Aciclovir
1997	Cabezas Quiroga <i>et al.</i>	Asma Bronquial extrínseca	Pacientes tratados con DLEs no presentaron crisis de broncoespasmo, disminuyeron los valores de IgE totales, se incrementaron rosetas T en el 70% de los paciente



13.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✦ Abbas, K. Abul, "Inmunología Celular y Molecular", 3ª edición, McGraw-Hill Interamericana 1999, Pp. 4.
- ✦ Altria, K. D., "Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operations, and Applications", Chapman and Hall, Londres. 1996. pp. 1-349.
- ✦ Arala, M. P. y Fundenberg, H. H. 1976, "Specificity of Transfer Factor", *Nature* 262: 155-156.
- ✦ Camillery, P., "Capillary Electrophoresis: Theory and Practice", 2da. Ed. CRC Press, Boca Ratón. Fl. 1997. 1-576.
- ✦ Cano, Ortiz Laura "Tesis: Evaluación de la Respuesta Inmunológica de Lechones Tratados con el Factor de Transferencia", Cuautitlán Izcalli, Edo. De México, 2001 FESC. Pp 22-26.
- ✦ Charles, H y Kirkpatnck, M. D. 1989,"Biological Response Modifiers. Interferons, Iterleukins and Transfer Factor", *Annals. of Allergy.* 62: 170-176.
- ✦ Dale, R. Baker, "Capillary Electrophoresis", A Wiley-Interscience Publications, Johnn Wiley & Sons.inc., New York, 1995.
- ✦ Estrada, Parra S. Nagaya, A., Serrano, E., Rodríguez, O., Santamaría V., Ondarza, R., Chávez, R., Correa, A., Monjes, A., Cabezas, R. and Estrada, García I. (1998), "Comparative Study of Transfer Factor and Aciclovir in the Treatment of Herpes Zoster", *Int. J. Immunopharm.* 20: 521-535.



- ✦ Fernández, R. T. “Evaluación del Efecto del Factor de Transferencia Mediante pruebas in vitro”, Tesis de Licenciatura. ENCB-IPN, México, D. F. 1985.
- ✦ Foret, F., “Capillary Zone Electrophoresis”, et. al. VCH Weinheim, 1993, pp 1-395.
- ✦ Fudenberg, H. H. 1989. “Transfer Factor: Past, Present and Future”, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 475-516.
- ✦ Fudenberg, H. H. and Pizza, G. 1994, “Transfer Factor 1993. New frontiers”, *Progress in Drug Research* 42: 309-400.
- ✦ Gottlieb, A. A., Sizemore, R. C., Gottlieb, M. S. and Kem, C. H. 1995, “Rationale and Clinical Results of Using Leucocyte-Derived Immunosupportive Therapies in HIV Disease”, *Biotherapy* 9: 27-31
- ✦ Guzman N. A., “Capillary Electrophoresis Technology”, Edit. Marcel Dekker, NY. pp 1-83.
- ✦ Harris, C. Daniel, “Análisis Químico Cuantitativo”, 2ª edición/ Correspondiente a la 5ª ed. Original norteamericana, Editorial Reverté S. A. 2001, Pp. 747-758.
- ✦ Holeva O H; Paster I P; Liubchenko T A; Paster le U; Kholodna L S; Zamotaierva H A Taras Shevhenko National University, Kiev (2000), “The immune reactivity transfer factor as a modulator of lymphocyte functional activity in rats”, *Fiziologichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine : 1994)*, 46 (4): 58-65.
- ✦ Huerta, López J., (2002 Ene-Abr). “Factor de Transferencia: una alternativa en el tratamiento de las enfermedades alérgicas”, *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas* 11(1): 4



- ✦ Jandik, T., "Capillary Zone Electrophoresis of Small Molecules and Ions", et. al. VCH Publishers, Cambridge, 1993. pp 1-425.
- ✦ Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., "Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries", *Anal. Chem.*, 1981, (53) : 1298-1302
- ✦ Khaledi, M. G., "High Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques and Applications", Chemical analysis series. Wiley and Sons, NY. Vol. 146. 1998 pp 1-878.
- ✦ Kirkpatnck, C. H. and Gallin, J.I. 1974, "Treatment of Infections and Neoplastic diseases Wiyh Transfer Factor", *Oncology* 29: 46-73.
- ✦ Kirkpatnck, C. H., Rozzo, S. J. and Mascali, J. J. 1985, "Murine Transfer Factor II. Transfer of Delayed Hypersensitivity to Synthetic Antigens", *J. Immunol.* 134: 1723-1727.
- ✦ Kirkpatnck, C. H., Rozzo, S. J. and Mascali, J. J. 1985, "Murine Transfer Factor III. Specific Interactions Between Transfer Factor Antigen", *J. Immunol.* 135: 4027-4033.
- ✦ Kirkpatnck, C. H., 1988, "Transfer Factor", *J. Aller. Clin. Immunol.* 81: 803-813
- ✦ Kirkpatnck, C. H. and Rozzo, S. J. 1992. "Purification of Transfer Factors". *Mol. Immunol.* 29: 167-182.
- ✦ Kirkpatnck, C. H. 1993. "Structural Nature and Functions of Transfer Factors". *Ann. NY Acad. Sci.* 685: 362.
- ✦ Klein, Jan, "Immunology, *The Science of Self-Nonself Discrimination*", Jonh Wiley & Sons, New York 1982, Pp. 263-264



- ✦ Kuhn, R., “Capillary Electrophoresis: Principles and Practices”, Edit. Springer-Verlag. Berlín. pp. 1-439.
- ✦ Lawrence, H. S. 1955. “The Transfer in Humans of Delayed Skin Sensitivity to Streptococcal M Substance and to Tuberculin With Disrupted Leukocytes”, *J. Clin. Invest.* 34: 219-230.
- ✦ Li, S. F. Y., “Capillary Electrophoresis Principles, Practice and Applications”, *Journal of Chromatography Library.* 1992 (52), 1-608.
- ✦ Mitchelson, Keith R. “Methods in Molecular Biology”, vol. 162 Capillary Electrophoresis Nucleic Acids vol I, Human Press, Tutowa, New Jersey, 2001, Pp.347-352, 371-382.
- ✦ Mulcahy, G. y Quinn, P.J. 1986 “A Review of Immunomodulators and Their Aplacation in Veterinary Medicine”, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 9: 119-139
- ✦ Olsen, R. G. and Krakowa, S., “Inmunología e Inmunopatología de Animales Domésticos” El Manual Moderno, México, D. F. 1983.
- ✦ Padierna, J., Velasco, C. O. y Estrada, P. S. 1967, “Obtención del Factor de Transferencia Específico Para el Tratamiento de Pacientes con coccidioidomycosis”, *Memorias del primer Congreso Nacional de Inmunología Oaxtepec, Morelos, México* 1967, 107-104. Sociedad Mexicana de Inmunología.
- ✦ Palfrey, Stephen M., “Methods in Molecular Medicine; Clinical applications of Capillary Electrophoresis”, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999, Pp 1-9.
- ✦ The United States Pharmacopeia. The National Formulary, 2003. The Official Compendia of Standards.



- ✦ Quesada, M. A., Zang, S., "Multiple capillary DNA sequencer that uses fiber-optic illumination and detection". Electrophoresis 1996, 17(12). 1841.
- ✦ Righetti, P. G., William, H., "Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology", CRC Press, Boca Raton. 1996. pp. 1-576.
- ✦ Rodríguez Flores A., 2002, "El efecto terapéutico del factor de transferencia en el tratamiento de pacientes con dermatitis atópica grave", Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas. 11 (1): 9-10.
- ✦ Rodríguez, Ropón Andrea y Estrada Parra S. 2003 "Factor de Transferencia y Cáncer", Revista FESC Divulgación Científica Multidisciplinaria, Año 3, 10 Oct-Dic 2003, pp 26-32.
- ✦ Roitt, M. Ivan, "Encyclopedia of Immunology", second edition, volume three, Edited by peter J. Delves, Academic Press Limited, London 1992, Pp. 1496-1498.
- ✦ Roitt, M. Ivan, "Encyclopedia of Immunology", second edition, volume four, Edited by peter J. Delves, Academic Press Limited, London 1998, Pp. 2385-2389.
- ✦ Rojas, Espinoza Óscar, "Inmunología de Memoria", 2ª edición, Editorial Médica Panamericana 2001 Pp. 114-116, 304-305.
- ✦ Rouessac, Francis, "Análisis Químico, Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas Teoría y Ejercicios Resueltos", McGraw-Hill Interamericana, 2000, Pp. 120-129.
- ✦ Skoog, Douglas A., "Principios de Análisis Instrumental", 5ª edición, McGraw-Hill, 1992, Pp. 845-854.



- ✦ Strege, Mark A., "Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides" Methods In Molecular Biology Volume 276, Human Press, 2004, Pp. 77-120.
- ✦ Sudhir, Agrawal. "Methods in Molecular Biology; Protocols for Oligonucleotide Conjugates Synthesis and Analytical Techniques", vol. 26, Human Press, Totowa, New Jersey, 1994, Pp 276-300.
- ✦ Sudhir, Gottlieb, A. A. 1988, "Immunomodulatory Components Present in IMREG-I an Experimental Immunosupportive Biologic" *Biootechnology*, 6, 810-815.
- ✦ Tsakalos, Nikolaos D.; Theoharides, Theoharis C.; Kops, Sandra Kraeuter; Dwyer, John M.; Askenase, Philip W. Sch. Med., Yale Univ. USA 1982, "Dialyzable leukocyte extract induces mast cell secretion", *Cellular Immunology*, 66(2): 383-93.
- ✦ Vanderbark, A. A., Burger, D. R. and Veto, R. M. 1977, "Human Transfer Factor Activity in the Guinea Pig. Absence of Antigen Specific", *Clin. Immunol. Immunopathol.* 8: 7-16.
- ✦ Weinberger, R. "Practical Capillary Electrophoresis", 2a. Ed., Academic press, San Diego, Sea. 2000 pp. 1-462.
- ✦ Wher, Tim, "Capillary Electrophoresis of Proteins", Marcel Dekker, 1999, Pp. 25, 37-49, y 237.
- ✦ Wilson, G., y Fundenberg, H. 1976, "Human Transfer Factor in guinea pigs: partial purification of the active component. In Transfer Factor Basic Properties and Clinical Applications", New York Academy Press. Pp 409-423.



Identificación del Factor de Transferencia (TF) Presente en el Extracto Dializable de Leucocitos (DLE) por Medio de Electroforesis Capilar



- ✦ Zapata, J. D. y col 1981, “Immunotherapy of Two Leprosy Patients UIT Specific Transfer Factor”, *National Congress of Immunology. Abstract IV. Oaxtepec Morelos, México, D.F.*
- ✦ Zielinski C C; Savoini E; Ciotti M; Orani R; Konigswieser H; Eibl M M (1984 Mar), “Dialyzable leukocyte extract (transfer factor) in the treatment of superinfected fistulating tuberculosis of the bone”, *Cellular immunology* 84(1):