



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE OBTENCIÓN PARA EL
FACTOR DE TRANSFERENCIA EN CALOSTRO BOVINO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

MARÍA NITZINÉ GÁLVEZ PARRA

ASESOR: DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Primero que nada agradezco a Dios por darme una gran familia, salud y fortaleza.

A mis padres Dolores Parra y Alberto Gálvez quienes han sido mi influencia y motivación para no darme por vencida y salir adelante. Nunca me han dejado sola y este trabajo tiene una especial dedicación a ustedes el cual es fruto de su esfuerzo.

A mi hermano Alberto Gálvez Parra quien me ha estado conmigo en todos los momentos que lo he necesitado.

A mis abuelos Luz Torres y Luis Parra, Rosario Díaz y Alfonso Gálvez (q.e.d) que con sus valores y ejemplo de vida, me impulsaron a tener grandes aspiraciones.

A mi familia quienes ante la adversidad no pierden la capacidad de sonreír y ser felices.

A Joel Castillo que formaste parte de mi vida te agradezco tu tiempo, cariño y comprensión, se que después de conocerte soy una mejor persona.

A Martín Arcique me motivaste a terminar la tesis, gracias a ti soy más madura y consciente de lo que hago.

A mi asesor el Dr. Andrés Romero quien me brindó la oportunidad de trabajar en el proyecto de factor de transferencia, no solo es un buen profesor si no también una excelente persona.

A Cipi, Erik y Asaf quienes me apoyaron en esta tesis, gracias por su tiempo y apoyo, que este sea el principio de una gran amistad.

A los compañeros del CUD sobre todo Don Chucho de quien aprendí análisis clínicos.

A mi jurado que con sus objetivos y asertivos consejos hicieron mejor este trabajo.

INDICE

| | Pág. |
|---|------|
| Índice de Tablas | I |
| Índice de Figuras | I |
| Abreviaturas | II |
| Resumen | III |
| 1. Introducción | |
| 1.1 Generalidades del Factor de transferencia | 1 |
| 1.1.1 Factor de Transferencia (FT) | 1 |
| 1.1.2 Antecedentes Históricos | 1 |
| 1.1.3 Fuentes de obtención del FT | 2 |
| 1.1.3.1 Factor de Transferencia polivalente | 3 |
| 1.1.3.2 Factor de Transferencia Antígeno específico | 4 |
| 1.1.4 Estructura del FT | 5 |
| 1.1.5 Componentes del FT | 7 |
| 1.1.6 Mecanismo de acción de FT | 8 |
| 1.1.7 Actividad inmunológica de los FT | 9 |
| 1.1.8 Usos clínicos del FT | 10 |
| 1.2 Modelo para la evaluación de la funcionalidad de FT | 12 |
| 1.2.1 Prueba de Hipersensibilidad Retardada | 12 |
| 1.3 Importancia del calostro | 13 |
| 1.3.1 Componentes del calostro bovino | 15 |
| 1.3.2 Factores que afectan la calidad del calostro | 18 |
| 2. Justificación | 19 |
| 3. Hipótesis | 20 |
| 4. Objetivos | 21 |
| 4.1 Objetivo General | 21 |
| 4.2 Objetivos particulares | 21 |

| | |
|--|----|
| 5. Materiales y Métodos | 22 |
| 5.1 Obtención del FT | 22 |
| 5.1.1 Recolección del calostro | 22 |
| 5.1.2 Ultra centrifugación como método de separación de fase | 22 |
| 5.1.3 Diálisis | 22 |
| 5.1.4 Esterilización por filtración | 23 |
| 5.1.5 Acondicionamiento previo a la liofilización | 23 |
| 5.1.6 Liofilización | 23 |
| 5.2 Estudios de composición bioquímica | 25 |
| 5.2.1 Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford | 25 |
| 5.2.2 Cuantificación de carbohidratos por el método de Ácido sulfúrico | 25 |
| 5.3 Estudios de actividad biológica | 26 |
| 5.3.1 Prueba de DTH en modelo murino | 26 |
| 6. Resultados | 28 |
| 7. Discusión | 34 |
| 8. Conclusiones | 40 |
| 9. Referencias | 41 |

I. INDICE DE TABLAS

| No. de Tabla | Descripción | Pág. |
|---------------------|---|-------------|
| 1 | Actividad biológica de EDL que contiene FT | 9 |
| 2 | Uso del Factor de Transferencia como tratamiento de diversas enfermedades | 11 |
| 3 | Composición del calostro y leche en vacas Lecheras | 14 |
| 4 | Propuesta para estandarizar la liofilización del dializado | 23 |
| 5 | Condiciones óptimas de la liofilización | 28 |
| 6 | Estandarización del proceso de obtención de FT | 28 |

II. INDICE DE FIGURAS

| No. de Figura | Descripción | Pág. |
|----------------------|--|-------------|
| 1 | Obtención del FT polivalente de sangre humana | 3 |
| 2 | Obtención del FT específico de sangre humana | 4 |
| 3 | Obtención del FT específico | 5 |
| 4 | Estructura base del factor de transferencia | 6 |
| 5 | Prueba de DTH en modelo murino | 26 |
| 6 | Resumen del proceso de obtención de FT de proveniente de calostro bovino | 26 |
| 7 | Gráfica que representa curva patrón de carbohidratos | 29 |
| 8 | Gráfica que representa la curva patrón de proteínas | 30 |
| 9 | Histograma que representa la prueba de DTH | 32 |

III. ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| ADCC | Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos |
| CLF-H | Campana de flujo laminar horizontal |
| DLE | Extracto dializable de leucocitos |
| DTH | Hipersensibilidad de tipo IV del inglés Delayed-type-Hypersensitivity |
| FT | Factor de Transferencia |
| FTc | Factor de Transferencia de calostro |
| FT's | Factores de transferencia |
| g | Gravedades |
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos- macrófagos |
| HT | Hipersensibilidad tardía |
| i.d | Intradermo-reacción |
| IgE | Inmunoglobulina E |
| IL | Interleucina |
| KDa | Kilodaltons |
| M | Molar |
| mBar | Milibar |
| µg | Microgramos |
| µl | Microlitro |
| mL | Mililitros |
| LPS | Lipopolisacáridos |
| PPD | Proteína derivada purificada |
| RIC | Respuesta inmune celular |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SSF | Solución salina fisiológica |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| VIH | Virus de inmunodeficiencia humana |

RESUMEN

El Factor de Transferencia (FT) es un conjunto de moléculas de constitución ribonucleopéptica producidas por leucocitos y puede transferir el fenotipo de los linfocitos T de memoria a linfocitos T "naive" que no han estado en contacto con el agente patógeno.

Con base en los lineamientos establecidos para la obtención de FT a partir de sangre, se planteó un protocolo en el cual se estandariza una técnica que permita obtener FT de calostro bovino.

Se obtuvo calostro de 3 vacas positivas a tuberculina con la intención de obtener Factor de Transferencia específico en las primeras horas post-parto, posteriormente se realizaron distintas pruebas con variación en las condiciones de ultra centrifugación, diálisis y liofilización hasta encontrar los procesos más adecuados para la obtención del dializado; a este se le determinaron proteínas totales por el método de Bradford. Para comprobar en la fracción obtenida había FT y que transferían inmunidad de manera específica se efectuaron pruebas de Hipersensibilidad de tipo retardado para *Micobacterium tuberculosis*, en 13 ratones, 5 de los cuales se sensibilizaron con PPD, 5 con FT y 3 control, los ratones inoculados con FT mostraron una respuesta de inflamación similar a la inducida por *M. tuberculosis* a las 24 y 48 h. Demostrando que el dializado obtenido fue capaz de transferir inmunidad específica hacia el PPD por lo que se sugiere que presente actividad de FT.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del Factor de Transferencia

1.1.1 Factor de Transferencia

El Factor de Transferencia es un conjunto de moléculas oligoribonucleopépticas de bajo peso molecular (menor a 12 KDa) obtenidas de dializado de leucocitos cuya función terapéutica es la inmunomodulación (Kirpatrick 2000).

1.1.2 Antecedentes Históricos

En 1940 Leinstein y Chase fueron los primeros científicos en transferir inmunidad de leucocitos viables de cobayos sensibilizados con tuberculina a cobayos no sensibilizados. Para 1949 Lawrence, utilizando leucocitos viables de un individuo con DTH positiva a tuberculina, los transfiere a otro individuo no sensibilizado, éste al ser retado con el antígeno mostró una intradermorreacción positiva (Lawrence, 1949)

En 1955 Lawrence y col. transfieren DTH empleando extractos solubles de leucocitos, al componente activo de estos extractos se le llamó Factor de Transferencia (Lawrence, 1955).

En 1961 Jensen y col. demostraron que la inmunidad de un individuo con intradermorreacción positiva a tuberculina, podía ser transferida por EDL a otro individuo que era negativo a tuberculina y este individuo que ahora era positivo, también podía transferir la respuesta a otro individuo negativo, hacerlo positivo y así sucesivamente, sugiriendo que el FT se encontraba libre de antígeno (Jensen y col. 1961).

En 1963 Lawrence y col. demostraron que el extracto dializable de leucocitos era capaz de pasar por una membrana de diálisis de corte de 10KDa sin perder su actividad biológica (Lawrence y col. 1996).

En 1981 Borkowsky demuestra que los FT obtenidos dentro de los extractos eran capaces de unirse específicamente al antígeno que les daba origen, pero no así a los anticuerpos contra el mismo antígeno (Borkowsky, 1981).

Kirkpatrick realizó un estudio de DTH, empleando antígenos sintéticos para inmunizar ratones y obtener EDL, al igual que Petersen lo hizo con antígenos como PPD y ferritina. Los animales solo presentaron una DTH positiva con el antígeno con el cual el donador había sido inmunizado (Kirkpatrick, 1985 a).

En 1985 Kirkpatrick comprobó que la especificidad de una intradermoreacción podía ser transferida por EDL y afirmó que se trata de eventos inmunológico específicos. Utilizando ratones inoculados con un antígeno, los ratones receptores solo respondieron a ese antígeno específico (Kirkpatrick, 1985 b).

1.1.3 Fuentes de obtención del FT

El FT puede obtenerse de leucocitos de sangre periférica, de linfonodos de bovino, bazo y placenta de diferentes especies como ratones, ratas, cobayos, burros, vacas, cabras, caballos, perros, gatos, cerdos, primates y otras especies como el hombre (Fundenberg, 1993). En la actualidad se buscan otras fuentes de obtención que convengan como es el caso del calostro ya que se encuentra concentrado 1000 veces más que en sangre (Wilson y col., 1989).

1.1.3.1. FT polivalentes

Los FT's polivalentes se consiguen a partir de leucocitos de sangre periférica que son lisados por choque térmico o sonicación y sometidos a diálisis con corte de 10 KDa. (Figura 1). Se les llama polivalentes ya que son capaces de transferir tantas respuestas celulares como respuestas positivas presenta el donador (S. Estrada, 2009)



Fig. 1. Obtención del FT de sangre humana Fuente: Dr. S. Estrada IPN

1.1.3.2. FT antígeno específico

A) Los leucocitos purificados se incuban con el antígeno al cual el donador es reactivo. Solamente el FT específico al antígeno es liberado al medio de cultivo, por lo que son los sobrenadantes los que mantienen la capacidad de transferencia (S. Estrada, 2009). (Figura 2).

B) Se sensibilizan con cierto antígeno a animales de experimentación, se da tiempo a que genere respuesta positiva, se procede a la obtención de sangre, órganos o en algunos casos calostro (Figura 3).

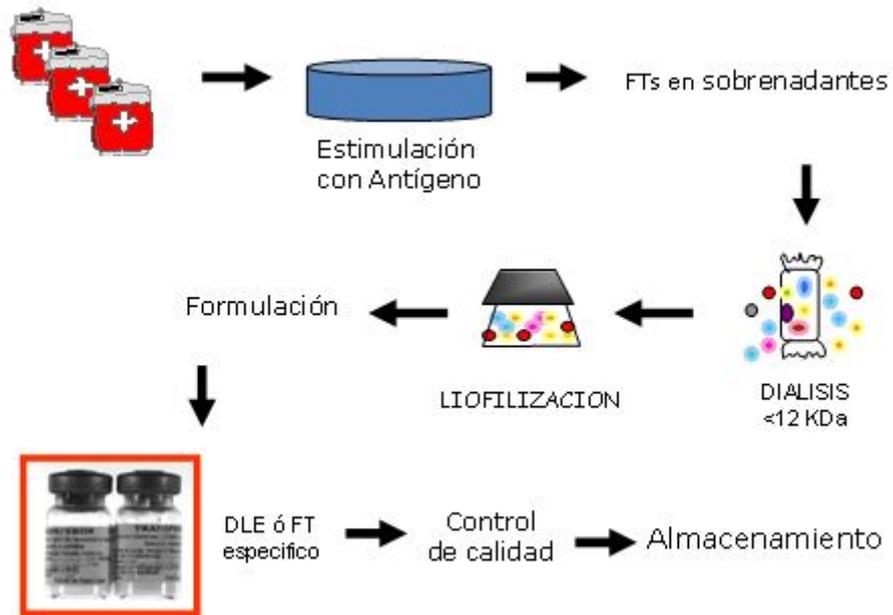


Fig. 2. Obtención del FT de sangre humana
Fuente: Dr. S. Estrada IPN (MODIFICADO)

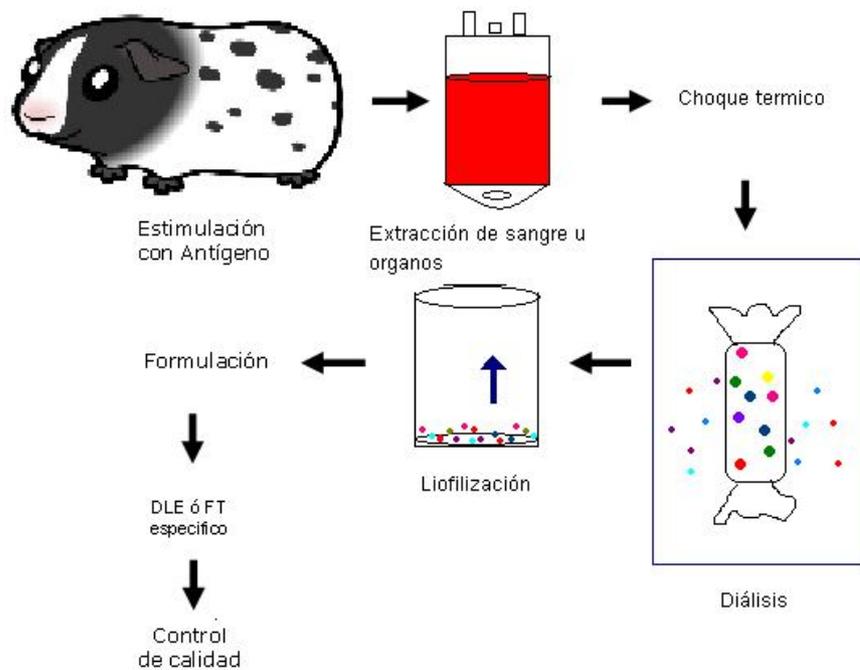


Fig. 3 Obtención de FT específico de sangre u órganos de animales

1.1.4 Estructura del FT

Por estudio de electroforesis capilar y HPLC se han descrito que el FT está integrado por cuatro fracciones de las cuales se han estudiado tres de ellas: la fracción I posee actividad mitógena, la fracción III tiene la capacidad de transferencia de DTH y en la fracción IV se identificó nicotinamida, un inmunosupresor (Kirkpatrick, 1996).

De acuerdo a su estructura y actividad biológica se denomina al FT como un inmunomodulador.

Tiene una fracción con PM mayor a 5 KDa que inhibe la migración de leucocitos dependiente de antígeno, los componentes activos de los EDL son moléculas de ribonucleoproteínas unidas a moléculas parecidas a RNA, además se ha demostrado la presencia de lisina, glicina, serina y ácido glutámico.

Kirkpatrick y Rozzo en 1992 purificaron un FT específico por técnicas como cromatografía de fase reversa y HPLC, a partir de EDL de ratones que fueron inmunizados con albúmina de huevo y ferritina de caballo. Ellos observaron que los FT's son moléculas hidrofílicas altamente polares, pesan alrededor de 5000 Da y se encuentran dentro de los componentes del DLE's (Rozzo y Kirkpatrick, 1992). Kirkpatrick y col. Confirmaron que el factor de transferencia presenta sitios constantes y también sitios variables, los cuales sugieren que son antígeno específicos, además observaron que cada molécula de factor de transferencia tiene aproximadamente 45 aminoácidos y considerando las posibles combinaciones de los 20 aminoácidos conocidos que son requeridos en el organismo, deben existir millones de variaciones en la estructura y reconocimiento específico de un antígeno (Figura 4). (Kirkpatrick, 2000).

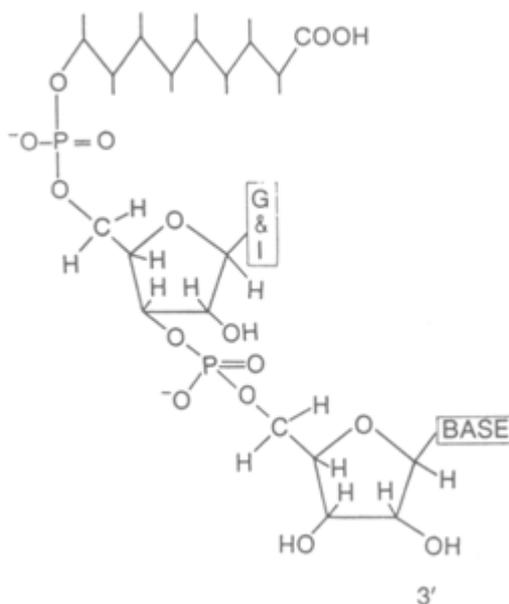


Fig 4. Estructura base del factor de transferencia

Fuente: Estrada Parra , 2009

Kirpatrick logró identificar dos péptidos diferentes que son constantes en todos los EDL murinos y bovinos analizados. Las secuencias se obtuvieron por HPLC consiguiendo la secuencia de aminoácidos conservada: LLYAQDL/VEDN. Lo interesante es que solo estos péptidos son capaces de inhibir la transferencia de DTH cuando se administran en conjunto con el EDL específico, llegando a la conclusión de que los péptidos aislados y secuenciados podrían estar en una competencia por el sitio activo del FT en la célula blanco y muy probablemente corresponden a una fracción del factor de transferencia que se une de forma específica e independiente del antígeno (Kirkpatrick 2000).

Lawrence demostró que las moléculas en los EDL responsables de la transferencia de DTH era biuret positivo, orcinol positivo, resistente a DNAsa, a RNAsa pancreática y a tripsina (Lawrence, 1963). Spitler y col. demostraron que la digestión enzimática con pronasa eliminó la actividad biológica del EDL pero se mantuvo estable después de un calentamiento a 56 ° C por 2 h por lo anterior se sugirió que su naturaleza del EDL podría ser peptídica (Spitler y col, 1972).

A partir de un EDL bovino específico contra PPD Wilson y Funderberg purificaron e factor de transferencia encontraron que era soluble en agua, insoluble en fenol o éter y

que se precipita con etanol. También sometieron al EDL bovino a la acción de endonucleasas, exonucleasas, proteasas y fosfatasa llegando a la conclusión de que este tenía una estructura de oligorribonucleopéptido (Wilson, 1982 y Fundenberg 1989).

1.1.5 Componentes del FT

El FT de transferencia está compuesto por 44 aminoácidos e incluye tres fracciones: I) inductora, II) específica y III) supresora.

La fracción antigénica específica del FT está formada por dos secciones, la primera posee de 8-12 aminoácidos y la segunda por 10 aminoácidos que tiene alta afinidad por el receptor del linfocito T (Lisonbee 2004).

Las tres fracciones poseen distintos pesos moleculares, el 1% constituido por moléculas mayores a 10 KDa, menos del 10% se encuentran moléculas con un peso molecular menor a 1 KDa, del 10 al 30% con peso molecular entre 1 a 2 KDa y del 65 al 95% con peso molecular entre 2 y 6 KDa (Pekarek, 2007).

1.1.6 Mecanismo de acción del FT

No se tiene establecido un mecanismo de acción del FT, aunque se tienen diversas opiniones que se han planteado, entre las que se pueden señalar:

1. Si el FT forma parte del TCR, entonces sería necesario para la activación de los linfocitos, al unirse el Ag a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y de las células presentadoras de antígeno (APC). (Kirkpatrick, 1993). Esta opinión no es del todo adecuada ya que no hay Ag que presentar al momento de transferir inmunidad con el FT por lo tanto no hay interacción con las APC.

2. La porción ribonucleotídica del FT se une por complementariedad al DNA que se encuentre en la superficie de la célula y una vez unidos son internalizados por medio de un receptor de DNA. (Cech 1987).

3. Lawrence propuso en 1969 que el FT podría desbloquear o deprimir poblaciones de linfocitos T, responsables de la inmunidad celular y por tanto modular la misma.

4. En 1995, Alvarez y Kirkpatrick propusieron que la polarización hacia la respuesta tipo Th1 se debe a la inhibición o supresión de la respuesta de tipo Th2.

Ninguna de ellas ha sido aceptada plenamente, pues falta investigar para poder explicar cada uno de los efectos encontrados.

1.1.7 Actividad inmunológica de los FT's

En la mayoría de los ensayos se utilizan extractos completos, moléculas de hasta 12 KDa. Se han encontrado diversas actividades inmunológicas como son:

Tabla. No. 1 Actividad biológica de EDL que contiene FT

| AÑO | REPORTADO POR | ACTIVIDAD | MODELO |
|------------|-----------------------|---|--|
| 1967 | Fireman | Proliferación de linfocitos específicos para tuberculina empleando EDL | Células humanas, <i>in vitro</i> |
| 1974 | Gallin y Kirpatrick | Actividad quimiotáctica para neutrofilos y monocitos | Monos Rhesus, <i>in vitro e in vivo</i> |
| 1975 | Levin y col. | Producción de células T citotóxicas específicas para células de sarcoma osteogénico, en pacientes a los que se les administró EDL de convivientes | Pacientes con sarcoma, <i>in vitro</i> |
| 1979 | Petersen y Kirpatrick | Incremento de la expresión de SRBC-receptor (actualmente identificado como CD2) | Células humanas, <i>in vitro</i> |
| 1979 | Petersen y Kirpatrick | Aumento de la capacidad de respuesta a mitógenos por parte de linfocitos | Células humanas, <i>in vitro</i> |
| 1979 | Borkowsky y Lawrence | Inhibición de la migración leucocitaria antígeno específica | Células humanas, <i>in vitro</i> |
| 1984 | Farmer y col. | Identificación de una molécula por debajo de 3.5 KDa que actúa revirtiendo la inhibición de migración de macrófagos y de PMN que produce el EDL | células humanas, <i>in vitro</i> |
| 1987 | Dorfing y col. | Inducción de la producción de IL-1 y la activación de macrófagos | Macrófagos humanos, <i>in vitro</i> |
| 1988 | Nekam | Incremento de la ADCC | Células periféricas humanas, <i>in vitro</i> |

Continuación de tabla Actividad biológica de EDL que contiene FT

| | | | |
|------|----------------------|--|--|
| 1995 | Gottlieb y col. | Incremento de DTH e incremento en el receptor para IL-2 (CD25) en células CD4+ | Células mononucleares humanas periféricas, <i>in vitro</i> |
| 1995 | Álvarez y Kirpatrick | Secreción de IFN- γ y de IL-12 | Células de bazo de ratón |
| 1995 | Fernández-Ortega | Inhibición de la replicación de VIH de manera dosis dependiente | Células MT4, <i>in vitro</i> |
| 1995 | Fernández-Ortega | Inhibición de la producción de TNF- α en células activadas con LPS | Monocitos aislados y en sangre total, <i>in vitro</i> |
| 1995 | Kirpatrick | Producción de IFN- γ | Ratones sensibilizados con EDL específicos, <i>in vivo</i> |
| 1997 | Vacek y col. | Incremento de la sensibilidad de células progenitoras hematopoyéticas al tratamiento con GMCSF | Células de médula ósea de ratón, <i>in vitro</i> |
| 2000 | Vacek y col. | Rápida recuperación de la hematopoyesis posterior a la radiación. Estimula el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas para granulocitos y macrófagos | Modelo en ratón con EDL humanos, <i>in vivo</i> |
| 2004 | Fabre y col. | Incremento de la RIC, incremento en la supervivencia, favorece un perfil de citocinas Th1, aumento de IFN- γ , IL-12 e iNOS, disminución de IL-4, combinado con tratamiento antituberculoso acelera la disminución de área neumónica y de unidades formadoras de colonias | Modelo murino de infección con <i>M. tuberculosis</i> , <i>in vivo</i> |
| 2004 | Moisés y col. | EDL bovino protege contra el choque endotóxico causada por LPS | Modelo murino, <i>in vivo</i> |

(Peréz, 2006)

1.1.8 Usos clínicos del FT

El FT se puede administrar por vía oral o parenteral teniendo el mismo efecto terapéutico debido a que el FT es resistente a la desnaturalización por el HCl del estómago.

Tabla. No. 2 Uso del Factor de Transferencia en el tratamiento de diversas enfermedades

| TRATAMIENTO DE INFECCIONES CON FT | | | |
|---|---|---|---|
| HONGOS | BACTERIAS | VIRUS | PROTOZOARIOS |
| <ul style="list-style-type: none"> * Candidiasis mucocutánea * Coccidiomicosis diseminada * Histoplasmosis | <ul style="list-style-type: none"> * Brucelosis * Lepra * Tuberculosis | <ul style="list-style-type: none"> * Citomegalovirus * Hepatitis * Herpes * Sarampión * Viruela * VIH | <ul style="list-style-type: none"> * Leishmaniasis cutánea |
| <p style="text-align: center;">TRATAMIENTO DE INMUNODEFICIENCIAS SEVERAS CON FT</p> <ul style="list-style-type: none"> * Síndrome de Wiskott - Aldrich * Ataxia telangiectasia * Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada * Síndrome de Di George Disgamaglobulinemia con defectos en inmunidad celular | | | |
| <p style="text-align: center;">TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES CON EL USO DE FT</p> <ul style="list-style-type: none"> * Lupus eritematoso sistémico * Síndrome de Bechet | | | |
| <p style="text-align: center;">TRATAMIENTO DE CÁNCER CON EL USO DE FT</p> <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 * Hipernefroma | | | |

(Estrada Parra, 1998, 2004, 2007; Rodríguez-Serrano 2002, Spitler 1972)

1.2 Modelo para la evaluación de la funcionalidad de FT

1.2.1 Prueba de hipersensibilidad retardada empleando derivado proteico purificado

En el año de 1890 Robert Koch notó que al inyectar tuberculina por vía subcutánea a individuos con tuberculosis resultaba en una induración local. Con esta reacción, condujo a la detección de la infección causada por *Micobacterium tuberculosis*.

La hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) es un ensayo *in vivo* de la respuesta inmune dependiente de las células T que se manifiesta como una reacción inflamatoria que alcanza su máxima intensidad desde 24 hasta 48 h después del reto antigénico. Las mediciones directas de DTH se obtienen fácilmente en el hombre o conejillos de indias. Es más difícil obtener respuestas DTH en ratones, sin embargo, para ello, el antígeno se inyecta por vía subcutánea en la pata trasera de un ratón previamente preparado. La reacción se produce en el sitio de deposición de antígeno, la piel es el sitio de costumbre para evocar la DTH en sistemas de experimentación (Yi Lou, 2001).

Este ensayo *in vivo* ha sido utilizado desde los inicios en la investigación del factor de transferencia hasta la actualidad (Papaport 1960, Lawrence 1963, Kirkpatrick 1980, Petersen 1981, Liubchenko 1997) para evaluar su actividad biológica. En este trabajo se usa la prueba de DTH en modelo murino para comprobar la transferencia de inmunidad de vacas positivas a tuberculina a través del dializado obtenido.

1.3 Importancia del calostro

El calostro es el primer alimento en la vida, es producido por las glándulas mamarias durante las primeras 72 h posparto. En comparación con la leche es manifiestamente distinto en su composición. Su proceso de formación comienza alrededor de 15 días antes del parto y concluye aproximadamente cuatro días posteriores al mismo en los bovinos (Smith, 1982).

Debido a que en las especies de placentación completa (vaca, yegua, cerda, oveja), no hay acceso de anticuerpos por esta vía, es importante el consumo de calostro durante las primeras horas de vida. La vaca no transfiere inmunidad al ternero por vía placenta debido a que estas especies poseen placenta epiteliocorial, por lo tanto el ternero nace sin anticuerpos y es totalmente indefenso contra las infecciones del medio por el cual la vaca le da la inmunidad al ternero es por el calostro (Estein y col., 1994).

Este fluido especial no lácteo contiene poderosos factores inmunológicos y de crecimiento para asegurar la supervivencia y la salud del recién nacido. El crecimiento y los factores inmunológicos de nuestro cuerpo decaen tras la pubertad o la enfermedad. Se ha probado que el calostro ayuda a reemplazar los componentes vitales y solamente el calostro bovino, de vacas lecheras, ha demostrado ser seguro y biológicamente compatible con los humanos (Morton, 1999).

En el año 1922, Smith y Little, dieron a conocer la importancia del calostro en la memoria inmunitaria y su transferencia al observar que los terneros recién nacidos que no lo recibían por lo general fallecían. Especularon que un factor en el calostro protegía a los terneros de alguna manera (Smith, 1922). Años después, McGuire y col. documentaron que la falla cuantitativa de transferencia pasiva de anticuerpos traía altos grados de susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Smith, 1982).

En 1956 Kerr mostró que algunos terneros tenían más respuesta inmunitaria efectiva para ciertas enfermedades como la tuberculosis. Dado que no todos los agentes infecciosos, como la tuberculosis, son controladas de forma eficaz por la actividad exclusiva de los anticuerpos, se pudo haber interpretado en la observación que los

factores que formaban al calostro, además de los anticuerpos, contribuyeron a la competencia inmunitaria completa del recién nacido (Kerr, 1956).

Schlessinger en 1977 sugirió la transferencia de función e información activa inmunitaria en la leche y el calostro humano. Los neonatos de madres con resultados positivos en la prueba de PPD – Tuberculina, tenían linfocitos circulantes reactivos a la tuberculina en los ensayos *in vitro*, mientras que los neonatos de madres no reactivas no los tenían según las estadísticas (Schlesinger, 1977).

Se realizaron posteriores investigaciones sobre la biología inmunitaria de las glándulas mamarias que mostraron claramente que sus funciones inmunitarias son mucho más que la concentración de anticuerpos para la síntesis de calostro. En 1977, Bennett y Jasper estaban evaluando la cantidad de leucocitos en las secreciones de las glándulas mamarias que no estaban lactando. Las semanas previas al parto, las glándulas sanas producían un gran número de células mononucleares en las secreciones. Se especulaba que una enfermedad latente fuese la causa; sin embargo, el examen de vacas jóvenes no infectadas revelaba un patrón similar. La presencia de las células mononucleares durante la formación del calostro sugería un papel de inmunidad celular para la protección inmunitaria del neonato a través del calostro (Bennett, 1977).

Duhamel y col. (1987) observaron grandes poblaciones de linfocitos T y B en las secreciones mamarias que no estaban lactando. Quizás por primera vez, los investigadores sugirieron que esto podría ser un evento esencial en la transferencia de inmunidad celular a través del calostro. Al igual que el trabajo de Lawrence, estos investigadores sugirieron que una sustancia similar a los factores de transferencia o células intactas transmitía la reactividad a la tuberculina (Duhamel y col, 1987). La evidencia de que los factores derivados del calostro educan y activan específicamente al sistema inmunitario del neonato fue desarrollada de modo significativo por Wilson (1988), su trabajo demostró varios atributos importantes de propiedades de incremento de la inmunidad celular en los extractos del calostro. Los agentes infecciosos exclusivos de las aves de corral se utilizaron para vacunar al ganado antes del parto y de la producción del calostro. Se inyectó un extracto dializado de linfocitos del calostro en las aves de

corral que no tenían agentes patógenos. Las aves a las que se les inyectó el extracto dializado demostraron reactividad *in vivo* e *in vitro* a los agentes patógenos específicos utilizados para vacunar al ganado. Las aves que no recibieron el extracto dializado no tuvieron reacción en ningún ensayo. No se observó reactividad cruzada que indicara la especificidad de la vacuna para evaluar el sistema antígeno (Wilson 1988). El trabajo también muestra que este “factor de transferencia” funciona entre especies ampliamente divergentes. Por medio de vacunación exógena, se puede lograr una mayor influencia de los factores de transferencia del calostro.

1.3.1 Componentes del calostro bovino

El calostro bovino contiene:

- Sustancias inmunomoduladoras

Entre las que se encuentran: IL-1 β , IL-6, contiene cantidades significativas de TNF α e INF γ , mensajeros químicos como lo es el FT (Hagiwara y col., 2000).

- Factores de crecimiento

Son esenciales en la creación y mantenimiento de huesos, músculos, nervios, y cartílagos, así como otras funciones esenciales.

- Inmunoglobulinas

En las horas que preceden y que siguen al parto hay una verdadera transudación de proteínas séricas, en particular Igs que formarán parte del calostro. Su importancia ha sido demostrada en la prevención de la diarrea neonatal, septicemias y afecciones respiratorias de diversa etiología.

IgG: Las IgG forman la mayor parte de las Ig calostrales en el bovino. La relación IgG1/IgG2 próxima a 1 en el adulto, en el calostro se modifica a favor de la IgG1, que representa el 70-80 % de las proteínas calostrales.

IgM: Siguen en orden cuantitativo a las IgG. Representan el 10 % de las Igs calostrales.

IgA: El sistema inmunitario de los bovinos parece ser deficiente en IgA. En el calostro, el 50 % es de origen local, producido por las células plasmáticas submucosas del acino mamario; la otra mitad es de origen sérico (Estein, 1994).

. A pesar de tener estos anticuerpos no hay garantía de que el becerro no se enferme pero puede minimizar la severidad de una enfermedad y provee la capacidad inmunitaria para rechazar y luchar contra los organismos invasores. Los anticuerpos también estimulan el propio sistema inmunológico del becerro para crear inmunidad a la invasión por organismos causantes de enfermedades (Ulrich, 1997).

. Un alto nivel de *proteínas* y poca grasa. El poco desarrollado sistema intestinal de un infante no está preparado para procesar grasas, así que la naturaleza provee el óptimo porcentaje de proteínas y grasa durante ese tiempo. La concentración de proteína de un primer a un segundo ordeño baja en un 4.4 % aproximadamente.

El calostro contiene también factores *antimicrobianos*, responsables de una resistencia. Entre éstos cabe mencionar a las lisozimas que actúan sobre el peptidoglicano de la pared celular de las bacterias gram positivas .El calostro contiene lactoferrina que provoca la carencia de hierro en las bacterias que son exigentes en este factor para su desarrollo (Estein, 1994).

Las secreciones mamarias bovinas contienen varios tipos de leucocitos: polimorfonucleares (PMN), linfocitos y macrófagos (Lee, 1980). Las células epiteliales constituyen menos de un 2% del número total de células somáticas de la leche de la vaca, pero en las cuatro primeras semanas de lactancia pueden superar el 15% (Miller, 1990).

La composición de los tres principales tipos celulares, PMN, linfocitos y macrófagos varía en su número total de vaca a vaca y dentro de un mismo animal, dependiendo de la etapa de lactancia y de la salud de la glándula mamaria (Burvenich, 1995). Consecuentemente, cuando se estudian células de las secreciones mamarias de la vaca, cada parte del ciclo de lactancia debe ser considerado. En este período, la leche proveniente de glándulas mamarias bovinas normales contiene, en promedio, 200000 células somáticas, aproximadamente por ml, de los cuales un 12% PMN, un 60% de macrófagos, y un 28% de linfocitos (Lee, 1980). La lactancia o los estímulos mamarios inducen la migración directa de los PMN al tejido mamario (Paape, 1992); de esta manera, la glándula mamaria normal estéril es apoyada con una constante fuente de PMN. De acuerdo a Smith y Todhunter (1982), la glándula mamaria comienza nuevamente su desarrollo durante el período seco tardío, el cual está caracterizado principalmente por la formación y acumulación de calostro con altas concentraciones de inmunoglobulinas, por otra parte las

concentraciones de grasa, caseína, lactosa y otros componentes en la secreción, comienzan a aumentar aproximadamente dos semanas antes del parto. Durante este tiempo el fluido de la cisterna de la glándula se incrementa levemente, pero copiosas cantidades de secreción son acumuladas a partir del tercer día pre-parto (Hartman, 1973). El número de células en el calostro de una glándula mamaria no infectada, declina gradualmente a partir de la segunda semana previo al parto, con recuentos celulares entre $1,0 \times 10^6$ y $2,7 \times 10^6$ por ml pocos días antes del mismo. Además, los mismos autores comprobaron una disminución en los recuentos celulares, con valores de $1,0 \times 10^5$ a $2,8 \times 10^5$ células/ml alrededor de una semana post-parto (Jensen y Eberhart, 1981).

Tabla 3. Composición del calostro y leche en vacas Lecheras *

| Número de ordeños | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|
| Descripción | 1 | 2 | 3 | Leche |
| Gravedad específica | 1.056 | 1.040 | 1.035 | 1.032 |
| Sólidos Totales % | 23.9 | 17.9 | 14.1 | 12.9 |
| Proteína total % | 14.0 | 8.4 | 5.1 | 3.1 |
| Caseína % | 4.8 | 4.3 | 3.8 | 2.5 |
| Inmunoglobulina G g/L | 48.0 | 25.0 | 15.0 | 0.6 |
| Grasa % | 6.7 | 5.4 | 3.9 | 3.7 |
| Lactosa % | 2.7 | 3.9 | 4.4 | 5.0 |
| Vitamina A $\mu\text{g/g}$ de grasa | 45 | - | - | 8 |
| Vitamina D UI/g de grasa | 1.3 | - | - | 0.6 |
| Vitamina E $\mu\text{g/g}$ de grasa | 125 | - | - | 20 |
| Tiamina $\mu\text{g}/100\text{g}$ | 80 | - | - | 40 |
| Vitamina B 12 $\mu\text{g}/100\text{g}$ | 3 | - | - | 0.5 |
| Minerales Totales % | 1.11 | 0.95 | 0.87 | 0.74 |
| Calcio % | 0.26 | - | - | 0.13 |
| Fósforo % | 0.24 | - | - | 0.11 |
| Hierro % | 0.20 | - | - | 0.04 |
| Cobalto % | 0.5 | - | - | 0.05 |

-: Información no disponible

* Adaptado de Gorriil, 1972

1.3.2 Factores que afectan la calidad del calostro bovino

A) Raza de la vaca

Algunas vacas para carne *Bos indicus* (Cebú) tienen baja producción de calostro y las de raza Holstein o Pardo Suizo producen altos volúmenes de calostro con baja concentración de Inmunoglobulinas. Las vacas *Bos taurus* (Holstein, Pardo Suizo) tienden a tener un calostro de menor calidad que el de vacas *Bos indicus* (Cebú) o el de vacas de sistemas de doble propósito, *Bos taurus* x *Bos indicus*. Entre las razas Europeas la Jersey es la que muestra un calostro con mayor calidad (Florez Díaz).

B) Inducción del parto

La inducción prematura del parto reduce la calidad del calostro, porque evita su completa formación. La administración de prostaglandinas disminuye la IgG y los corticosteroides el volumen de calostro. Cuando hay goteo antes del parto mucho del calostro es reemplazado por leche, la cual tiene bajo contenido de anticuerpos.

La calidad del calostro generalmente no se puede juzgar por su apariencia. El calostro parece más espeso y cremoso que la leche, únicamente por su mayor contenido de grasa (Florez Díaz).

Sin embargo un calostro acuoso, poco espeso y de color amarillo claro es probable que sea de baja calidad.

2 JUSTIFICACIÓN

En la ardua búsqueda del equilibrio en la salud, el ser humano ha encontrado soluciones a varios padecimientos gracias al avance de la ciencia y la tecnología, el cual ha ido creciendo vertiginosamente en los últimos años. Es así como se ha logrado la síntesis de varios fármacos, conociendo más de la farmacognosia y apoyándose de los conocimientos de química tanto orgánica como inorgánica. Sin embargo, aunado a estos logros, existe el serio problema de la automedicación y abuso en el uso de medicamentos, como es el caso de los antibióticos.

Esto se ha convertido en un serio problema en materia de salud pública, pues ahora tenemos microorganismos sumamente resistentes, con los cuales el sistema inmune de un individuo no puede lidiar y por lo tanto no presenta mejoría clínica. En este trabajo se busca a través de la inmunofarmacología encontrar tratamientos alternativos, más naturales que estimulen al sistema inmune para que pueda coadyuvar en la mejoría de la salud y calidad de vida del paciente.

La labor de buscar terapias alternas a las ya plenamente establecidas y estudiadas no es siempre fácil, pues existen ciertos dogmas que hacen sinuoso el camino, tal es el caso de el uso terapéutico del factor de transferencia. Este grupo de moléculas halladas desde la década de los cuarentas y analizadas por diversos científicos abre un amplio panorama para encontrar solución a padecimientos delicados como es el cáncer, asma, dermatitis, diversas infecciones y hasta depresión.

En el presente trabajo se describe el desarrollo para la obtención de factor de transferencia a partir de calostro bovino, buscando un método terapéutico que pueda usarse de manera segura en algún padecimiento. Ya que la motivación principal, tanto personal como académica, es encontrar vías hacia una verdadera calidad de vida en nuestro país

3 HIPOTESIS

- Si se siguen los lineamientos de obtención de factor de transferencia en sangre se puede estandarizar una técnica para la obtención de FT a partir de calostro bovino

- El Factor de Transferencia del calostro bovino tiene la capacidad de generar una respuesta positiva de DTH para PPD en un modelo murino

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar un procedimiento que sea reproducible para obtener Factor de Transferencia específico para *M. tuberculosis* procedente de calostro bovino con base en la metodología seguida para la obtención del FT en sangre periférica humana.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener calostro bovino en las primeras horas del post-parto.
2. Establecer las condiciones para la separación de las fases del calostro (oleosa y acuosa) utilizando ultra centrifugación a baja temperatura.
3. Realizar diálisis de la fase acuosa del calostro utilizando membranas de corte igual a 12 KDa para obtener moléculas de bajo peso molecular (FT).
4. Estandarizar las condiciones adecuadas para la correcta liofilización del dializado variando la temperatura y tiempo entre cada etapa del proceso.
5. Cuantificar carbohidratos y proteínas en el liofilizado obtenido mediante los métodos de ácido sulfúrico y Bradford respectivamente.
6. Comprobar a través de un modelo experimental con la prueba de DTH que el liofilizado obtenido es capaz de transferir inmunidad.

5 MATERIALES Y METODOS

5.1 OBTENCION DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA A PARTIR DE CALOSTRO BOVINO

La metodología empleada es similar a la que se utiliza para la obtención de FT de sangre periférica.

5.1.1 RECOLECCIÓN DE CALOSTRO BOVINO

Se emplearon tres vacas de raza Holstein criadas en la FESC campo 4 las cuales eran positivas a tuberculina. Se recolectó calostro bovino dentro de las primeras 48 h posparto con el cual se hizo un pool. Se verificó que el recipiente en que se recibió el calostro estuviera completamente limpio y protegido de la luz.

5.1.2 ULTRACENTRIFUGACIÓN COMO METODO DE SEPARACIÓN

Para la separación de la fase oleosa y la acuosa en el calostro se utilizó ultracentrífuga (Hettich) buscando las condiciones más adecuadas: (10°C) a 200 g/25 min., 450 g/30 min., 800 g/30 min., 1000 g /35 min., 1500 g/30 min., 2100 g/35 min. La fase oleosa se desechó y la acuosa se reservó para la diálisis.

Posterior a este paso el calostro se somete a congelación y descongelación a lo que se llama choque térmico lo que provoca ruptura de células

5.1.3 DIÁLISIS

A partir de este proceso todo el material a utilizar se esterilizó utilizando autoclave (mod. Felisa) y se trabajó en campana de flujo laminar horizontal (CFL-H) a una temperatura de 22 °C .Se preparó un matraz con 4 l de agua des ionizada estéril, se descongeló la fase acuosa a temperatura de 10 ° C y se depositó 400 ml dentro de la membrana de diálisis de celulosa estéril (Spectrum. Spectra/por 4 membrane) con corte

menor o igual a 12 KDa. Se colocó la membrana de diálisis dentro del matraz con agua desionizada y se dejó en agitación y refrigeración (4°C) durante 24 h en ausencia de luz.

Al término de este tiempo se retiró la membrana de diálisis y se situó en otro matraz con otros 4 l de agua desionizada estéril se repiten los pasos de diálisis a condiciones mencionadas anteriormente. Se separó la fase externa y distribuyó en distintos frascos ámbar de boca ancha.

Se propone el uso de Agar soya tripticaseína para sembrar una muestra de la fase externa y verificar la ausencia de microorganismos.

5.1.4 La fase externa se esterilizó por filtración con membrana Avanteq MFS poro 0.2 µm, trabajando en CFL-H.

5.1.4 El filtrado se congeló paulatinamente

A) 0 °C de 4 - 6 h , B) -20°C un día y C) -70°C de 10 – 24 h

5.1.6 LIOFILIZACIÓN

Se utilizó liofilizadora (LABCONCO) a una presión inicial de 50 Mbar para los ciclos 1 y 2 y 30 Mbar para el ciclo 3

Tabla. No. 4 Propuestas para estandarizar las condiciones de liofilización del dializado.

| No. DE PRUEBA CICLO | Prueba 1 de liofilizado | Prueba 2 de liofilizado | Prueba 3 de liofilizado |
|--------------------------------|--|---|--|
| Ciclo 1 | Temperatura: -30 °C, Duración: 5 h | Temperatura: -40 °C, Duración : 10 h | Temperatura: -50 °C, Duración 14 h |
| Ciclo 2 | Temperatura: -40 °C, Duración: 20 h | Temperatura: -25 °C, Duración : 24 h | Temperatura: -20 °C, Duración: 48 h |
| Ciclo 3 | Temperatura: 2 °C, Duración: 7 h | Temperatura: 0°C, Duración : 13 h | Temperatura: 0°C, Duración: 17 h |

El producto final fue un polvo fino de color blanco. Se pesó en balanza analítica y se envasó en frasco ámbar para su posterior almacenamiento a temperatura de 4 °C.

5.2 ESTUDIOS DE COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA

5.2.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Se preparó una solución estándar de albúmina, conteniendo 10 mg disueltos en 10ml de NaCl 0.15 M. Las soluciones conteniendo de 10 a 100 μg de estándar de albúmina, se pipetearon en tubos de 12 x 100 mm y en un volumen de 0.1 ml. El volumen en el tubo de prueba también se ajusta a 0.1 ml con solución de NaCl 0.15 M. Se le agregaron 2 ml de reactivo Bradford, el cual se preparó de la siguiente forma: se disolvieron 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%. A esta solución se le agregó 100 ml de ácido fosfórico al 85% (p/v), la solución resultante se diluyó a un volumen final de 1 litro. Se dibujó una gráfica patrón de proteínas: cantidad de albúmina (eje de las abscisas) contra absorbancia obtenida a una longitud de onda de 595 nm (eje de las ordenadas). La solución problema se diluyó con NaCl 0.15 M. Se agregó en cada tubo un volumen de 0.1 ml de la solución problema en tubos de 12 x 100 mm, se le adicionaron 5 ml de reactivo y se leyó a una longitud de onda de 595 nm. Se preparó un blanco que contenía 0.1 ml de NaCl 0.15 M más 5 ml de reactivo. La absorbancia resultante del problema se interpoló a la curva patrón y se extrapoló al eje de las X para conocer la cantidad de proteína contenida en la muestra. (Bradford, 1976).

5.2.2 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES POR EL METODO DE ACIDO SULFURICO

En un tubo de ensaye se colocó 1 ml de fenol al 5 %, se agregó 1 ml de solución estándar de glucosa (100 μg para realizar la curva), se adicionaron 5 ml de H_2SO_4 concentrado, se mezcló y se incubó por 20 min. hasta desarrollar color. Se midió en espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. La absorbancia resultante del problema se interpoló a la curva patrón y se extrapoló de esta al eje de las X para conocer la cantidad de carbohidratos totales contenida en la muestra (Doboi, 1956).

5.3 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.3.1 PRUEBA DE DTH EN MODELO MURINO

Se emplearon 13 ratones machos de 8 semanas de nacidos a los cuales se distribuyeron en tres lotes: lote 1(5 ratones) destinado a utilizar FT, lote 2 (5 ratones) se inyectarán con suspensión viable de *Micobacterium tuberculosis* (H37Ra) y lote 3 con SSF.

Sensibilización:

Lote 1: Se inyectó vía i.p 100 µl del extracto liofilizado (FT) de concentración = 10 µg/ml.

Lote 2: Se inyectó vía i.p 100 µl de *Micobacterium tuberculosis* de concentración = 1000 µg/ml.

Lote 3: Se inyectó vía i.p 100 µl de SSF

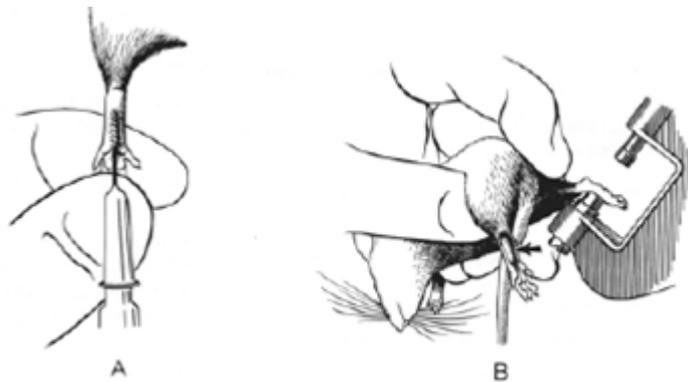
Se mide el cojinete plantar de las patas derecha e izquierda.

Reto antigénico:

Al transcurrir 4 semanas se realizó la prueba de DTH en cojinetes plantares

Se usó derivado proteico purificado (PPD) reconstituido en SSF, a una concentración de 800 µg / ml, 0.025 ml (20 µg) fue inyectado en la superficie plantar de la pata trasera derecha. A la pata trasera izquierda del mismo ratón se le inyectó 0,025 ml de SSF (Figura 5a).

Después de 24 y 48 h se midió el grosor de cada cojinete utilizando un vernier digital (Mitutoyo-inventaric) como lo indica la figura 5b. Los datos se obtuvieron en mm. Tratamiento de datos se realizó a cada ratón restando mm de induración en pata inyectada con PPD menos los mm de induración de la pata tratada con SSF del mismo ratón (Yi Lou, 2001).



METODOLOGÍA

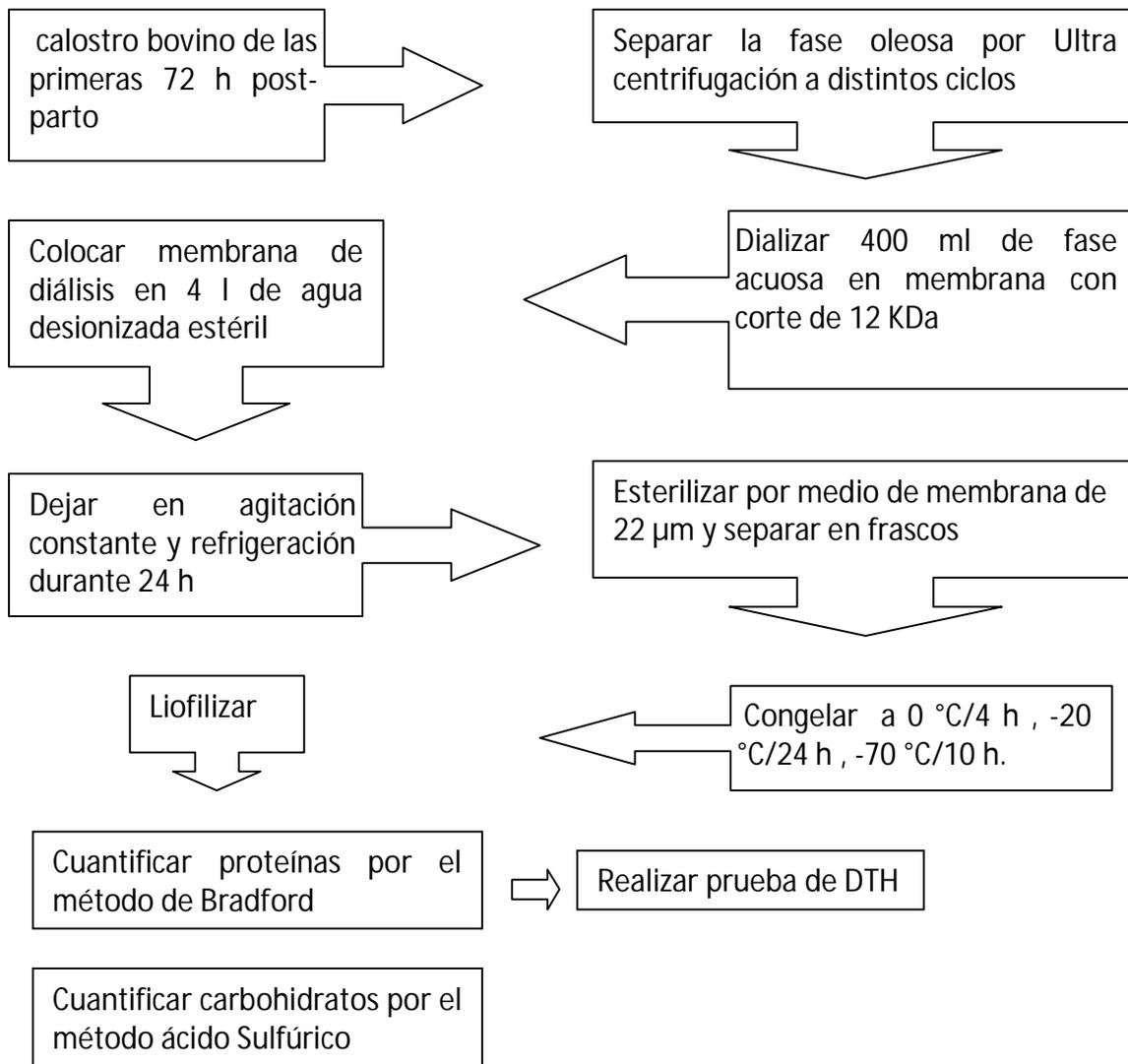


Fig. 6 Resumen del proceso de obtención de FT proveniente de calostro bovino

6. RESULTADOS

6.1 OBTENIÓN DEL CALOSTRO

Se extrajeron 12 l de calostro dentro de las primeras horas posteriores al parto de 3 vacas de raza Holstein criadas en campo 4 FESC/UNAM, con el cual se realizó un pool de calostro, este se refrigeró inmediatamente a 2 °C.

6.2 SEPARACIÓN DE FASES

La fase acuosa y oleosa del calostro se separa por medio del método físico de ultra centrifugación a distintas velocidades y tiempos.

| Velocidad (g) | Tiempo (min.) |
|----------------------|----------------------|
| 200 g | 25 |
| 450 g | 30 |
| 800 g | 30 |
| 1000 g | 35 |
| 1500 g | 35 |
| 2100 g | 35 |

La separación ideal fue a 1500 g durante 35 min. ya que se compacto más claramente la grasa en la superficie y no queda resto alguno en el medio acuoso.

6.3 DIALISIS

En este trabajo la diálisis se realizó por triplicado usando membranas de corte molecular igual a 12 KDa para una superficie de 400 ml de calostro cada una, la cuales se dejaron en agitación durante 24 h para aprovechar al máximo la salida de moléculas de bajo peso molecular y en condiciones de refrigeración a 4 2 °C para evitar la descomposición del dializado, Obteniendo 4 l de fase externa por cada membrana de dialisis. (Michael, 1977).

La diálisis se realizó en un ambiente aséptico utilizando CFL-H. Se colocaron 400 ml de fase acuosa en membrana para diálisis; dentro de la membrana quedan las moléculas mayores a 12 KDa, el FT pasa a través de este poro ya que su peso molecular es menor. El

medio externo (en donde se encuentra el FT) no presentó turbidez ni partículas contaminantes.

6.4 ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN

La esterilización fue adecuada ya que la fase acuosa no presentó turbidez.

6.5 LIOFILIZACIÓN

La liofilización se llevó a cabo en distintos ciclos y temperatura, mostró que un tiempo prolongado de sublimación fue adecuado para eliminar partículas de agua en el producto.

Tabla no. 6 Las condiciones óptimas de liofilización:

| NO. DE CICLO | CONDICIONES |
|--------------------|------------------------|
| 1 (CONGELACION) | Temperatura: - 50 °C |
| | 2°C/min. |
| | Tiempo del ciclo: 14 h |
| 2 (SUBLIMACION) | Temperatura: -20°C |
| | 1°C/min. |
| | Tiempo: 48 h |
| 3 (SECADO) | Temperatura: 0°C |
| | 1°C/min. |
| | Tiempo del ciclo: 17 h |

El producto final liofilizado presentó un color ligeramente amarillo y tuvo un aspecto de partículas de polvo con olor dulce y a partir de 400 ml de dializado se obtuvieron 887 mg de este producto

Tabla no. 7 Condiciones óptimas para la obtención del FT de calostro bovino:

| | |
|--|--|
| TIEMPO DE RECOLECCION DE CALOSTRO | Dentro de las primeras 24 h post parto |
| SEPARACION DE FASES DEL CALOSTRO POR ULTRACENTRIFUGACION | 1500 g durante 35 min. |
| DIALISIS | Membrana corte menor a 12 KDa, 24 h en agitación y refrigeración |
| LIOFILIZACION | Ver tabla No. 5 |

CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR EL MÉTODO DE ÁCIDO SULFÚRICO

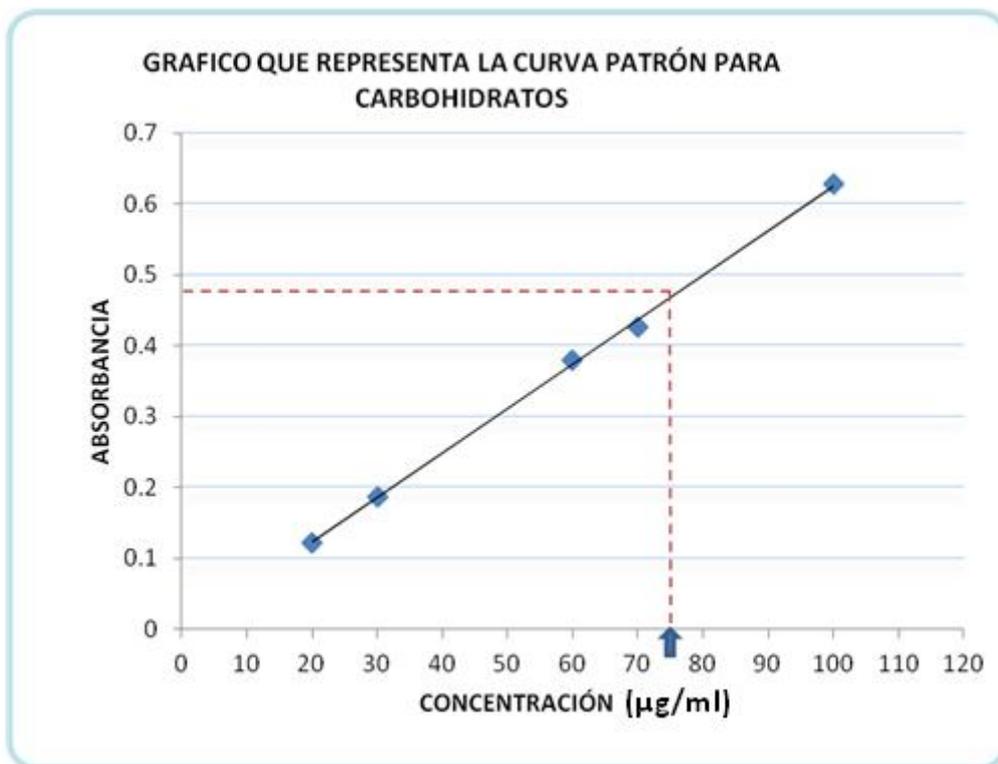


Fig. 7 Se realizó una curva con glucosa de concentración conocida (100 µg/ml), por medio del método gráfico al interpolar la absorbancia en la curva patrón proporciona la concentración de carbohidratos totales en el liofilizado, la cual fue de 75 µg/ml, con una correlación de $r^2=0.999$

8.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

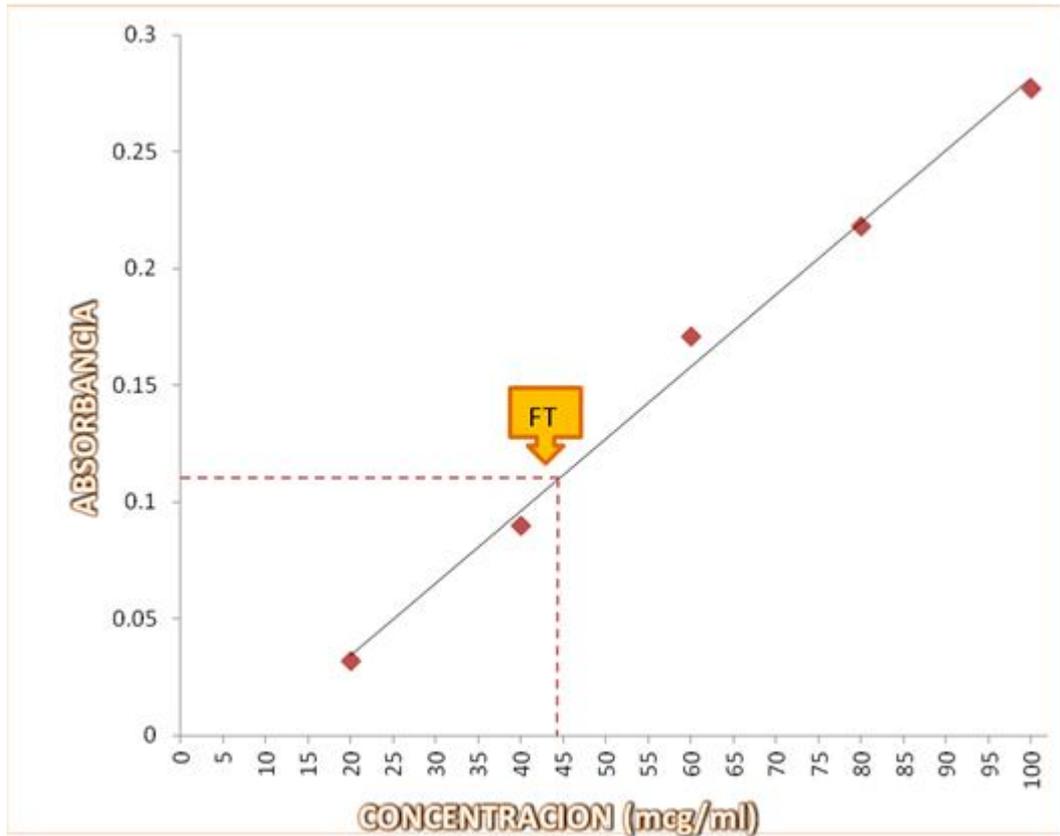


Fig. 8 Se realizó una curva patrón con albúmina de concentración conocida (1 mg/ml), al extrapolar la absorbancia se conoce la concentración de proteínas totales presentes en el producto liofilizado. Dando como resultado 44 $\mu\text{g/ml}$ con una correlación de $r^2=0.996$.

8.8 PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA CON PPD

Se midió la induración de los cojinetes inyectados con PPD y SSF del mismo ratón sacando la diferencia entre ambos se promedió a cada lote.

Medición de la induración en las primeras 24 h posteriores a la inyección subcutánea de PPD.

| SSF | FT | <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> |
|-----------------|-----------------|--|
| 0.02 | 0.52 | 0.51 |
| 0.13 | 0.36 | 0.77 |
| 0.05 | 0.61 | 0.24 |
| | 0.13 | 0.74 |
| | 0.4 | 0.21 |
| Promedio | Promedio | Promedio |
| 0.07 | 0.40 | 0.49 |

Medición de la induración en 48 h posteriores a la inyección subcutánea de PPD.

| SSF | FT | <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> |
|-----------------|-----------------|--|
| 0.07 | 0.07 | 1.22 |
| 0.01 | 0.32 | 0.03 |
| 0.03 | 1.5 | 0.51 |
| | 0.14 | 1.15 |
| | 0.82 | 0.07 |
| Promedio | Promedio | Promedio |
| 0.04 | 0.57 | 0.60 |

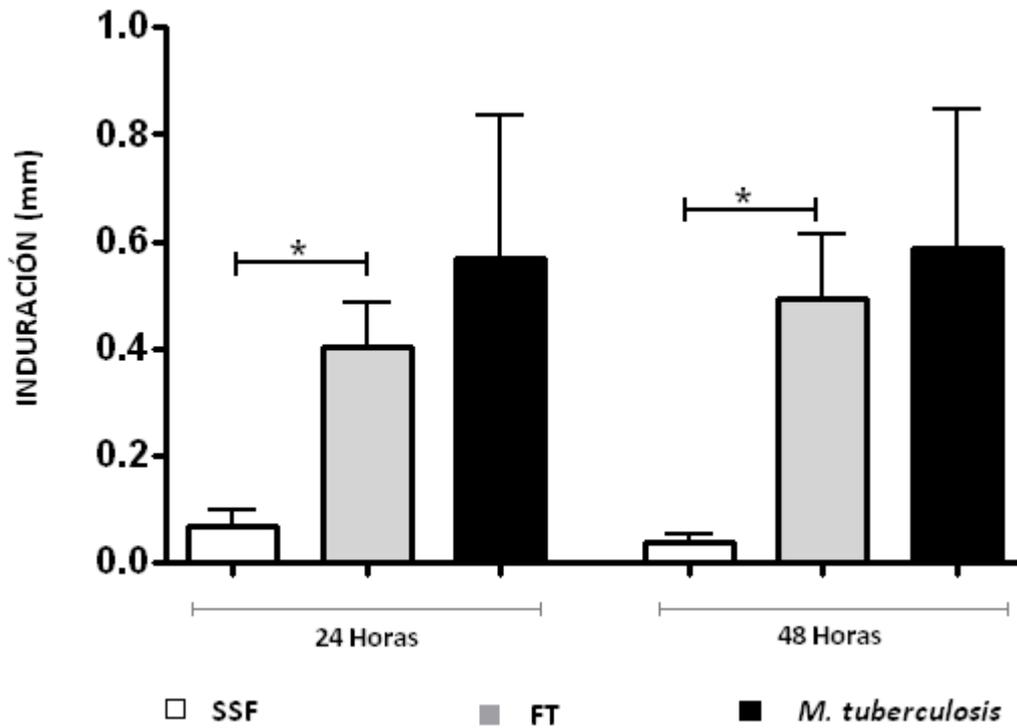


Fig. 9 R ratones de ocho semanas fueron separados en 3 lotes a los cuales se les administro vía intraperitoneal SSF, FT y *M. tuberculosis* respectivamente, después de 4 semanas se inyectó en cojinete plantar de PPD. A las 24 h los ratones tratados con FT mostraron diferencia significativa ($p < 0.0257$) con respecto al control negativo (SSF). A las 48 h el lote con FT mostraron mayor diferencia ($p < 0.0179$) con respecto al control negativo y se comportó muy similar al lote de *M. tuberculosis* (control positivo).

7. DISCUSIÓN

El objetivo de este proyecto es establecer parámetros que puedan ser reproducibles para la técnica de obtención de Factor de Transferencia específico proveniente de calostro bovino con base en la metodología utilizada para la obtención de este mismo producto en sangre, con el propósito de impulsar la investigación y producción de este inmunomodulador.

Para ello el primer paso fue adecuar una metodología en base a métodos tradicionales para la preparación de FT. Desde 1974 Lawrence publicó la forma de obtención de FT en sangre humana menciona que la fuente base de FT esta en los leucocitos células que están distribuida en distintos órganos y calostro.

El calostro, es el primer fluido producido por los mamíferos, es una rica fuente de Factores de Transferencia (Hagiwara, 2000) es por ello que años más tarde en 1989 se registra una patente para FT en calostro. En este trabajo se busco la manera de estandarizar la técnica en base a los métodos reportados en artículos.

La obtención de FT consta de una estructura base: La fuente de obtención debe contener leucocitos a los cuales se realiza lisis para liberar su contenido y diálisis del mismo para aislar específicamente moléculas de bajo peso molecular (menos a 12 KDa) (Estrada 1999).

El método utilizado para la estandarización del FT proveniente de calostro bovino es similar al de FT de sangre ya que contiene leucocitos: aproximadamente un 12% de células polimorfonucleares, un 60% de macrófagos, y un 28% de linfocitos (Lee, 1980).

Para este estudio inicialmente se recolectó un calostro fresco dentro de las primeras 24 h posteriores al parto al transcurrir el tiempo, pierde sus propiedades fisicoquímicas y biológicas ya que a medida que pasan las horas y con los ordeños disminuye la calidad del calostro (Tabla no. 3).

El calostro contiene una gran cantidad de grasa la cual puede interferir al momento de realizar la diálisis obstruyendo los poros de la membrana, para separarla se usó un

método físico como es la ultracentrifugación que además de ser una técnica rápida y barata, es adecuada ya que no afecta la composición del producto. En trabajos anteriores se ha reportado que para separar los componentes del calostro utilizan ultracentrifugaciones con un rango de 3500 a 12000 rpm en un periodo de 15 min. a 1 h a temperatura de 4 °C por l de calostro (Castillo, 2005). Sin embargo se observó que el uso de un solo ciclo a 1500 g (2700 rpm en ultracentrífuga Herlich) durante 35 min. a 4 °C por cada l de calostro es ideal para separar muy bien las fases.

Lawrence y col. dieron a conocer que el FT podía pasar a través de una membrana de diálisis sin perder su actividad biológica, en 1955 dializaron con un corte molecular de 20 KDa y en 1963 con uno de 10 KDa, el empleo de membranas con este corte elimina la posibilidad de que el efecto de transferencia de inmunidad fuese causado por anticuerpos ya que el más pequeño pesa alrededor de 150 KDa (Lawrence 1955). El tamaño de este poro de membrana también evita el paso de moléculas de gran tamaño como la caseína que contiene el calostro pueden causar reacciones alérgicas en otras especies; son la fuente de la mayoría de las alergias a la leche de vaca en humanos. Los Factores de Transferencia, por otro lado, no son alergénicos (Borkowsky, 1981).

El fundamento del método que se utiliza para la diálisis es distinto a lo conocido ya que normalmente se emplea para concentrar moléculas de alto peso molecular por ejemplo algunas proteínas, sin embargo la definición de FT nos dice que son moléculas de bajo peso molecular por lo tanto estas moléculas pasan a través del poro de membrana quedando en la fase externa de nuestro sistema. Esta fase es de gran volumen con respecto al contenido de la membrana de diálisis. El proceso de transferencia de moléculas fuera de la membrana es lento por lo cual requiere de al menos 18 h (Lawrence, 1996). Para tomar medidas se esterilizó

La presencia de moléculas de agua lleva a una pronta descomposición del producto, influyendo en la estabilidad reduciendo su actividad biológica. Por ello se realiza el proceso de liofilización el cual es un método de secado que preserva las cualidades físicas y funcionales del producto (Estrada 1999).

Previo a la liofilización se requiere congelar paulatinamente al dializado (0°C , -20 °C) los tiempos se eligieron con base en la observación de las fases que presenta el dializado al

momento de congelarse), para evitar la formación de cristales pequeños los cuales impiden llevar a cabo una correcta liofilización ya que no permiten la apertura de poros para eliminar agua presente en la muestra.

No existe una técnica específica para liofilizar el dializado obtenido, por lo cual se buscó por medio de distintos ciclos el método adecuado para conseguir el liofilizado. La liofilización incluye tres ciclos: congelación, sublimación (desección primaria) y secado. Las condiciones generales para este procedimiento son tiempo, temperatura y presión adecuada en cada ciclo. Se realiza un tiempo de congelación lento debido a que se requiere la formación de cristales grandes, proporcionando al producto una estructura porosa, menor resistencia al flujo de vapor de agua y menor duración a la desecación primaria; el desecado primario es una fase crítica del proceso ya que en ella se elimina casi el 100 % del agua presente en el producto, en esta etapa es preciso reducir la presión en el interior de la cámara y aplicar calor en el producto para que se produzca una sublimación. El vapor de agua que se origina se recoge en la superficie del condensador, este tiene superficie y capacidad de enfriamiento para condensar todo el agua que sublima a una temperatura inferior a la del producto, esta etapa es lenta por lo que se requiere de mayor tiempo ya que si es demasiado rápida el producto seco fluiría hacia el condensador escapando junto al vapor de agua, se perdería producto por arrastre. Si se calienta demasiado rápido, el producto fundiría y a esas bajas presiones se producirá una ebullición trayendo como consecuencia cambios en las características físicas del producto, y sería mucho más difícil de reconstituir (Fernandez 1998). se comprueba que con una duración de 48 h es idóneo para la eliminación del agua del soluto,

En la etapa de secado se aumenta la temperatura para producir la desorción del agua ligada hasta que la humedad residual del producto baje, el proceso de secado requirió de un tiempo de 17 h para asegurar que el producto se obtendrá completamente deshidratado. El FT es un producto de naturaleza péptica por lo cual demanda un contenido de de humedad determinado para mantener sus estructura y por tanto su actividad.

Se probaron tres distintos ciclos de liofilizado en el primero se obtuvo 1070 mg de un producto hidratado de consistencia chiclosa lo cual indica que los ciclos usados fueron inadecuados.

En el segundo ciclo se obtuvo 990 mg de una masa hidratada

De los 400ml de la fase acuosa de calostro iniciales se obtuvo 880 mg de producto de aspecto de polvo de color blanco, esto indica que el proceso de liofilización fue el adecuado, no hay presencia de humedad visible ni otra condición que afecte al FT.

Las ventajas del proceso de liofilizado son la relativa facilidad de eliminar el líquido cuidando la estabilidad debido a que el producto permanece un tiempo corto en solución acuosa y es secado sin exponerlo a temperaturas elevadas. Otra ventaja es que sin ser reconstituido puede ser almacenado a temperatura ambiente durante años sin perder su actividad biológica (Estrada, 2007).

Debido a que el FT son moléculas que varían en cantidad de un donador a otro estos se estandarizan de acuerdo a la concentración de proteínas totales

Por ello se cuantificó proteínas totales por el método de Bradford el cual emplea un colorante hidrofóbico. Se muestra en la fig. no. 8 el método gráfico para la sacar la concentración de proteínas totales utilizando una curva patrón de albúmina. El resultado obtenido fue del 10% esto se compara con literatura en el cual reportan proteínas totales en calostro alrededor del 14% (Elizondo, 2007). Se toma en cuenta que varía de acuerdo a la raza y edad de la vaca ya que entre mayor número de partos tenga la calidad del calostro disminuye (Florez Diaz).

Dado que no solo proteínas de bajo peso molecular atraviesan la membrana de diálisis se investigó la concentración de carbohidratos que están presente en la muestra, se realizó cuantificación de carbohidratos totales por la técnica de Douboi encontrando un 75 % en el liofilizado, no se ha encontrado reportado contenido de carbohidrato en dializado de calostro.

La técnica de obtención de FT es muy conveniente ya que por cada 400 ml de calostro se obtienen 880 mg de producto de los cuales el 10% es de contenido proteico, aproximadamente 440 mg de proteína total donde se encuentra el factor de transferencia

En este trabajo se realizó la prueba de DTH debido a que es un indicador clave para medir la transferencia de inmunidad ha sido usada desde principios del estudio del FT.

El calostro utilizado para la obtención de FT fue de tres vacas positivas a *tuberculina* por lo cual se realiza la prueba de DTH usando PPD. Esta prueba consta de dos fases: sensibilización y reto con el antígeno. En la fase de sensibilización los tres lotes fueron tratados de la siguiente manera: (lote 1 tratado con FT, lote 2 tratado con *M. tuberculosis* y lote 3 con SSF), al transcurrir 4 semanas en las cuales se espera que se haya generado inmunidad hacia *Micobacterium* en lote 1 y 2 se realizó el reto antigénico al inyectar PPD en cojinete plantar, la reacción ocurre de 12 a 18 h seguido de la inyección intradérmica del antígeno en los ratones previamente sensibilizados, histopatológicamente los linfocitos son los primeros en rodear las vénulas dérmicas en el área de la inyección del antígeno dentro de las primeras 6 horas. Los linfocitos invaden la dermis y epidermis circulante. También están presentes macrófagos, basófilos y mastocitos en números incrementados. La degranulación de los mastocitos y basófilos causan un aumento en la permeabilidad vascular y edema de la dermis y en menor grado la epidermis. Concurrentemente con la activación local del sistema de coagulación, ocurre el depósito de fibrina alrededor de los vasos en la dermis profunda y del tejido subcutáneo. La polimerización de la fibrina alrededor de los vasos, forma una estructura gelatinosa de fluido tisular envuelto en forma cilíndrica, clínicamente lo que se palpa como la induración, este estudio arrojó datos interesantes ya que después de cuatro semanas de sensibilización el lote tratado con FT mostró ser biológicamente activo transfiriendo respuesta inmune celular físicamente manifestada con una induración estadísticamente significativa a las 24 y 48 h comportándose de manera similar al lote tratado con *M. tuberculosis* (fig. no. 9). Se ha comprobado que los Factores de Transferencia inducen una respuesta inmunológica en menos de 24 h (Lawrence 1955).

Este estudio da como resultado la obtención de un dializado que tiene la capacidad de transferir inmunidad para *M. tuberculosis* y la metodología empleada basada en técnicas para la obtención de FT de sangre periférica es adecuada para estandarizar un método de obtención de FT proveniente de calostro bovino.

Se propone que en la obtención de FT de calostro se aislen y cuantifiquen los leucocitos y así comparar transferencia de inmunidad con respecto a este trabajo.

8. CONCLUSIONES

- Se obtuvo calostro bovino de buena calidad en las primeras horas post-parto.
- Se establecieron las condiciones para una correcta separación de fases del calostro (oleosa y acuosa) utilizando ultracentrifugación a baja temperatura.
- Se estandarizaron las condiciones adecuadas de liofilización para el dializado.
- Se demuestra que al seguir los lineamientos de obtención de factor de transferencia en sangre se puede estandarizar una técnica para la obtención de FT específico procedente de calostro bovino.
- Se comprueba la obtención de FT de calostro bovino específico para *M. tuberculosis* ya que tiene la capacidad de transferir inmunidad queda demostrado al dar positivo en la prueba de DTH para PPD en modelo murino.

9. REFERENCIAS

- [1] Bradford M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 72: 248-254.
- [2] Bennett, RH, Jasper (1977) Immunologic and pathologic responses of cows to naturally occurring *Mycoplasma bovis* mastitis Veterinary Microbiology Vol. 2, December, Pag. 325-340.
- [3] Borkowsky W, Lawrence HS (1981) Deletion of antigen/ specific activity from leukocyte dialysates containing transfer factor by antigen/coated polystyrene. J immunol.126 (2): 487-489.
- [4] Burvenich C, A.J. Guidry, M.J. Paape. (1995) *Natural defence mechanism of the lactating and dry mammary gland. Proceedings of the Third IDF International Mastitis Seminar*. Tel-Aviv, Israel, 28 May-1 June 1995.
- [5] Lawrence HS, Borkowsky W (1996) Transfer Factor current status and future prospects.. Biotherapy, 9(1-3), 1-5.
- [6] Castillo G. (2005) *Producción del Factor de Transferencia calostroal bovino para uso en el modelo de glioma C6*, Tesis de maestría. ENCB- IPN.
- [7] De la Fuente Granada. (2008) *Evaluación del efecto del extracto dializable de leucocitos en EAE*, Tesis de maestría. ENCB-IPN.
- [8] Doboys, M., Gilles (1956) *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Anal. Chem. 28:530.
- [9] Duhamel GE, Bernoco D, Davis WC, Osburn BI (1987). *Distribution of T and B lymphocytes in mammary dry secretions, colostrum and blood of adult dairy cattle*. Vet Immunol Immunopathol. Feb;14 (2):101-22 .
- [10] Estein M, (1994) *El calostro, fuente de transferencia de la inmunidad materna*. Ciencia Veterinaria, Córdoba, N° 22.
- [11] Elizondo- Salazar (2007) *Alimentación y manejo del calostro en Ganado de leche*. Agronomía mesoamericana 18(2): 271-281.
- [12] Estrada Parra (2009) comunicación personal

- [13] Estrada Parra. (2007). *Indications, usage and dosage of the transfer factor*, Revista Alergia México Vo. 54 No. 4 julio-agosto , p 134-139.
- [14] Estrada Parra, R. Cabezas (2007) .*El sistema inmune y el uso del factor de transferencia*. Revista científica Ciencia UANL, vol. 2 No. 3, julio- septiembre. p 237-243.
- [15] Estrada Parra, Nagaya A. (1998). *Comparative study of transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster*. Intl J of Immunopharmacol. 20, 521-535.
- [16] Estrada Parra, Fabre R. (2004). *Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis*. Clin and Exp Immunol. Vol. 136, p. 215-223.
- [17] Florez Díaz. M.V.Z. M.Sc. Corpoica, Capacitación técnico empresarial en leche. 201504034
- [18] Fundenberg HH and Pizza (1993) Transfer Factor, new frontiers. Progr. Drug Res. 42:309-400.
- [19] Fundenberg HH (989) Transfer Factor: Past, Present and Future. Ann Rev Pharm Tox 475-516.
- [20] Galindo J.(1988). Centrifugación. En Lozano JA, Tudelo J (eds): "Prácticas de Bioquímica. Experimentación y Simulación", 1ª ed. Editorial Síntesis (Madrid, España), pp. 17 – 24.
- [21] Gorczynski Reginald (2007) *Inmunología basada en resolución de problemas*, Elsevier España.
- [22] Gorril, A.D.L. (1972) *Feeding and Nutrition of Young Replacement and Veal Calves*. In: *Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants*. Vol.3. Practical Nutrition. Book Stores Inc., Oregon, USA. p. 93-191.
- [23] Jensen, D.L., R.J. Eberhart (1981) *Total and differential cell counts in secretions of the nonlcting bovine mammary gland*. Am. J Vet. Res 42: 743-747.
- [24] Jensen K, Patnode (1961) *multiple passive transfer or delayed type of hypersensitivity in humans*. Ann. Rev. Respire. Dis. 85:373.
- [25] Jones JF, Schumacher MJ, 1983 *Oral Bovine Transfer Factor (OTF) use in the hyper-IgE síndrome* In: *Immunobiology of Transfer Factor*. Academic Press: New York, pp 261-70.
- [26] Kerr, WR. (1956) Active Immunity Experiments in Very Young Calves. Vet. Rec. (68): 476478.

- [27] Kirkpatrick C.H. (1996). *Activities and characteristics of Transfer Factors*. Biotherapy, 9, 13-16.
- [28] Kirkpatrick C.H. (1985). *Murine Transfer Factor II Transfer of Delayed Hypersensitivity to synthetic antigens*. J Immunol, Vol. 134, no. 3 p 1723-1727.
- [29] Kirkpatrick C.H. (1985) *Murine Transfer Factor III Specific Interactions between Transfer Factor and antigen*. The Journal of Immunology, vol. 135, no. 6.
- [30] Kirkpatrick C.H. (2000) *Transfer Factors: Identification of conserved Sequences in Transfer Factor Molecules*, Molecular Medicine 6 (4); 332-341.
- [31] Kirkpatrick CH, Hamad AR, Morton LC (1995) *Murine Transfer Factors: dose-response relationships and routes of administration*. Cell Immunol , 164(2),203-6.
- [32] Kirkpatrick C.H. and Gallin J. (1974) *Chemotactic activity in dialyzable Transfer Factor*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, vol. 71, no. 2, p 498-502.
- [33] Kirkpatrick, C. H., R. R. Rich, and T. K. Smith (1972) *Effect of transfer factor on lymphocyte function in anergic patients*. J. Clin. Invest. 51: 2948-2958.
- [34] Lawrence HS. (1949) *The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man* Proc Soc Exp Biol Med, 7a, 516.
- [35] Lawrence HS. (1963) *Transfer of immunological information in humans with dialysates of leukocyte extracts*. Trans Assoc. Am Physicians. 74:84.
- [36] Lawrence HS. (1955) *The Transfer in human of delayed skin sensivity to Streptococcal M substance and tuberculine with disrupts leukocytes*. J Clin Inv 1955; 34:219-30.
- [37] Lee C.S. (1980.) *Identification, properties, and differential counts of cell populations using electrón microscopy of dry cow secretions, colostrum and milk from normal cows*. J. Dairy Res.47: 39-50.
- [38] Lisonbee D, Henne WJ inventores. Lisonbee D, Henne propietarios composition including different types of transfer factor methods for making the compositions and methods patente PCT/ US2004/030307.
- [39] McGuire TC, Pfeiffer NE, (1976). *Failure of colostrum immunoglobulin transfer in calves dying from infectiousdisease*. J Am Vet Med Assoc. Oct 1;169 (7):7138.
- [40] Michael R. Simon, (1977) *Tuberculin specific Transfer factor in dogs*. Infection and immunity, oct p 73-77.

- [41] Miller R.H. (1990) *Total and differential somatic cell count and N-Acetyl-p-D-Glucosaminidase activity in mammary secretions during dry period*. J. Dairy Sci. 73: 1751.
- [42] Morton Walker. (1999) *Bovine Colostrum offers broad-spectrum benefits for wide-ranging ailments*, Townsend Letter for Doctors & Patients (April):74-80
- [43] Paape, M.J., R.H. Miller (1992). *Influence of involution on intrammary phagocytic defense mechanisms*. J. Dairy Sci. 75: 1849.
- [44] Pekarek J. inventor . Pekarek J. propietario Transfer Factor medicament ways of manufacturing and use.US. patente PCT/CZ2007/000050.2007
- [45] Pérez Tapia SM. 2006. *Empleo del Transferón en el manejo de sepsis grave*. Tesis doctoral, ENCB-IPN.
- [46] Pizza G, De Vinci C, Fomarola V, Palareti (1996) *In vitro studies during long-term oral administration of specific Transfer Factor*. Biotherapy, 9(1-3), 175-85.
- [47] Reber A.J,Donovan D.C. (2008) *Transfer of maternal Colostral leukocytes promotes development of the neonatal immune system*. Veterinary immunology, 123, 186-196.
- [48] Reece W. (1991) *Physiology of domestic animals*. Lea and Febiger, Philadelphia.
- [49] Rozzo S.J., Kirkpatrick C.H. (1992) *Purification of transfer factors*. Mol. Immunol., 29,167-82.
- [50] Rodriguez Flores, Serrano Miranda. (2002) *El efecto terapéutico del factor de transferencia en el tratamiento de pacientes con dermatitis atópica grave, Alergia, Asma e inmunología Pediátricas*, Vol. 11 Num 1, 9-11.
- [51] Sandler, J.A., Smith, T.K., Kirkpatrick, C.H. (1975) Stimulation of monocyte. cGMP by leucocyte dialysates. An antigen-independent property of dialysable transfer factor. J. clin. Invest. 56, 1271.
- [52] Schlesinger JJ, Covelli HD(1997). Evidence for transmission of lymphocyte responses to tuberculin by breastfeeding.Lancet. Sep 10;2 (8037):52932.
- [53] Smith K.L. (1982) *The physiology of mammary glands during the dry period and the relationship to infection*. In: 21st Annual Meeting National Mastitis Council. Inc. Louisville, Kentucky, USA.
- [54] Smith, R, Little, R. (1922) *The Significance of Colostrum to the Newborn Calf*. J. Exp. Med. (36): 181198.
- [55] Spitler, L. E., A. S. Levin, D. P. Stites, H. H. Fudenberg (1972) *The Wiskott-Aldrich syndrome*. Results of transfer factor therapy. J. Clin.Invest. 51: 3216-3224.

- [56] Takusaburo Ebina M.D. (1989) *passive immunization of children with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus lancet*. J Med Virol, Vol. 38, p 117–123.
- [57] Ulrich Hadorn, Harald Hammon (1997) *Delaying colostrum intake by one day has important effects on metabolic traits and on gastrointestinal and metabolic hormones in neonatal calves*. Journal of Nutrition 127 (10) (oct.):2011- 2023.
- [58] Vacek Antonin. (2000) *Positive effects of dialyzable leukocyte extract (DLE) on recovery of Mouse haemopoiesis suppressed by ionizing radiation and on proliferation of haemopoietic progenitor cells in Vitro*, International Journal of Immunopharmacology 22: 623-634.
- [59] Wilson GB, Poindexter C (1988). *De novo initiation of specific cellmediated immune responsiveness in chickens by transfer factor (specific immunity inducer) obtained from bovine colostrum and milk*. Acta Virol. 32 (1):618.
- [60] Wilson GB. (1982) *Bovine transfer factor an oligoribonucleopeptide which initiates antigen-specific lymphocytes responsiveness*. Thymus.4 (6) p 335-50.
- [61] Wu S. Zhong X. Chung Kuo (1992) *Observation of the effect of PSTF oral liquor on the positive tuberculin test reaction*. 14(4), 314-16.
- [62] Yates BA, de Shazo DR. (2001) *Delayed hypersensitivity skin testing*. Immunology and Allergy Clinics of North America 2001; 21(2): 1-10.
- [63] Yi Luo, Martin E. Dorf (2001) *Delayed-Type Hypersensitivity*. Current Protocols in Immunology. Mayo 2001.