



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**EVALUACIÓN DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA COMO ADYUVANTE EN LA
PROLIFERACIÓN CELULAR EN BAZO Y NODO LINFÁTICO EN MODELO MURINO**

TESIS

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

PRESENTA

PENÉLOPE CIPATLI DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ

ASESORES:

DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS

M. V. Z. GERMÁN ISAURO

GARRIDO FARIÑA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2010



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos
comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Evaluación del factor de transferencia como adyuvante en la proliferación
celular en bazo y nodo linfático en modelo murino.

que presenta la pasante: Penélope Cipatli Domínguez Martínez
con número de cuenta: 30130496-0 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en
el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Septiembre de 2010

PRESIDENTE MC. Francisco López Mejía

VOCAL Dr. Andrés Romero Rojas

SECRETARIO QFB. Héctor Coss Garduño

PRIMER SUPLENTE MVZ. Angel Germán Martínez Sosa

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Ladislao Palomar Morales

Dedicatorias

Este trabajo tal vez tenga mi nombre como autora, pero en realidad está hecho por mi familia, pues siempre estuvo conmigo y me impulsó para llegar a concluir este ciclo. Este esfuerzo es para cada uno de ellos.

Al ser más maravilloso que Dios pudo colocar en mi camino y me ha traído sólo cosas magníficas, Luis gracias por todo tu amor, tu calidez, paciencia e inteligencia. Gracias mi vida por darme tu mano en los momentos más difíciles, por tu sonrisa que me ilumina e impulsa. Gracias por darme los mejores momentos de mi vida, por crecer conmigo, por ser mi mejor amigo, mi compañero y sobre todo mi amado. Te amo.

A mi pequeño hijo, Ernesto Demián, cúspide del hermoso amor, que me ha enseñado a ver la vida con otros ojos, gracias por tu ternura, tu carita linda me llena todos los días, te amo mi niño y sólo espero que vivas feliz sin temor, en un ambiente de confianza, amor y respeto. Gracias por dejarme acompañarte en este camino, eres lo más preciado para nosotros, te amo hijito.

A mi hermana Metztli, gracias por tu entrega, honestidad y fortaleza. Te quiero mucho hermanita, todo lo que hemos vivido lo guardo en mi corazón como momentos muy preciados. A mi hermano Axel, desde que te mire por primera vez supe que eres un ser maravilloso, admiro tu forma de ser tan auténtica, eres un hombre muy inteligente y lleno de amor, gracias por ser tú, te quiero mucho hermanito. A mi hermano Ilich, pequeño aguerrido, gracias por tu fortaleza e inteligencia, te quiero mucho flaco. Los amo y cuentan conmigo para todo.

A mi madre, Soledad Martínez, gracias mamá por enseñarme esa fuerza que te hace perseverar hasta llegar al fin, sabes que admiro tu lucha por ayudarnos a ser mejores, te quiero mucho mamá.

A mi padre Mario Domínguez, gracias por mostrarme esa tenacidad, por tus consejos y todo tu amor, te quiero.

A mi tío Roberto Martínez, por cuidarme y enseñarme desde pequeña a indagar y preguntarse más de las cosas, por quererme como a una hija y por todo tu apoyo en momentos cruciales, te quiero.

A mi tía Donaji Martínez, por tu ternura y honestidad, por procurarme y consentirme, por ser además una buena amiga, te quiero mucho tía y sabes que puedes contar siempre conmigo.

A mi familia adoptiva, María Elena Ríos y Simón Garay, gracias por acogerme con el cariño que se la da una hija, por sus buenos consejos, por ser un ejemplo no sólo como padres, sino como seres humanos, los quiero. A mis cuñados Berenice y Jonathan, gracias por su apoyo y los buenos momentos que hemos pasado, los quiero.

A mi abuelita Lucía Hernández, por cuidarme, impulsarme y ser todo un ejemplo de fuerza y coraje, te extraño mucho, sé que estarías orgullosa de mí. Te amo viejita.

A mi abuelita Consuelo Tovar, gracias por ser fuerte y luchadora, no sabes cómo disfruto tus pláticas que siempre me dejan algo, te quiero mucho.

A mis primos Xanat, Yolatl, Ariel, gracias pequeños por su nobleza y cariño.

A todos los locos del CCH; Iraís comadre querida, gracias por todos esos momentos alegres, amargos y de reventón que hemos pasado, te quiero mucho, Paty gracias por tu sencillez y ternura, te quiero pequeña, Gabby gracias por confiar en mí y darme esos jalones de oreja, te quiero amiguís. Rafael, Maries, Claudia, Rosario, Leticia, Jorge, Ángel, Gabriel, Miguel, Jonathan, Javier, Deisy, Jessica, gracias por compartir momentos hermosos y gracias por su apoyo. A todos ustedes gracias por permitirme crecer a su lado.

A esas personas únicas que sólo podía encontrar en un lugar especial y llamarlas hermanas, gracias Minerva por cambiar mi visión del andar en esta vida, te quiero mucho, a Diana, Cristina, Jeannette, Rosa, Fanny, gracias por compartir su conocimiento y su cariño, las quiero.

A mis amigos de la FES, gracias Norita por tu cariño, tu amistad tan entregada y escucharme siempre, a Paola por su fuerza, inteligencia y compartir conmigo esas cosas fantásticas, eres un ser maravilloso, a Aholiba por todo tu apoyo, comprensión y amistad incondicional, a Lourdes por su tiempo, sus consejos y apoyo, las quiero mucho niñas.

También gracias a esas personas que me alentaron a lo largo de la carrera y sembramos las bases para una larga amistad: Nitzí, Verito, Martha, Gerardo, Camilo, Dario, Enrique, Mauro, Gaby, Elvía, Iris, Sergio, Haydee, Javier, Alberto, Juan.

A esa gente maravillosa que me enseñó mucho en el aspecto humano y profesional, gracias a las personas del InDRE, Olga, América, Yolanda, Araceli, Arita, Antonio, Raquel, Mario, Fernando. Al equipo del CUD, Marthita, Jesús, Gaby, Claudia y Jaimie gracias por enseñarme varias cosas y brindarme todo su apoyo.

A mis asesores, Dr. Andrés Romero muchas gracias por su apoyo y confianza, MF Germán Garrido muchas gracias por su tiempo y su apoyo.

En especial quiero agradecer a los profesores que se tomaron el tiempo para revisar este trabajo y darme sus comentarios que me enriquecieron mucho, MVZ Germán Martínez, MC Francisco López, QFB Ladislao Palomar y QFB Héctor Coss.

Gracias a esta magnífica institución en donde viví los mejores años, gracias Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme obtener conocimiento para crecer y hacer que todo ello se transforme en calidad humana que se vea reflejada en este hermoso país.

INDICE

I. Índice de figuras	III
II. Índice de tablas	IV
III. Índice de gráficas	V
IV. Abreviaturas	VI
V. Resumen	VII
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Células del sistema inmunitario	1
1.2 Respuesta humoral	4
1.3 Respuesta celular	5
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1 Órganos linfoides	6
2.2 Nodo linfático	6
2.2.1 <u>Histología del nodo linfático</u>	7
➤ 2.2.1.1 Corteza	7
➤ 2.2.1.2 Folículos linfoide y centro germinal	9
➤ 2.2.1.3 Zona paracortical	10
➤ 2.2.1.4 Médula	11
2.2.2 <u>Histofisiología de nodo linfático</u>	12
2.3 Bazo	14
2.3.1 <u>Histología del bazo</u>	15
➤ 2.3.1.1 Pulpa roja	15
➤ 2.3.1.2 Pulpa blanca	16
2.3.2 <u>Histofisiología del bazo</u>	17

2.4 Adyuvantes	18
2.5 Factor de transferencia (FT) o extracto dializable de leucocitos (DLE)	21
<u>2.5.1 Componentes del DLE</u>	22
<u>2.5.2 Mecanismo de acción del DLE</u>	23
<u>2.5.3 Fuentes de obtención del DLE</u>	24
<u>2.5.4 Aplicaciones del DLE</u>	24
<u>2.5.5 Uso del FT como promotor de proliferación linfocítica</u>	25
<u>3. JUSTIFICACIÓN</u>	26
<u>4. OBJETIVOS</u>	27
<u>5. HIPÓTESIS</u>	28
<u>6. MATERIAL Y MÉTODOS</u>	29
<u>7. RESULTADOS</u>	33
<u>8. DISCUSIÓN</u>	42
<u>9. CONCLUSIONES</u>	49
<u>10.REFERENCIAS</u>	50

I. Índice de figuras

- Figura 1. Respuesta humoral, procesamiento de un antígeno exógeno y producción de anticuerpos..... 4
- Figura 2. Respuesta celular, procesamiento de un antígeno endógeno e inducción a apoptosis..... 5
- Figura 3. Esquema que representa la circulación linfática del nodo..... 8
- Figura 4. Esquema que representa la histología del nodo linfático..... 12
- Figura 5. Esquema que representa la histología del bazo..... 15
- Figura 6. Imagen de pulpa roja de bazo de ratón a 100x, tinción H-E. 16
- Figura 7. Imagen de pulpa blanca de ratón a 100x, tinción H-E. 17

II. Índice de tablas

- Tabla 1. ANOVA para determinar si diferentes dosis de FT influyen en la densidad celular en pulpa roja ($P < 0.05$) 33
- Tabla 2. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ OVA interfiere en la densidad celular en pulpa blanca ($P < 0.05$) 34
- Tabla 3. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ OVA interfiere en la densidad celular totales en bazo 34
- Tabla 4. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ OVA interfiere en la densidad celular en nodo linfático. ($P < 0.05$) 35
- Tabla 5. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ BSA interfiere en la densidad celular en pulpa roja. ($P < 0.05$) 36
- Tabla 6. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ BSA interfiere en la densidad celular en pulpa blanca. ($P < 0.05$) 37
- Tabla 7. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ BSA interfiere en la densidad celular neta en bazo 37
- Tabla 8. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ BSA interfiere en la densidad celular en nodo linfático ($P < 0.05$) 38
- Tabla 9. ANOVA Bifactorial (órgano y dosis) para el tratamiento FT + OVA 39
- Tabla 10. ANOVA Bifactorial (órgano y dosis) para el tratamiento FT + BSA 40

III. Índice de gráficas

- Gráfica 1. Densidad celular en bazo con el tratamiento de FT + Ovoalbúmina 33
- Gráfica 2. Densidad celular en nodo linfático con el tratamiento de FT +
Ovoalbúmina 35
- Gráfica 3. Densidad celular en bazo con el tratamiento de FT + BSA 36
- Gráfica 4. Densidad celular en nodo linfático con el tratamiento de FT + BSA 38
- Gráfica 5. Comparación del efecto de las dosis de FT+ OVA 39
- Gráfica 6. Comparación del efecto de las dosis de FT+ BSA en los diferentes
órganos estudiados 40

IV. Abreviaturas

Ag	Antígeno
BSA	Albúmina sérica bovina
CD	Cluster Designation
CPA	Célula presentadora de antígeno
DLE	Extracto dializable de leucocitos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTH	Hipersensibilidad de tipo retardado
ENCB	Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Fc	Fracción cristalizable
FCA	Adyuvante completo de Freund
FT	Factor de transferencia
H-E	Hematoxilina - eosina
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IMREG	Moléculas reguladoras del sistema inmune
KDa	Kilodaltones
LSF	Factor supresor linfocítico
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NK	Células asesinas (natural killer)
OVA	Ovoalbúmina
RCT	Receptor de células T
RI	Respuesta inmune
RNA	Ácido ribonucleico
Tc	Linfocito T citotóxico
Th	Linfocito T colaborador
Ts	Linfocito T supresor
VEA	Vénulas del endotelio alto

V. Resumen

El Factor de Transferencia (FT) es un extracto dializado de leucocitos de sangre periférica formado por péptidos pequeños que constan de 44 aminoácidos con un peso menor a 10 KDa, están activos en el sistema inmune incorporándose a células inmunitarias no sensibilizadas, otorgándoles la información específica de una célula sensibilizada. Huard y Sabet en 1978 realizaron un experimento con FT de ratón y FT humano, en modelo murino; encontrando cambios morfológicos en tejido esplénico, así que sugirieron un efecto inmunorregulador atribuido al FT.

En la actualidad sólo existen unos cuantos grupos que investigan el FT en nuestro país, como el que dirige el Dr. Sergio Estrada Parra en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional. Este equipo ha desarrollado un medicamento llamado Transferon que tiene como principio activo el FT. Dicha sustancia se administró en diversas dosis a ratones para conocer la celularidad de bazo y nodos linfáticos axilares mediante histología.

Para determinar si existía diferencia estadísticamente significativa entre los diversos tratamientos se utilizó el estudio ANOVA y se encontró que el Factor de transferencia induce un aumento en la densidad de células en el bazo y nodo linfático, por lo que se puede decir que reacciona positivamente como adyuvante, y al no haberse encontrado hasta ahora efectos adversos de esta sustancia, abre un camino para su empleo como componente de vacunas.

1. ANTECEDENTES

Todos los tejidos vivos están sometidos a la amenaza constante de invasión por agentes extraños y microorganismos (patógenos) causantes de enfermedad. Estos microorganismos pueden entrar en el cuerpo y destruir el tejido funcional. Para contrarrestarlos, se han desarrollado tres líneas fundamentales de defensa:

- Mecanismos superficiales de protección.- La piel funciona como barrera, las superficies mucosas poseen sustancias antibacterianas como la enzima lisozima o el mantenimiento de un ambiente ácido en estómago y vagina que inhibe el crecimiento de patógenos (Regueiro, 2003).
- Defensas tisulares inespecíficas.- Inflamación ya sea aguda o crónica cuyo objetivo es retirar el tejido muerto y la materia extraña y sustituir el tejido. Activación de la cascada del complemento, el cual provoca la lisis celular, opsonización y quimiotaxis. Asimismo se incluyen a los macrófagos y neutrófilos que fagocitan invasores y las células asesinas naturales (NK) que destruyen células tumorales. A estos tipos de defensa también se le conoce como sistema inmunitario innato.
- Respuestas inmunitarias específicas.- También llamado sistema inmunitario de adaptación. Comprenden la inmunidad celular e inmunidad humoral (Roitt, 2000).

Una estructura extraña que puede despertar una respuesta inmunitaria se conoce como **inmunógeno**, un antígeno es una molécula que interactúa con las inmunoglobulinas producidas por las células B (Kindt, 2007).

1.1 Células del sistema inmunitario

Los **linfocitos** constituyen el 20-50% de los leucocitos circulantes, sus núcleos son ovoides o arriñonados y poseen una cromatina densa, típica de células con una actividad de biosíntesis relativamente escasa, el citoplasma muestra una basofilia pálida debido al número considerable de ribosomas libres que posee; el retículo endoplásmico rugoso es mínimo, el aparato de Golgi es rudimentario y sólo se reconocen algunos lisosomas, el contenido de glucógeno es variable y la membrana plasmática tiene pequeñas proyecciones (Roitt, 2000).

Los **linfocitos B** se originan y adquieren su capacidad inmunitaria en la médula ósea, durante este proceso cada célula elabora de 50000 a 100000 moléculas de IgM e IgD y las inserta en su membrana plasmática de tal manera que los sitios de unión del epítipo de los anticuerpos se orientan hacia el espacio extracelular. Cuando reaccionan con el antígeno se activan y se diferencian hacia células de memoria y células plásmáticas productoras de anticuerpos, los cuales se vierten a la linfa y sangre teniendo a su cargo la respuesta inmunitaria humoral. La respuesta inmunitaria comienza con lentitud y no es muy potente la primera vez, se llama primaria y en ésta se secreta IgM; con exposiciones subsecuentes al mismo antígeno se produce la respuesta inmunitaria secundaria caracterizada por el cambio de isotipo de IgM a IgG, esta respuesta es más rápida e intensa (Ross, 2005)

Los **linfocitos T** también derivan de células de la médula ósea, los linfocitos inmaduros (prelinfocitos) emigran desde la médula ósea al timo, donde se desarrollan a linfocitos T

maduros (dependientes del timo). El proceso de maduración consiste en proliferación, recombinación de los genes del RCT para producir una enorme cantidad de especificidades antigénicas y adquisición de los marcadores de superficie de las células como CD3. Aquí los linfocitos T que pueden reaccionar con “autoantígenos” son eliminadas por apoptosis creándose un estado de autotolerancia (durante el desarrollo embrionario, si un linfocito encuentra la sustancia a la cual está diseñado para reaccionar, la célula se destruye: eliminación clonal, de manera que esta clona particular muere, o el linfocito se incapacita: anergia clonal, y no puede montar una respuesta inmunitaria, aunque esté presente) (Young, 2000). Las células maduras pueblan los tejidos linfoides periféricos en búsqueda de antígenos. Los linfocitos T se dividen en:

- Linfocitos T cooperadoras (linfocitos Th) Estos linfocitos ayudan a otros a llevar a cabo sus funciones efectoras mediante la secreción de diversos mediadores que actúan localmente conocidos como citocinas, estas funciones abarcan la activación de los linfocitos B, la regulación de la función de los linfocitos T citotóxicos y la activación de los macrófagos en la hipersensibilidad retardada. Las células Th se caracterizan por la presencia del marcador CD4.

- Linfocitos T citotóxicos (células Tc). Estos linfocitos intervienen en la eliminación de las células malignas o infectadas por virus. Presentan el marcador CD8, para activarse y proliferar formando clonas de células efectoras, necesitan de la participación de los linfocitos Th. (Young, 2000).

1.2 Respuesta humoral

Los linfocitos B se activan por la unión del antígeno a su BCR (receptor del linfocito B) expresados en su superficie. Como célula presentadora de antígeno, el linfocito B internaliza y procesa el antígeno y luego exhibe parte de este en la superficie junto a moléculas MHC II. El receptor de célula T (TCR) en un linfocito $CD4^+$ cooperador reconoce tanto al antígeno como a la molécula MHC II y se activa. El linfocito T $CD4^+$ activado libera las interleucinas IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6, que promueven la mitosis y la diferenciación de linfocitos B en plasmocitos y células B de memoria (Fig. 1). La unión del epítipo con la Fc del anticuerpo funciona como mediador para reconocer agentes patógenos específicos y sus productos (Roitt, 2000). Si el antígeno es una bacteria, el complejo Ag-Ig también puede activar un sistema de proteínas plasmáticas llamado sistema de complemento y hacer que los componentes C3b y C4b se fijen a ésta y actúen como opsoninas favoreciendo su fagocitosis por los macrófagos (opsonización), pero también se induce la lisis celular (Ross, 2005).

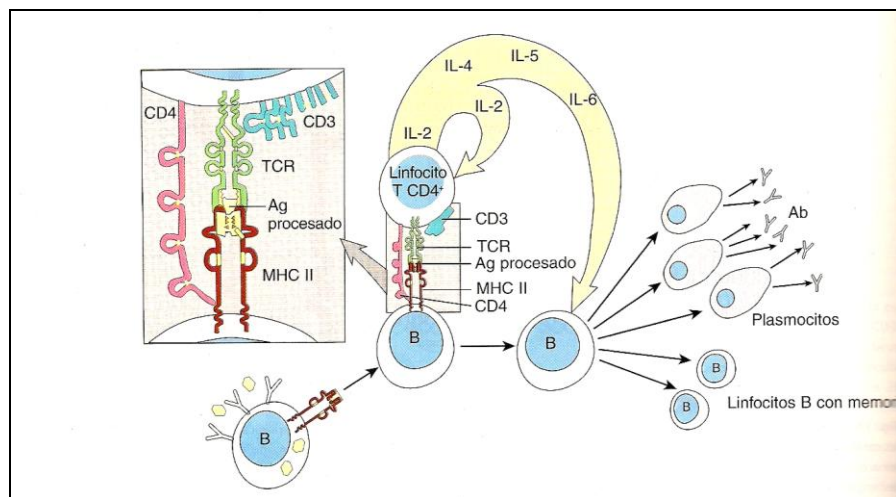


Figura 1. Respuesta humoral, procesamiento de un antígeno exógeno y producción de anticuerpos.

1.3 Respuesta celular

Una célula nucleada, como el macrófago, expresa moléculas MHC I, posterior al procesamiento de un antígeno intracelular, que interacciona con el RCT adecuado en la superficie de un linfocito T CD8⁺ citotóxico. Este posee receptores de IL-2, la unión a esta interleucina estimula a la célula para que se divida y se diferencie, los nuevos linfocitos T CD8⁺ migran hacia el sitio de infección (Ross, 2005). Al reconocer las proteínas extrañas los linfocitos secretan perforinas y granzimas que destruyen las células infectadas (Fig. 2).

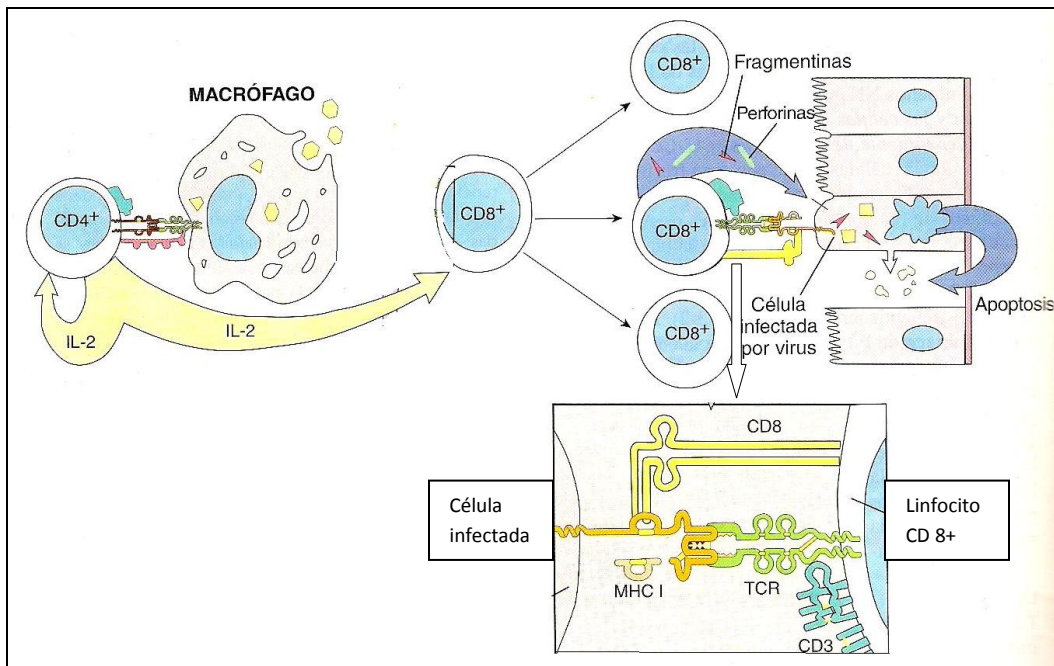


Figura 2. Respuesta celular, procesamiento de un antígeno endógeno e inducción de la apoptosis

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Órganos linfoides

Los órganos linfoides se clasifican en dos categorías: primarios y secundarios.

- Los órganos linfoides primarios (centrales) tienen a su cargo el desarrollo y la maduración de linfocitos a células con capacidad inmunitaria, en el hombre son el hígado fetal, la médula ósea prenatal y posnatal, y el timo (Gartner, 2001).
- Los órganos linfoides secundarios (periféricos) se encargan de proveer el ambiente apropiado para que las células con capacidad inmunitaria pueden reaccionar entre sí, con antígenos y otras células para montar una respuesta inmunitaria contra antígenos o patógenos invasores. Los nodos linfáticos, el bazo y los tejidos linfoides relacionados con la mucosa constituyen los órganos linfoides secundarios (Gartner, 2001).

2.2 Nodos linfáticos

Los linfocitos maduros se distribuyen en todo el organismo, sin embargo, muchos linfocitos residen en estructuras encapsuladas y muy organizadas denominadas nodos linfáticos que se sitúan a lo largo de los vasos mayores regionales del sistema vascular linfático. Tienden a disponerse en grupos, sobre todo en las áreas en las que los vasos linfáticos convergen para formar grandes conductos como sucede en el cuello, las axilas, las ingles, los hilios pulmonares y las zonas paraaórticas (Young, 2000).

2.2.1 Histología del nodo linfático

Desde el punto de vista histológico un nodo linfático está subdividido en tres regiones: corteza, paracorteza y médula. Todas estas regiones tienen un abastecimiento abundante de sinusoides, espacios cerrados recubiertos por endotelio a través de los cuales se filtra la linfa.

2.2.1.1 Corteza

La cápsula de tejido conectivo denso irregular, con colágeno, envía trabéculas al parénquima del nodo linfático y subdivide la región externa de la corteza en compartimientos incompletos que se extienden hasta la cercanía del hilio (sitio por el que arterias y venas entran y salen del nodo). La cápsula está engrosada en el hilio y a medida que los vasos penetran en el nodo son rodeados por una vaina de tejido conectivo que se deriva de la cápsula. Suspendida de ésta última y de las trabéculas se encuentra una red tridimensional de tejido conectivo reticular que forma la estructura arquitectónica de la totalidad del nodo linfático (Young, 2000)

Los vasos linfáticos aferentes con válvulas que mantienen el flujo en una sola dirección, perforan la cápsula en la superficie convexa del ganglio y vacían su linfa en el seno subcapsular, que se localiza justo por debajo de la cápsula.(Fig. 3) En este seno pueden encontrarse también células de Langerhans de la piel, estas células tienen una membrana superficial muy plegada, por lo que a veces se les llama células veladas; es probable que sean precursoras de las células interdigitadas dendríticas de la región paracortical. El seno se continúa con los senos corticales (senos paratrabeculares) que son paralelos a las

trabéculas y llevan la linfa a los senos medulares, para al final pasar a los vasos linfáticos eferentes, estos senos tienen una red de células reticulares estrelladas. Los macrófagos, unidos a las células reticulares, fagocitan el material particulado extraño (Ross, 2005). Además las células linfoides pueden entrar o salir de los sinusoides pasando entre su recubrimiento de células escamosas. El seno subcapsular, los senos trabeculares, otros senos corticales y los senos medulares se mantienen permeables gracias al fino tejido reticular que los atraviesan. (Junqueira, 2004).

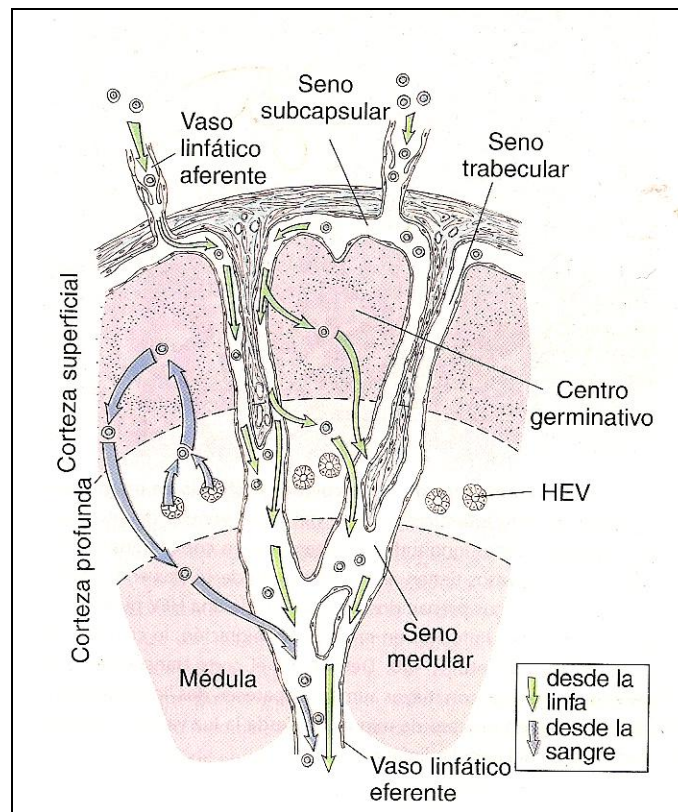


Figura 3. Esquema que representa la circulación linfática del nudo

2.2.1.2 Folículos linfoides y centro germinal

El compartimiento intersticial del nodo linfático contiene tres regiones funcionales distintas, cada una poblada por diferentes tipos de linfocitos. Los linfocitos de la corteza superficial se disponen, en su mayoría en folículos linfoides esféricos que son el lugar principal donde se localizan y proliferan los linfocitos B. Los folículos linfoides se clasifican en folículos primarios, si no tienen una área pálida central y folículo secundario si la tiene, indicando el centro germinal. Estos son lugares donde los linfocitos B (aquí llamados células centrofoliculares) proliferan y su color más claro se debe a la cromatina nuclear de sus células, que no está condensada como en los linfocitos pequeños de los folículos primarios y del borde o zona de manto de dichos folículos. La zona de manto está formada por linfocitos B pequeñas en reposo y entre ellas se encuentran dispersos linfocitos Th (reconoce al Ag y estimula a los linfocitos B), células dendríticas foliculares (principales CPA, pueden retener al Ag por meses y es posible que intervengan en el mantenimiento de la actividad de las células de memoria) y macrófagos con restos de células muertas por apoptosis (contienen en el citoplasma numerosos cuerpos apoptóticos procedentes de los linfocitos B que no sobrevivieron al proceso de transformación blástica) (Young, 2000).

Cuando los linfocitos B encuentran un Ag con el que puedan reaccionar, penetran en el ciclo de transformación blástica para producir clones de células plasmáticas y de linfocitos B de memoria. El primer paso es la activación, que da origen a centroblastos, grandes células de núcleo redondeado con actividad mitótica que ocupan la parte más oscura en la porción medular del centro germinal. Estas células se diferencian a centrocitos, que

ocupan la zona media pálida del centro germinal, son células de tamaños variables y con membranas nucleares irregulares y plegadas por lo que también se les llama células hendidas. Los centrocitos emigran hacia el extremo capsular más pálido del centro germinal donde entran en nuevos ciclos de división para producir inmunoblastos y linfocitos B de memoria. Los primeros emigran a los cordones medulares donde completan su diferenciación a células plasmáticas capaces de secretar Ig, las células de memoria pueden fijar su residencia en la zona del manto de los folículos o unirse a la reserva circulante de linfocitos pequeños (Fine, 2000).

2.2.1.3 Zona paracortical

Los linfocitos T son las células predominantes en la zona paracortical, pero no se organizan en folículos. Los linfocitos T circulantes de las subpoblaciones Th y Tc penetran en el nodo linfático con la sangre arterial y a continuación emigran a través de las paredes de las vénulas del endotelio alto (VEA) hasta alcanzar la zona paracortical; regresan a la circulación entre 6 y 16 horas después. Cuando se activan, los linfocitos T aumentan de tamaño para formar inmunoblastos citológicamente similares a los linfocitos B y después se dividen por mitosis para formar clones expandidos. Incluso, en respuesta inmunitaria (RI) dominada por linfocitos T, la zona paracortical puede aumentar mucho de tamaño, patrón conocido como reacción paracortical, después los linfocitos T activados se diseminan con la circulación hacia las localizaciones periféricas, donde desarrollan la mayor parte de su actividad (Young, 2000)

Las vénulas postcapilares de la región paracortical tienen una estructura poco habitual que facilita el paso de los linfocitos T desde la sangre circulante al ganglio linfático. Las VEA están revestidas por células endoteliales que expresan moléculas de superficie llamadas adresinas, las cuales se unen específicamente a los linfocitos y permitiendo la unión de éstos al endotelio, como primer paso de su emigración a través del tejido, fenómeno conocido como emperipolesis.

2.2.1.4 Médula

La médula está compuesta por cordones medulares ramificados separados por senos medulares irregulares (Fig. 4). Los cordones contienen linfocitos pequeños (linfocitos Th de memoria), macrófagos, células plasmáticas y sus precursores (inmunoblastos) que terminan de madurar. Con la tinción verde de metilo/ pironina las células plasmáticas se observan con citoplasmas grandes y excéntricos teñidos de rojo y sus núcleos poco teñidos con nucléolos predominantes; la pironina tiene una notable afinidad por el ARN ribosómico, de ahí la fuerte tinción del citoplasma, ocupado por numerosos ribosomas entregados a la síntesis de Ig (Junqueira, 2004).

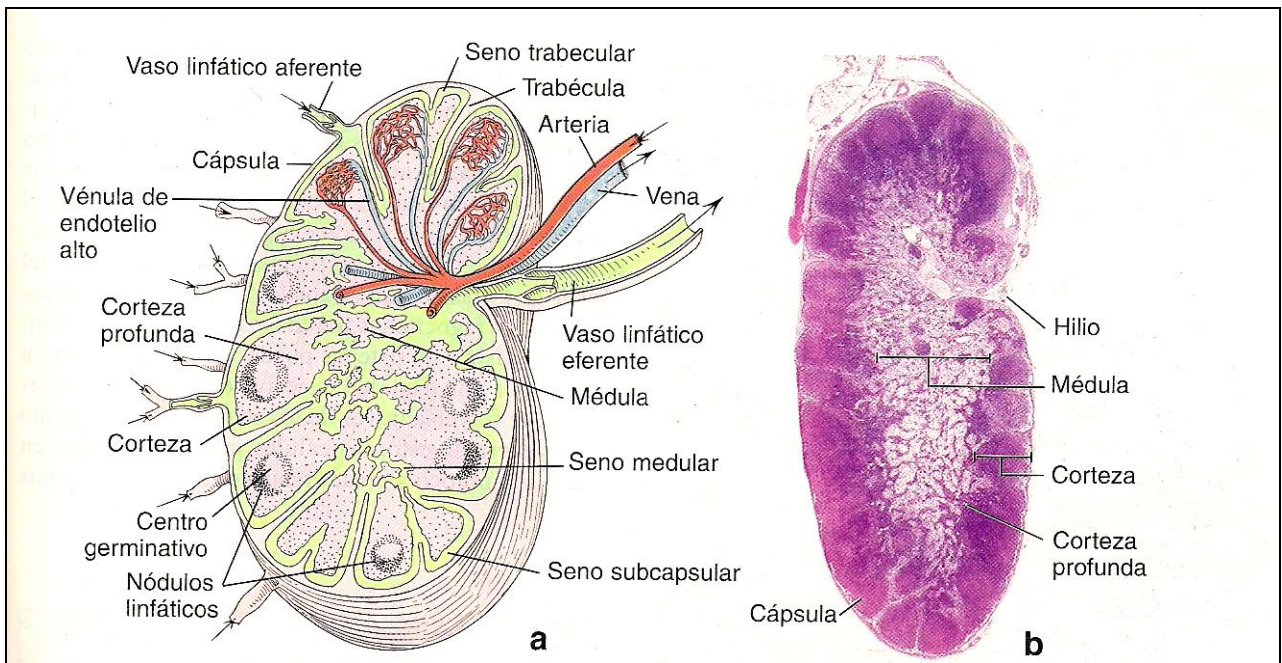


Figura 4. A) Esquema que representa la histología del nodo linfático. B) Fotomicrografía de un corte de nodo linfático teñido con Hematoxilina-Eosina, 18x.

2.2.2 Histofisiología de nodo linfático

En los nodos linfáticos se desarrollan cuatro funciones interrelacionadas:

- Filtración inespecífica de las partículas y microorganismos de la linfa gracias a la actividad fagocitaria de los macrófagos, para evitar que el material extraño alcance la circulación general.
- Interacción de los linfocitos circulantes con la linfa que contiene antígenos
- Activación y proliferación de los linfocitos B que, en respuesta a una estimulación antigénica adecuada, conllevan la formación de células plasmáticas y la producción de anticuerpos.

- Agregación, activación y proliferación de linfocitos T para producir linfocitos Th y Tc activados.

Los linfocitos maduros (vírgenes) viajan entre la periferia y los tejidos linfoides organizados a través de la circulación sanguínea y linfática. Penetran en los nodos linfáticos desde la sangre o a través de los vasos linfáticos aferentes. En el nódulo, entran en estrecho contacto con las células dendríticas de los folículos y la región paracortical. Los linfocitos que no pueden responder a los antígenos existentes en el nodo pasan a los nodos siguientes de la cadena a través de los vasos linfáticos eferentes y terminan por volver a la sangre a través del conducto torácico, para repetir el proceso una y otra vez en su interminable búsqueda de antígenos. Los linfocitos que pueden unirse a un antígeno existente en el nódulo mediante sus receptores de superficie quedan atrapados en él, donde se realiza una expansión clonal (Gartner, 2001). Los linfoblastos y las células de memoria producidas en este proceso son capaces de acudir a los lugares donde existe inflamación del tejido y llevar a cabo allí sus funciones efectoras.

2.3 Bazo

El bazo es el órgano linfoide más grande del cuerpo, se localiza en el peritoneo en el cuadrante superior izquierdo de la cavidad abdominal. Su cápsula formada por tejido conectivo denso irregular, fibroelástico, que en ocasiones aloja células de músculo liso, está rodeada por una túnica serosa. El epitelio escamoso simple de este último proporciona una superficie lisa al bazo (Stevens, 2006).

El bazo tiene una superficie convexa y una cóncava, en donde está el hilio. La cápsula del bazo está engrosada en el hilio y es aquí donde entran las arterias y sus fibras nerviosas acompañantes, y salen venas y vasos linfáticos. Asimismo posee una cápsula externa de fibroelastina fina pero densa, de la que salen trabéculas que se extienden por el parénquima. Recibe su irrigación de la arteria esplénica y drena por la vena esplénica. La arteria perfora la cápsula de tejido conectivo y ramifica en arterias trabeculares, la túnica adventicia de éstos tienen una vaina linfática periarterial (VLPA) que infiltra sobre todo linfocitos Th, denominándose ahora arteria central, ésta a su vez se divide en arterias de pulpa roja y termina como arteria linfonodular. Las arterias de pulpa roja que penetran en la pulpa roja e irrigan mediante divisiones: arteriola penicilar, arteriola pericapilar y vasos capilares terminales, los cuales llevan sangre a los senos esplénicos. El método de suministro contempla básicamente dos teorías: la teoría de la circulación cerrada dice que el recubrimiento endotelial de los capilares arteriales terminales se continúa en el endotelio del seno, mientras que en la teoría de la circulación abierta se piensa que concluyen antes de llegar a los sinusoides y que la sangre de estos vasos se filtra a través de la pulpa roja a los senos. (Fine, 2000).

El bazo parece estar formado por nódulos blancos separados, la llamada pulpa blanca (que consiste en agregados linfoides), inmersos en una matriz roja denominada pulpa roja (que corresponde a tejido vascularizado) (Fig. 5).

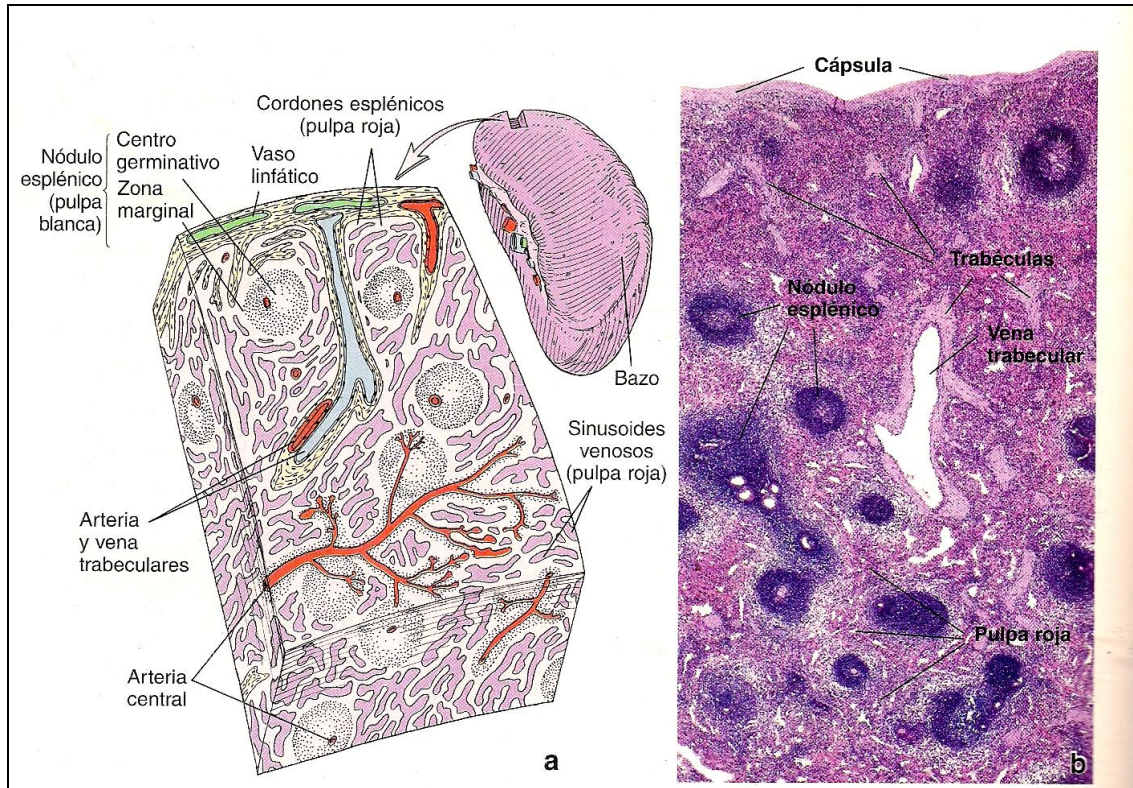


Figura 5. A)Esquema que representa la histología del bazo B)Fotomicrografía del bazo, tinción H-E 45x.

2.3.1 Histología del bazo

2.3.1.1 Pulpa roja

La pulpa roja semeja una esponja en la que los espacios dentro de la misma representan los senos y el material de la esponja entre los espacios indica los cordones esplénicos (Fig. 6). La mayor parte de la pulpa roja está formada por un tejido laxo sostenido por fibras de

reticulina y permeado por capilares. El recubrimiento endotelial de los senos esplénicos es inusual porque sus células son fusiformes y semejan duela de madera, más aún los espacios entre células contiguas son abundantes. Los senos están rodeados de fibras reticulares (que se continúan con las de los cordones esplénicos) que envuelven los senos como fibras delgadas, individuales, de un filamento. Los cordones esplénicos se componen de una red laxa de fibras reticulares, en cuyos intersticios penetra sangre. Los macrófagos son abundantes en la cercanía a los sinusoides (Gartner, 2001).

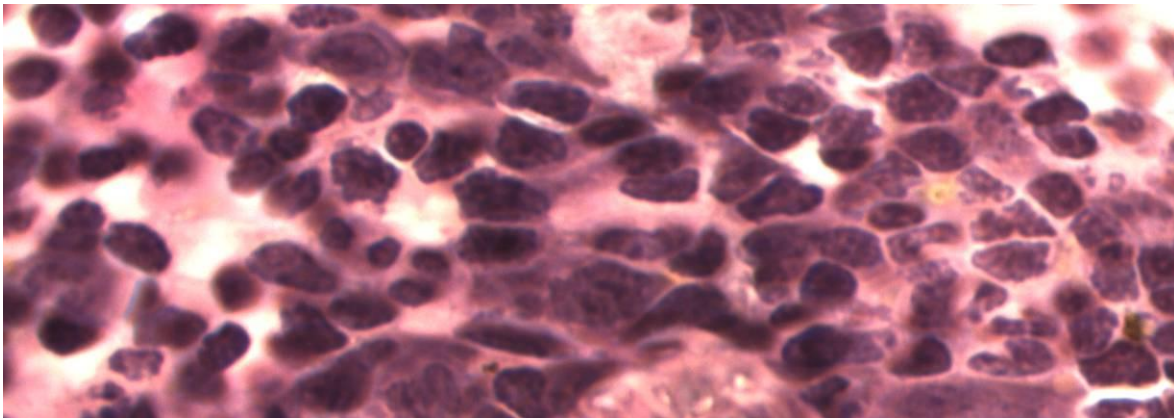


Figura 6. Imagen de pulpa roja de bazo de ratón a 100x, tinción H-E

2.3.1.2 Pulpa blanca

La pulpa blanca del bazo está formada por las dos clases de células linfoides, T y B. Las funciones de estas áreas parecen similares, respectivamente a las de la región paracortical y de la corteza superficial de los nodos linfáticos. Contiene un área de linfocitos T formando una vaina cilíndrica excéntrica típica alrededor de una arteriola central y en la que se encuentran linfocitos de tipo Th principalmente. (Fig. 7)

Los linfocitos B forman folículos habitualmente localizados cerca de una arteriola, en personas jóvenes muchos de los folículos poseen centros germinales similares a los del nodo. En la periferia de los folículos existe una estrecha zona de linfocitos pequeños denominada zona del manto y continua una zona marginal de linfocitos dispuestos de una forma menos densa y sostenidos por una trama de fibras de reticulina, la zona perilinfoide de la pulpa roja también contiene linfocitos que emigran hacia la pulpa blanca (Stevens, 2006).

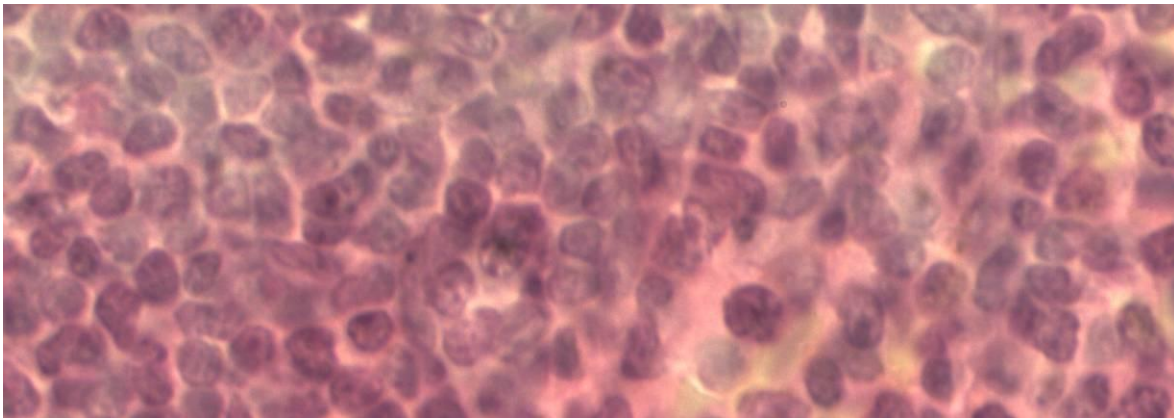


Figura 7. Imagen de pulpa blanca de ratón a 100x, tinción H-E

2.3.2 Histofisiología del bazo

Conforme la sangre penetra en los senos de la zona marginal, fluye hacia una zona rica en macrófagos. El material que no se elimina se depura en la pulpa roja en la periferia de los senos esplénicos. Las células linfoides se forman en la pulpa blanca en respuesta a un reto antigénico. Los linfocitos B de memoria y las células plasmáticas se forman en los folículos linfoides, en tanto que los linfocitos T de diversas subcategorías se producen en la VLPA.

Los linfocitos recién formados penetran en los senos marginales y migran al sitio de reto antigénico o se constituyen en parte del fondo común circulante de linfocitos. Algunas células plasmáticas pueden permanecer en la zona marginal, elaborar Ig y verterlas a los senos marginales (Young, 2000).

Los Ag solubles de origen sanguíneo se inactivan por las Ig, en tanto que las bacterias son opsonizadas y eliminadas por macrófagos o neutrófilos. Los CTL formados en la VLPA destruyen las células transformadas por virus. Los macrófagos destruyen plaquetas envejecidas y vigilan a los eritrocitos en su migración de los cordones esplénicos entre las células endoteliales de los senos. Puesto que los eritrocitos más viejos pierden su flexibilidad no pueden penetrar en los espacios entre las células endoteliales y son fagocitados por macrófagos (hemocateresis), estos también vigilan la superficie de los eritrocitos porque al envejecer pierden residuos de ácido siálico de su superficie y exponen moléculas de galactosa que inducen la fagocitosis. (Fine, 2000).

2.4 Adyuvantes

Los adyuvantes son sustancias o preparados químicos que, incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune. El mecanismo de acción de estas sustancias ha sido objeto de numerosos estudios y, al parecer, existen diversos factores que explican su modo de acción. El antígeno libre normalmente difunde con mucha rapidez desde los tejidos locales que rodean el sitio de inoculación, y una de sus funciones importantes es crear un reservorio o depósito del antígeno de larga vida (Regueiro, 2003).

Las investigaciones realizadas han demostrado que virtualmente todos los adyuvantes activan o estimulan a los macrófagos, éstos cuando son activados estimulan la respuesta inmune por un incremento de la cantidad de antígeno expresado en la membrana celular y de la eficiencia de su presentación a los linfocitos. El macrófago también libera sustancias como TNF α (factor de necrosis tumoral) e IL-1, que promueven la activación de los linfocitos. Por otro lado, algunos adyuvantes poseen la capacidad de actuar específicamente sobre los linfocitos; pero en general, esto funciona mejor si facilitan la liberación simultánea del antígeno y de sustancias inmunomoduladoras hacia el tejido linfoide (Ross, 2005).

Algunos adyuvantes y sus mecanismos de acción:

Alúmina: Son sales insolubles de sulfato aluminico-potásico. Actúa mediante varios mecanismos: A) Precipita el antígeno. B) Al inyectarse va liberando el antígeno lentamente, con lo que se suministra un estímulo persistente (el Ag dura varios días en el lugar donde se inoculó). El Ag precipitado tiene mayor tamaño, por lo que puede ser fagocitado más fácilmente, y por lo tanto es presentado más efectivamente. C) Inducción de granulomas en los que queda retenido el antígeno (Roitt, 2000).

Adyuvantes de Freund: el adyuvante incompleto de Freund consiste en una solución acuosa con el Ag, junto con un aceite mineral y un agente dispersante (p. ej., el manoleato). El adyuvante completo de Freund es como el incompleto, pero incorpora una suspensión de *Mycobacterium* muertos por calor. Ambas versiones liberan lentamente el Ag, con lo que se logra un estímulo persistente. Las fracciones extraídas del

Mycobacterium se componen de glucolípidos y peptidoglucolípidos que dan lugar a la actividad adyuvante, este adyuvante aumenta de manera importante la producción de anticuerpos, sin embargo cabe hacer notar que la inoculación repetida puede inducir artritis y se estudia su relación con la producción de tumores (Bach, 1994). Los resultados de diferentes investigaciones sugieren que la capacidad inmunoestimulante de algunos adyuvantes se lleva a cabo a través de los TLR (Toll like receptor). Tal es el caso del adyuvante completo de Freund, un potente adyuvante que contiene una mezcla de componentes micobacterianos capaces de interactuar con TLR 4, además de que este adyuvante que es reconocido por TLR9. (Bautista, 2005).

En algunas ocasiones las respuestas mediadas por células no consiguen erradicar un organismo infeccioso o las sustancias antigénicas no pueden ser eliminadas por ser resistentes a la degradación. En esos casos los linfocitos T se siguen acumulado y liberando citocinas, dando lugar a la formación de granulomas (Roitt, 2000). El adyuvante completo induce mejor los granulomas, que son una infiltración celular, con una masa densa y rica en macrófagos, con lo que se mejora el procesamiento y presentación del Ag (Morris, 1999). El análisis de las células T de los focos granulomatosos indica que el centro de la lesión contiene células CD4⁺, mientras que en la periferia se encuentran más CD8⁺, lo que sugiere que las primeras tienen una importancia decisiva en la inducción de la acumulación y activación de otros linfocitos y macrófagos (Roitt, 2000).

Polirribonucleótidos sintéticos y lipopolisacárido bacteriano (LPS): estimulan la proliferación inespecífica de linfocitos.

Recientemente se están ensayando los liposomas: el antígeno se encierra en liposomas o se une a la bicapa lipídica de este tipo de vesículas membranosas (Morris, 1999).

El criterio más importante, sin lugar a dudas, para la selección de un adyuvante destinado a las vacunas humanas es la bioseguridad y, en la práctica, los compuestos de aluminio son los únicos adyuvantes licenciados para uso humano. Las nuevas vacunas recombinantes y sintéticas poseen una baja inmunogenicidad en comparación con las vacunas tradicionales, consistentes en los microorganismos intactos, atenuados o inactivados por el calor; de ahí el interés por la búsqueda de diferentes inmunoadyuvantes para incrementar la efectividad de estas nuevas vacunas para uso humano. (Morris, 1999)

2.5 Factor de transferencia (FT) o extracto dializable de leucocitos (DLE)

En 1954, H. S. Lawrence de Nueva York, describió el uso de extractos solubles de leucocitos humanos para la transferencia específica de hipersensibilidad cutánea a la tuberculina (Estrada, 1999). Estos extractos solubles, contienen moléculas activas de bajo peso molecular que han demostrado ser tan eficaz como los leucocitos completos en la transferencia de la sensibilidad cutánea tardía. El factor de transferencia no es una inmunoglobulina y varios estudios han demostrado que no es en sí mismo inmunogénico y que no induce la formación de anticuerpos específicos, incluso cuando se administra en cantidades muy grandes. La capacidad de transferencia es resistente a la inactivación enzimática por la DNasa, RNasa y tripsina (Good, 1971).

Las preparaciones del DLE muestran especificidad, la cual está dada por los antígenos utilizados para inmunizar al donador. Borkowsky (1981) demostró que los Factores de

Transferencia contenidos dentro de los DLE, podían unirse específicamente al antígeno que los originaba, pero no se unían a anticuerpos dirigidos contra el antígeno en cuestión. En 1985, Kirkpatrick empleó DLE obtenido de ratones sensibilizados con ferritina, posteriormente incubó los dializados en superficies plásticas cubiertas con el antígeno (ferritina) observando que, al recuperar el sobrenadante, éste perdía su capacidad de transferencia de DTH. Esta actividad podía ser recuperada eliminando el sobrenadante anterior y adicionando urea 8 M o acetonitrilo a las placas, aun se emplea este método para la purificación de FT, aunque su rendimiento es muy bajo. Cabe señalar que el éxito en la transferencia de DTH específica de antígeno, depende en gran medida de la intensidad de las respuestas de DTH que presente el donador y de la dosis del DLE empleada para transferir al receptor (Estrada, 2007).

2.5.1 Componentes del DLE

En 1975 Kirkpatrick utilizando columnas de filtración en gel, se obtuvieron cuatro fracciones, dos de las cuales contenían ascorbato, serotonina y un elemento no identificado con actividad colinérgica. De manera general se ha dividido a los componentes de los DLE's en dos fracciones principales:

- La fracción específica o antígeno dependiente, las cuales son moléculas de naturaleza peptídica con un PM de 3500 a 6000 Daltones. Aquí se hallan los FT, los cuales son péptidos pequeños con capacidad para transferir DTH. (Gottfried, 1991)
- La fracción antígeno inespecífica o antígeno independiente, que contiene moléculas por debajo de 3500 y por arriba de 6000 Daltones, en la cual

encontramos sustancias como prostaglandinas, nicotinamida, ácido ascórbico, histamina, hipoxantina, serotonina, factores de diferenciación de linfocitos (timosina) quimioatrayentes para monocitos y factores inmovilizadores de neutrófilo. La fracción por debajo de los 3500 Da fue definida por Gottlieb como IMREG, ésta es inmunomoduladora en diversos ensayos *in vitro* y dentro de ella se identificó una molécula inmunosupresora de 1000 Da denominada LSF (lymphocytic supresor factor) (Gottlieb, 1991).

Kirkpatrick llegó a la conclusión que los factores de transferencia son moléculas pequeñas (de aproximadamente 5000 Da) hidrofílicas y altamente polares, producidas en pequeñas cantidades por células linfoides y estableció que 1 unidad de FT es el producto de la diálisis de 5×10^8 leucocitos (Kirkpatrick, 1995).

2.5.2 Mecanismo de acción del DLE

Entre las diversas hipótesis que se han planteado en cuanto al mecanismo de acción de los DLE's se puede señalar:

- Lawrence (1973) propuso que el FT podría desbloquear o deprimir poblaciones de linfocitos T, responsables de la inmunidad celular y por tanto modular la misma.
- Alvarez y Kirkpatrick (1995) propusieron que la polarización hacia la respuesta tipo TH1 se debe a la inhibición o supresión de las respuestas de tipo TH2.

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

2.5.3 Fuentes de obtención del DLE

El DLE se consigue a partir de leucocitos de sangre periférica que son lisados por choque térmico y sonicación, sometidos a diálisis con membrana de poro menor a 10 KDa. Se les llama polivalentes ya que son capaces de transferir tantas respuestas celulares como respuestas positivas hay presentes en el donador (Aldana, 2004).

2.5.4 Aplicaciones del DLE

- Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada, entre otros) (Arala, 1974).
- Enfermedades infecciosas producidas por hongos (Candidiasis (Ross, 1970), Histoplasmosis, Coccidioidomicosis (Liburd, 1972)), por virus (Citomegalovirus, (Rytel, 1975), Herpes zoster, Sarampión, varicela, hepatitis), bacterias (tuberculosis, lepra, brucelosis, etc.) o por parásitos (Maddison, 1976)
- Enfermedades autoinmunes (Ballow, 1975).
- Cáncer (Pineda, 2005)(Melanoma, cáncer de estómago, próstata, pulmón, colon, mama, nasofaríngeo)
- Hipersensibilidad (Tipo IV: DTH) (Kirkpatrick, 1978)

2.5.5 Uso del FT como promotor de proliferación linfocítica

Julio Sotelo y colaboradores (2004) desarrollaron un modelo experimental en ratas con glioma C6. Entre sus hallazgos se observó una reducción significativa del tumor cuando se administraba FT intratumoralmente, lo cual inducía apoptosis. Además, estos animales mostraron incremento en la población de linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺ y células NK, asimismo se vio incrementada la producción de IL-2, IL-6 y TNF- α , descubrimientos importantes cuando anteriormente se había observado una disminución de IL-2 en pacientes con gliomas.

JUSTIFICACIÓN

En este trabajo se dará continuación a la investigación sobre el efecto adyuvante del FTy se buscará describir los cambios en la histología que pueden sufrir órganos linfoides como bazo y nodo linfático, a través de la administración de diversas dosis de factor de transferencia, el cual en teoría induce proliferación celular (Sotelo, 2004), (sobre todo de linfocitos Th los cuales participan en la activación de linfocitos B) estudio que apoya la búsqueda de un método terapéutico que pueda usarse de manera segura en algún padecimiento; así como contribuir en la investigación de un adyuvante para el uso de vacunas que proporcione una buena respuesta y baja toxicidad al paciente.

OBJETIVOS

Objetivo general: Determinar si existe un incremento en la densidad celular en los órganos linfoides bazo y nodos linfáticos, a través de un estudio histológico y estadístico de análisis de varianza en un diseño experimental con un factor (ANOVA), para determinar si diversas dosis de factor de transferencia funcionan como un adyuvante en la respuesta inmune al promover la proliferación celular.

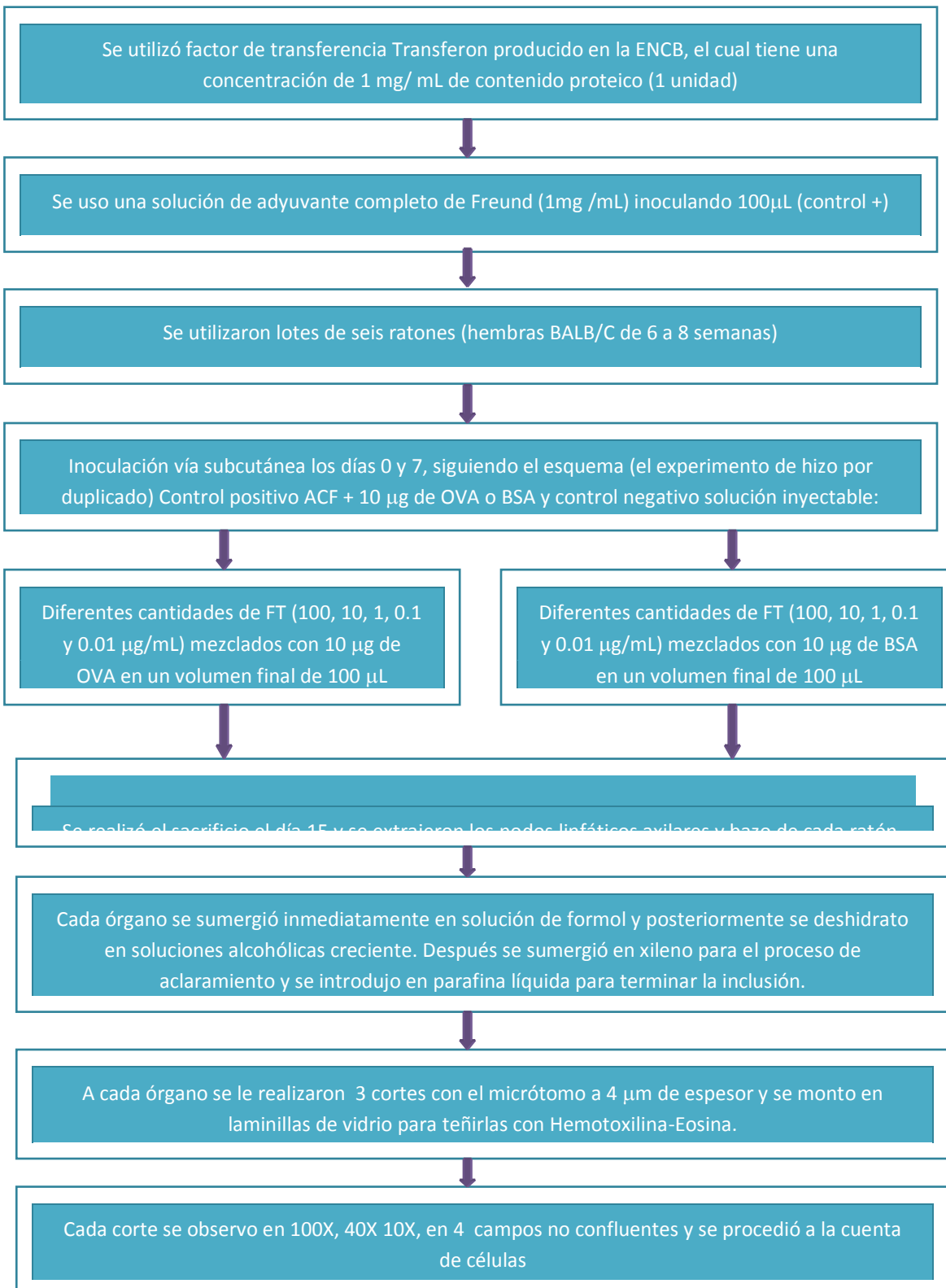
Objetivos particulares:

- Conocer la histología del bazo y nodos linfáticos de ratón a través del estudio microscópico de estos, para diferenciar las células de interés
- En bazo, determinar la densidad total celular en la pulpa blanca y en la pulpa roja
- En nodo linfático calcular la densidad celular
- Analizar los datos obtenidos por medio de un programa estadístico, para determinar si diversas dosis de factor de transferencia se relacionan o no con la proliferación celular en bazo y nodos linfáticos de ratón.

HIPOTESIS

Hipótesis: Diversas dosis de factor de transferencia administradas a ratones (hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de edad) actuará como modulador de la respuesta inmune al inducir la proliferación celular (linfocitos), observándose cambios en la histología de bazo y nodos linfáticos, comprobándose con un estudio estadístico ANOVA.

MATERIALES Y MÉTODOS



Parámetros a evaluar

En bazo:

- Número de células (principalmente Linfocitos T y B) en pulpa blanca
- Número de células (principalmente Linfocitos T y B) en pulpa blanca

En nodo linfático:

- Número de células (principalmente Linfocitos T y B)

El conteo se realiza en 4 campos a 100x no confluentes y se multiplica por el factor correspondiente para determinar cuántas células existen por mm^3 . Con este cálculo de densidad se continúa con el estudio ANOVA.

Análisis estadístico

Análisis de varianza para un diseño experimental con un factor (ANOVA) (Durán, 2008).

Hipótesis nula (Ho): No existen diferencias significativas entre las medias de la densidad celular en los diversos tratamientos con diferentes dosis de factor de transferencia, es decir, los tratamientos experimentales tienen el mismo efecto. No funciona como adyuvante.

Hipótesis alternativa (Ha): Al menos un par de medias de la densidad celular son diferentes. Funciona como adyuvante.

Para probar el juego de hipótesis se procede a llenar la tabla de resultados para ANOVA:

Fuentes de variación (FV)	Sumas de cuadrados (SC)	Grados de libertad (GL)	Cuadrados medios (CM)	Fo
Tratamientos (dosis)	$(Y_i^2 / n_i) - (Y_{..}^2 / n)$	a-1	(SCtrat)/(a-1)	(CM trat)/(CMerror)
Error	SCtotal - SCerror	n- a	(SCerror)/(n-a)	
Total				

Donde:

n = número total de observaciones

a= tratamientos o dosis a comparar

Yi = suma de observaciones por dosis

ni = número de observaciones por
tratamiento o dosis

Y...=suma de todas las observaciones

A continuación se establece el valor crítico y el área de rechazo de la H_0 , (determinar en tablas el valor crítico α con base el nivel de significancia F). Después la regla de decisión es que se deberá rechazar la hipótesis nula si $F_o > F$.

Prueba de Fischer o de la diferencia mínima significativa (LSD) (Durán, 2008).

Si en ANOVA, H_0 es rechazada se procede a determinar cual o cuales pares de medias son las que difieren significativamente, se debe aplicar una comparación múltiple de medias, como la Diferencia mínima significativa (LSD):

$$LSD = t_{n-\alpha}^{\alpha/2} \sqrt{CM \text{ error } (1/n_i + 1/n_i')}$$

Donde:

$t_{n-\alpha}^{\alpha/2}$ = Valor que se obtiene de tabla de valores críticos de t , con nivel de significancia α y con los grados de libertad del error.

CM error = Cuadrados medios del error

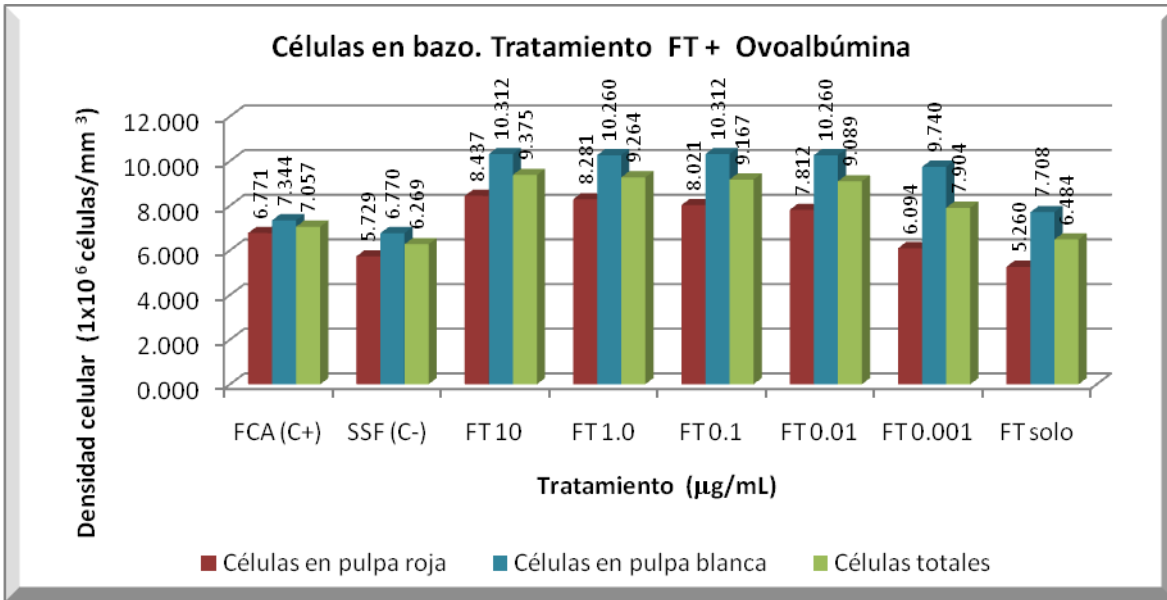
n_i = número de repeticiones u observaciones por tratamiento.

Si la diferencia entre medias resulta mayor que LSD, entonces es estadísticamente significativa.

RESULTADOS

El tratamiento de FT + Ovoalbúmina en bazo mostró el siguiente comportamiento:

Resultados de la densidad celular en BAZO



Gráfica 1. Histograma que representa la densidad celular en bazo con el tratamiento de FT+ Ovoalbúmina.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) en los tres grupos de células analizados con respecto a los controles. Dicho efecto se mantiene hasta la dosis de 0.01 µg/mL.

Estudios estadísticos para la densidad celular la pulpa roja del bazo.

	SC	GL	CM	Fo	Fa
Tratamiento	12013.5729	7	1716.2247	34.92846543	2.657
Error	786.166667	16	49.1354167		
Total	12799.7396	23			

Tabla 1. ANOVA para determinar si diferentes dosis de FT influyen en la densidad celular en pulpa roja (P <0.05).

Para ejemplificar, el despeje de $LSD = t_{n-\alpha}^{a/2} \sqrt{CM \text{ error } (1/n_i + 1/n'_i)} = 2.12 \sqrt{49.135 (1/6 + 1/6)} = 8.579$

(P<0.025), ayuda a determinar que existen diferencias estadísticamente significativas

entre las distintas dosis de FT + OVA respecto a los controles, pero dicho efecto sólo permanece hasta la dosis de 0.01 microgramos/mL.

Estudios estadísticos para la densidad celular en la pulpa blanca del bazo.

	SC	GL	CM	Fo	Fa
Tratamiento	18396.7057	7	2628.10082	17.10521728	2.657
Error	2458.29167	16	153.643229		
Total	20854.9974	23			

Tabla 2. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ OVA interfiere en la densidad celular en pulpa blanca (P <0.05).

$$LSD = t^{a/2}_{n-a} \sqrt{CM \text{ error } (1/n_i + 1/n'_i)}$$

LSD =21.4559103 (P<0.025), muestra diferencias estadísticamente significativas hasta la dosis 0.01 microgramos/mL. Es decir, si existe un aumento en la cantidad de células en pulpa blanca.

Estudios estadístico para la densidad celular total en bazo.

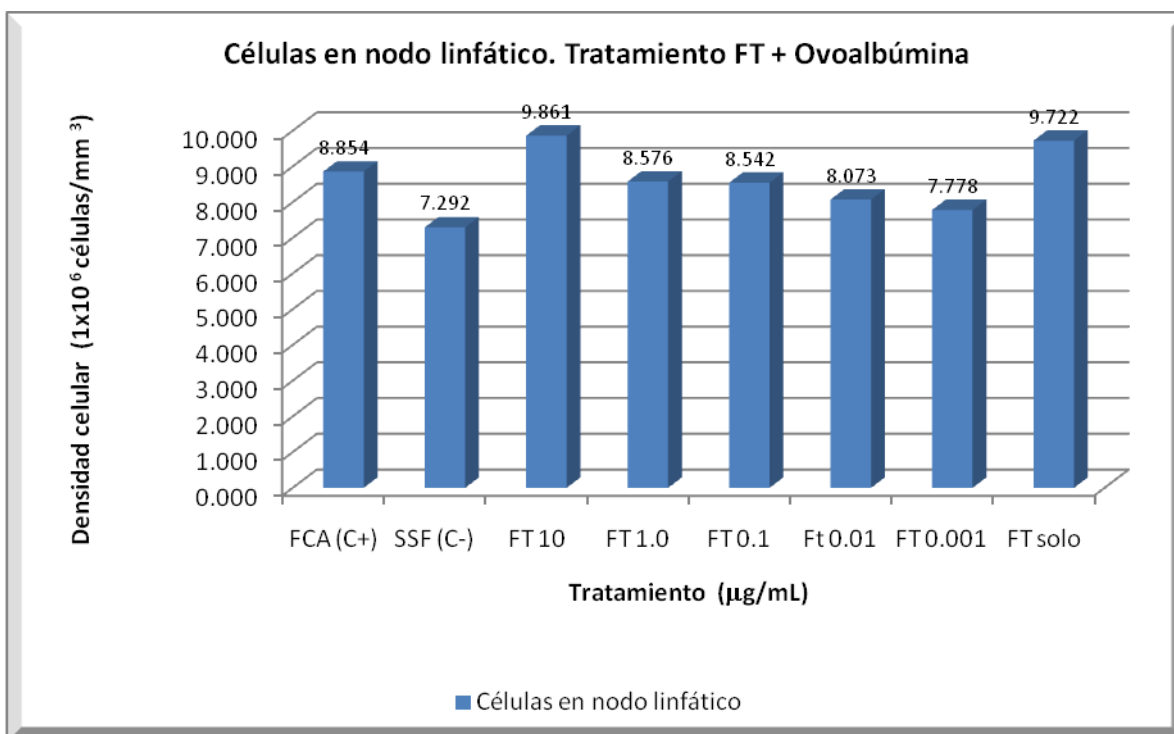
	SC	GL	CM	Fo	Fa
Tratamiento	13468.3125	7	1924.04464	260.8874092	2.657
Error	118	16	7.375		
Total	13586.3125	23			

Tabla 3. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ OVA interfiere en la densidad celular totales en bazo.

$$LSD = t^{a/2}_{n-a} \sqrt{CM \text{ error } (1/n_i + 1/n'_i)}$$

LSD=4.70079426 (P<0.025) muestra diferencias estadísticamente significativas entre lotes con FT y controles, también se indica un aumento en la densidad neta de células en bazo

Resultados de la densidad celular en NODO LINFÁTICO.



Gráfica 2. Histograma que representa la densidad celular en nodo linfático con el tratamiento de FT + Ovoalbúmina.

Estudios estadísticos la densidad celular en nodo linfático.

	SC	GL	CM	Fo	Fa
Tratamiento	6173.95833	7	881.994048	3.35624816	2.657
Error	4204.66667	16	262.791667		
Total	10378.625	23			

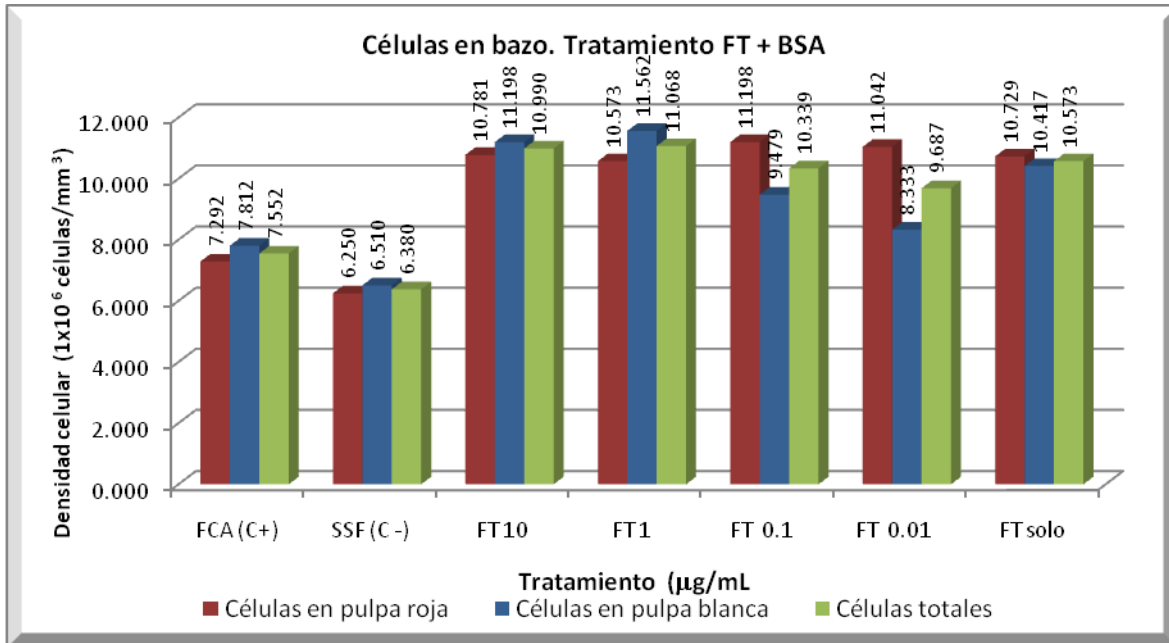
Tabla 4. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ OVA interfiere en la densidad celular en ganglio linfático. (P <0.05).

$$LSD = t^{a/2}_{n-a} \sqrt{CM \text{ error } (1/n_i + 1/n'_i)}$$

LSD=28.0605401 (P<0.025), indico que existen diferencias estadísticamente significativas entre los lotes tratados con FT + OVA respecto al control negativo, pero resultan similares a los resultados del lote tratado con FCA.

El tratamiento de FT + BSA mostró los siguientes comportamientos:

Resultados de la densidad celular en BAZO



Gráfica 3. Histograma que representa la densidad celular en bazo con el tratamiento de FT + BSA.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) en los tres grupos de células analizados con respecto a los controles. Dicho efecto se mantiene hasta la dosis de 0.01 µg/mL

Estudios estadísticos para la densidad celular la pulpa roja del bazo.

	SC	GL	CM	Fo	Fa
Tratamiento	40624.2857	6	6770.71429	129.141689	2.848
Error	734	14	52.4285714		
Total	41358.2857	20			

Tabla 5. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ BSA interfiere en la densidad celular en pulpa roja. (P <0.05).

$$LSD = t^{a/2}_{n-a} \sqrt{CM \text{ error } (1/n_i + 1/n'_i)}$$

LSD= 12.6801731 (P<0.025) indica diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de FT+ BSA y controles, el efecto de aumento en la cantidad de células en pulpa roja se mantiene hasta la dosis de 0.01 microgamos /mL de FT. También es posible determinar que existe diferencia entre el FT solo y los controles.

Estudios estadísticos para la densidad celular en la pulpa blanca del bazo.

	SC	GL	CM	Fo	Fa
Tratamiento	48737.1429	6	8122.85714	85.6325301	2.848
Error	1328	14	94.8571429		
Total	50065.1429	20			

Tabla 6. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ BSA interfiere en la densidad celular en pulpa blanca. (P <0.05).

$$LSD= t^{a/2}_{n-a} \sqrt{CM \text{ error } (1/n_i + 1/n'_i)}$$

LSD=17.0575513(P<0.025), existen diferencias estadísticamente significativas entre los lotes con FT y el control negativo, es decir si hubo proliferación celular.

Estudios estadístico para la densidad celular total en bazo.

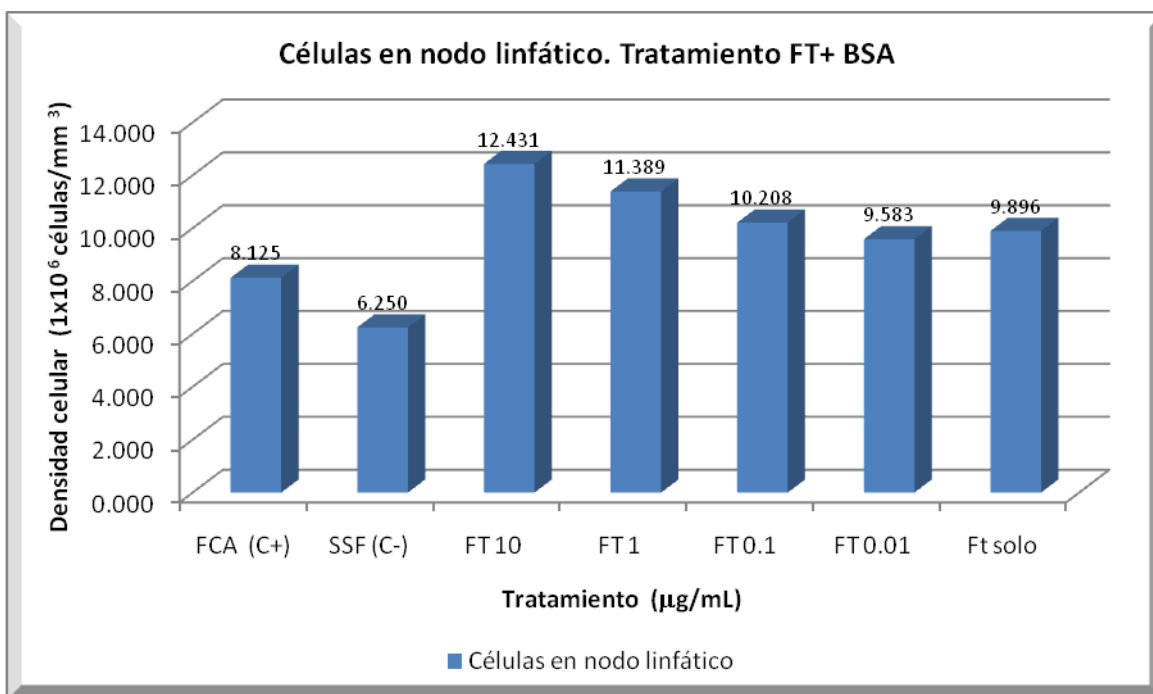
	SC	GL	CM	Fo	Fa
Tratamiento	37540.0714	6	6256.67857	138.487747	2.848
Error	632.5	14	45.1785714		
Total	38172.5714	20			

Tabla 7. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ BSA interfiere en la densidad celular neta en bazo.

$$LSD= t^{a/2}_{n-a} \sqrt{CM \text{ error } (1/n_i + 1/n'_i)}$$

LSD=11.7719366 (P<0.025), también se puede hablar de un incremento en la densidad celular.

Resultados de la densidad celular en NODO LINFÁTICO.



Gráfica 4. Histograma que representa la densidad celular en nodo linfático con el tratamiento de FT + BSA.

Estudios estadísticos la densidad celular en nodo linfático.

	SC	GL	CM	Fo	Fa
Tratamiento	27649.9048	6	4608.31746	18.5854939	2.848
Error	3471.33333	14	247.952381		
Total	31121.2381	20			

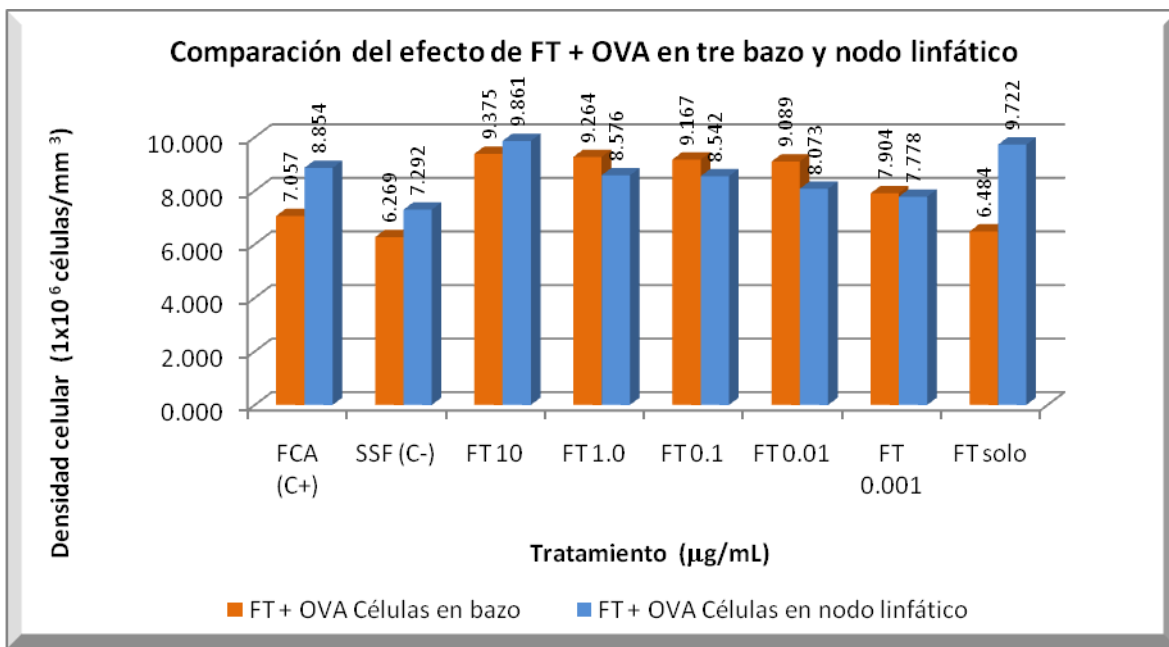
Tabla 8. ANOVA de un factor para determinar si la dosis de FT+ BSA interfiere en la densidad celular en nodo linfático (P <0.05).

$$LSD = t_{n-a}^{a/2} \sqrt{CM \text{ error } (1/n_i + 1/n'_i)}$$

LSD= 27.5781931 (P<0.025), en este caso si existe diferencia estadísticamente significativa entre los lotes tratados con FT + OVA y los controles, siendo mayor la densidad celular en el primero, lo que indica proliferación.

Posteriormente se realizó un estudio ANOVA bifactorial, para determinar si la densidad celular depende de la variable órgano, dosis o ambas.

Tratamiento con Ovalbúmina:



Gráfica 5. Histograma que representa la comparación del efecto de las dosis de FT+ OVA en los diferentes órganos estudiados

Estudio estadístico ANOVA bifactorial para el tratamiento con OVA

Tabla ANOVA	SC	GL	CM	Fo	Fa
Factor A	1155.42188	1	1155.42188	8.55340068	4.17*
Factor B	11450.0729	7	1635.7247	12.1090046	2.33**
Interacción AB	8192.19792	7	1170.31399	8.66364458	2.33***
Error	4322.66667	32	135.083333		
Total	25120.3594	47	534.475731		

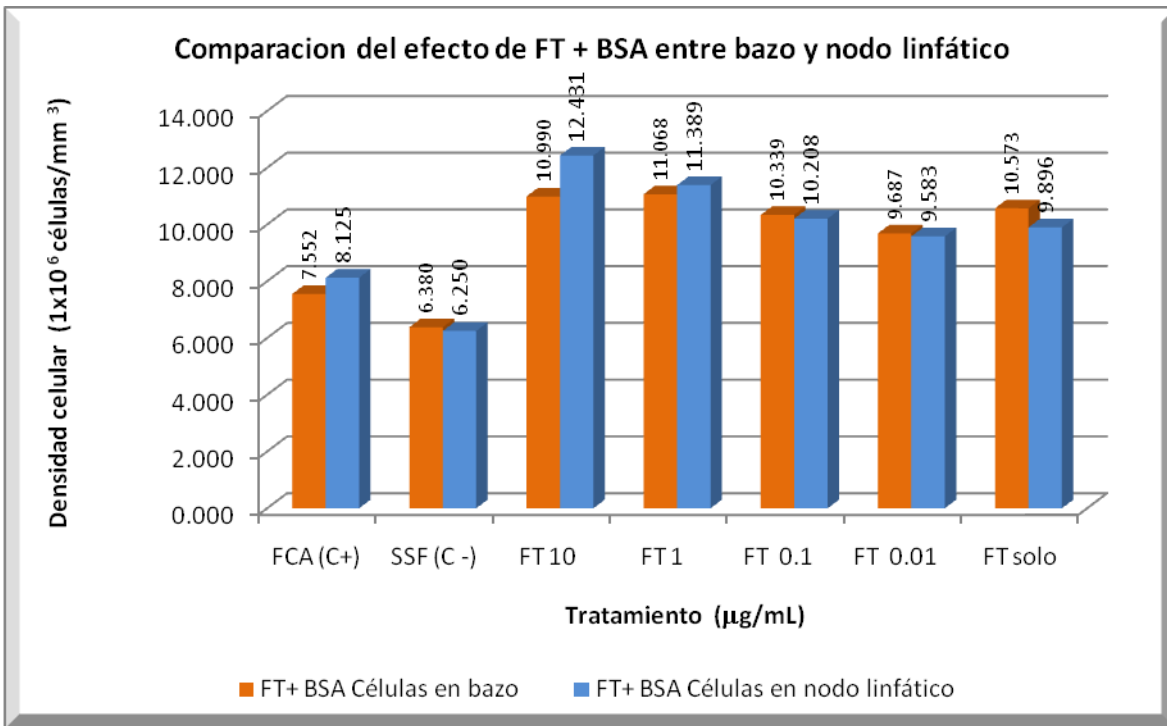
TABLA 9. ANOVA Bifactorial (órgano y dosis) para el tratamiento FT + OVA * Rechazo de Ho, la cantidad de células depende del órgano. ** Rechazo de Ho, la cantidad de células depende de la concentración de Ft. *** Rechazo de Ho, existe interacción entre órgano y concentración (Si

después del ANOVA se rechaza la Ho de la interacción, lo cual significa que existe una interacción significativa entre los factores, únicamente se aplicara la prueba para comparar las medias de las combinaciones o celdas, aún cuando también se hayan rechazado las hipótesis nulas de los factores A y B)

$$LSD = t_{n-a}^{a/2} \sqrt{CM \text{ error } (1/n_i + 1/n'_i)}$$

LSD = 19.3296933, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tratamientos.

Tratamiento con albúmina sérica bovina:



Gráfica 6. Histograma que representa la comparación del efecto de las dosis de FT+ BSA en los diferentes órganos estudiados

Estudio estadístico ANOVA bifactorial para el tratamiento con BSA

Tabla ANOVA	SC	GL	CM	Fo	Fa
Factor A	39009.5238	1	39009.5238	266.157657	4.2*
Factor B	54406.4167	6	9067.73611	61.8681585	2.45**
Interacción AB	10783.5595	6	1797.25992	12.2625052	2.45***
Error	4103.83333	28	146.565476		
Total	108303.333	41	2641.54472		

TABLA 10. ANOVA Bifactorial (órgano y dosis) para el tratamiento FT + BSA. * Rechazo de Ho, la cantidad de células depende del órgano. ** Rechazo de Ho, la cantidad de células depende de la concentración de Ft + BSA. *** Rechazo de Ho, existe interacción entre órgano y concentración Si después del ANOVA se rechaza la Ho de la interacción, lo cual significa que existe una interacción significativa entre los factores, únicamente se aplicara la prueba para comparar las medias de las combinaciones o celdas, aún cuando también se hayan rechazado las hipótesis nulas de los primeros dos factores.

$$LSD = t_{n-a}^{a/2} \sqrt{CM \text{ error } (1/n_i + 1/n'_i)}$$

LSD= 20.2481327, no mostró diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos.

DISCUSION

La evaluación del factor de transferencia para determinar si actúa como adyuvante, se realizó en dos tipos de órgano que son fundamentales en el sistema inmune. Las características histológicas del bazo pueden ayudarnos a entender los procesos de inmunidad y en general de la salud de un individuo (Corbin, 2008). Mientras que el nodo linfático es el sitio que juega un papel primordial en el sistema inmune al filtrar la linfa y estar repleto de linfocitos; por otro lado, la exploración de 4 campos a 40x y 100x, permite obtener resultados estadísticamente reproducibles. (Corbin, 2008).

Como sabemos los adyuvantes son sustancias que incrementan, estimulan, activan o potencian la respuesta inmune, su modo de acción puede ser inespecífico, lo que genera un incremento en la respuesta inmune a una gran variedad de antígenos, o específica a ciertos antígenos (Bach, 1994). En este experimento se uso como control positivo en adyuvante completo de Freund (FCA).

La acción del FCA que está ligada a la presencia de micobacterias, la cual se agrega a los efectos del Adyuvante Incompleto de Freund como son: retardo de la destrucción del antígeno e incremento de su dispersión; el FCA provoca una proliferación linfocitaria que demuestra la hiperplasia de los órganos linfoides. Además, la canalización de los linfocitos regionales revelan que el granuloma es el asiento de un intenso tránsito de linfocitos. Los efectos característicos del FCA sobre la inmunidad celular y la producción de anticuerpos contra antígenos timodependientes, llevan a pensar que el FCA estimula más específicamente la proliferación de linfocitos T. Las investigaciones recientes indicaron

que el FCA también podría estimular el desarrollo de ciertos tumores. Por último se ha comunicado que el FCA estimula los macrófagos que los fagocitan, así como propiciar la síntesis de interferón por los macrófagos (Bach, 1994).

En este experimento se utilizaron dos moléculas como antígenos: BSA (albúmina sérica bovina) y OVA (ovoalbúmina), ambas solubles, estables e inmunogénicas (Nieuwenhuis, 1976, Krieger, 1983).

El estudio ANOVA arrojó como resultado que existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Al hacer un análisis de LSD se pudo determinar entre que pares de tratamientos se encontraba dicha diferencia. Para el caso del estudio del Factor de Transferencia inyectando con OVA, se pudo concluir que en el bazo si existe un efecto de proliferación celular. Al analizar el número de células totales el FT produjo un incremento en el rango de $7.904-9.375 \times 10^6 / \text{mm}^3$, que es directamente proporcional a la dosis de FT, valores por encima del control positivo que provocó un aumento de $7.057 \times 10^6 / \text{mm}^3$. Además se observó que el efecto persiste significativamente en las dosis 10, 1.0, 0.01 y 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de FT, perdiendo relevancia en la dosis 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Por otro lado el FT administrado sin OVA no obtuvo un incremento celular significativo, ya que su cantidad $6.484 \times 10^6 / \text{mm}^3$ no tiene diferencia significativa con el control negativo en el estudio LSD.

Durante la cuantificación de células al microscopio fue posible diferenciar por morfología y el tipo de tinción dos tipos de tejido en el bazo: pulpa blanca y pulpa roja. De esta manera se hizo también un estudio estadístico que indicó patrones similares a los de células

totales, con la notoriedad de que se encontró un aumento en la cantidad de células en la pulpa blanca.

Por su parte el estudio de Factor de Transferencia y BSA en bazo indica también un aumento en la población celular directamente proporcional a la dosis y el efecto se mantiene hasta la dosis de 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de FT, como ocurrió en el tratamiento anterior. Sin embargo para este caso si existe un aumento en la densidad celular cuando se administro FT solo. Asimismo se observo un aumento en la población celular en la pulpa blanca, respecto a pulpa roja.

Hasta aquí se puede decir que la cantidad de células en bazo depende de la dosis de FT, siendo directamente proporcional y manteniéndose hasta 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El FT actúa sinérgicamente con ambos inmunógenos para inducir proliferación celular y al parecer dicho efecto se presenta cuando se administra sólo FT. Comparando el efecto de los diferentes inmunógenos, podemos decir que la proliferación celular es independiente al inmunógeno aplicado, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas con el estudio LSD, lo que es algo positivo para usarlo como adyuvante administrando diversos antígenos, esperando que se mantenga este comportamiento.

En el caso de nodo linfático, el tratamiento de Factor de transferencia más OVA produjo un aumento en la cantidad de células totales siendo significativamente diferente al control negativo hasta la dosis 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$, como en los casos anteriores, sin embargo sólo obtuvo mayor cantidad de células que el control positivo a dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de FT. Además en este caso el FT sin OVA si tuvo efecto significativo en la proliferación celular. Es

importante hacer notar que el FT administrado no es específico para OVA, así que la respuesta del FT es independiente a la respuesta del Ag si se analizan por separado.

El tratamiento de Factor de transferencia más BSA indujo un aumento en la cantidad de células totales siendo significativamente diferente al control negativo hasta la dosis 0.01 $\mu\text{g/ml}$, como en los casos anteriores; siendo dicha cantidad mayor que en el control positivo. Asimismo se puede decir que el FT solo, posee un efecto significativo pero no tanto como cuando se administra con el antígeno, en este caso BSA.

Se puede agregar que el FT tiene efecto positivo como potenciador del aumento celular administrado con un Ag, en ambos órganos y al parecer mejores que el propio ACF.

Los datos señalados corresponden con los hallazgos de Huard y colaboradores en su trabajo para analizar los efectos del FT en el modelo murino, donde indican que el FT induce respuesta del bazo a la activación policlonal. A dosis desde 5 mg de concentración de ribosa de FT hallaron aumento de nódulos linfoides con centros germinativos no visibles, a 10 mg se comienzan a ver zonas marginales y a 25 mg centros germinales prominentes. Concluyendo que las observaciones en morfología y cambios funcionales en el tejido esplénico sugieren que el FT puede manifestar capacidad inmunoreguladora además de la habilidad para transferir DTH (Huard, 1978).

Huard indica que el FT puede afectar la respuesta de células B en humanos, se encontró que las respuestas de mitógenos de linfocitos B pueden ser alteradas en cultivos de esplenocitos tratados con FT. Estos hallazgos pudieran reflejar la capacidad adyuvante

atribuida al DLL o FT (Huard, 1980). Mientras que Togawa también indica que el FT induce la proliferación de células mononucleares (Togawa, 1979).

Ruiz Cazares menciona en su tesis que el aumento en la proliferación de esplenocitos y lo reportado en cuanto a la inducción de respuesta celular de tipo TH1, puede sugerir que el FT coadyuva en la activación celular y muy posiblemente se oriente por la diferenciación hacia TH1 y producción de citocinas proinflamatorias. La baja o casi nula producción de Ig, la constante cantidad de células CD19 y el aumento de CD4⁺ puede predecir el papel del FT en el aumento de respuesta celular (Ruiz, 2008).

Julio Sotelo y colaboradores desarrollaron un modelo en rata con glioma C6 y encontraron una reducción significativa del tumor cuando se administraba sólo FT intratumoralmente, quizás induciendo apoptosis. Pero además se encontró que los animales tratados con FT mostraban un incremento en la cantidad de linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺ y células NK, no encontrando diferencia entre las diferentes vías de administración (Sotelo, 2004). Asimismo ocurrió un incremento en la producción de IL-2, IL-6 y TNF- α , un descubrimiento relevante considerando que se ha reportado un decremento de IL-2 en pacientes con gliomas.

Este dato puede ser útil para tratar de explicar el aumento de celularidad en bazo y nodo linfático, si tomamos en cuenta que la mayor cantidad de células en estos órganos corresponden a linfocitos, como sabemos la IL-2 induce la proliferación y diferenciación de los linfocitos T CD4⁺, de los linfocitos CD8⁺, los linfocitos B y las células NK (Ross, 2005).

La interleucina-2 (IL-2) es una glicoproteína de 15,5 kD producida por los linfocitos T cuando son activados por mitógenos o antígenos y se caracteriza por determinar, fundamentalmente, la expansión clonal de estas células. Este factor de crecimiento inicia la progresión del ciclo celular desde G₀ hasta S en las células que poseen receptores específicos de alta afinidad (IL-2R): linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales (NK), timocitos y monocitos; pero aunque la IL-2 interactúa con su receptor, solamente los linfocitos T son las que reciben la señal que activa a los genes que codifican a esta citocina para inducir su síntesis (Kaplan, 1988).

Cuando los linfocitos T son estimulados por antígenos presentados al TCR por las CPA, ellos responden con la estimulación autocrina y con la liberación de otras citocinas además de la IL-2, como son IL-4, IL-5 y IL-6, las cuales actúan a su vez sobre otros linfocitos T, de modo que la expansión clonal de éstas depende de la IL-2 y sus receptores. Cuando la síntesis de este factor es inducida por lectinas y ésteres de forbol, aumenta el calcio ionizado intracelular y se activa la proteincinasa C, con lo que se inicia el proceso de producción de esta linfocina ⁽³⁸⁾ Para determinar la IL-2 se han utilizado métodos inmunoenzimáticos y el bioensayo con diferentes células indicadoras: CTLL-2, HT-2, MT-1, FDC-2, blastos-T, que proliferan en presencia de este factor y se mantienen en reposo o perecen cuando está ausente (June, 1989).

Como es posible observar en las graficas, existe un ligero incremento en la cantidad de células en pulpa blanca, por lo que podemos proponer una activación celular, es decir los linfocitos presentes en pulpa roja están recibiendo un estímulo. Se puede pensar que la respuesta se dirige hacia la producción de células plasmáticas y por ende a la de

anticuerpos, sin embargo Cazares indica que no existe dicho incremento en Ig, y además propone que la respuesta del FT más bien se inclina por TH1. Se propone realizar estudios como citometria de flujo para determinar las poblaciones de linfocitos que se activan e indicar hacia qué tipo de respuesta se dirige.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos indican que el FT pudiera inducir proliferación celular, en bazo y nodo linfático.
- El efecto de proliferación se mantendría desde la dosis 10 μg /ml hasta 0.01 μg /ml del FT.
- Al parecer los lotes tratados con FT provocaron una mayor densidad celular que los tratados con FCA.
- Se recomienda realizar citometria de flujo para determinar las subpoblaciones de linfocitos incrementados y señalar concretamente hacia qué tipo de respuesta se dirige.
- Se puede sugerir que el FT actúa como adyuvante en la proliferación celular en bazo y nodo linfático.

REFERENCIAS

- Aldana Velazco L., Cosme Diaz K., (2004). *Ensayo de primera ola del factor de transferencia*. Revista CENIC Ciencias Biologicas, Vol. 35, No. 3
- Arala Chaves Mario, (1974). *Transfer factor therapy in a case of complex immunodeficiency*, Cellular Immunology, 10 371-379.
- Bach Jean (1994), *Inmunología*, Editorial Limusa, México.
- Ballow Mark, (1975). *Report of a patient with T-Cell Deficiency and Normal B-Cell function: a new immunodeficiency disease with response to transfer factor*. Cellular Immunology 19, 219-229.
- Bautista Carlos, (2005), *Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria*, Veterinaria, México, 2005.
- Charles H. Kirkpatrick (1975). *Properties and activities of transfer factor* Journal of Allergy and Clinical Immunology, Volume 55, Issue 6, June 1975, Pages 411-421.
- Charles H. Kirkpatrick, (1978). *Transfer of delayed cutaneous hypersensitivity with transfer factor* Cellular Immunology, Volume 41, Issue 1, November 1978, Pages 62-71.
- Corbin E., Vicente J. (2008). *Spleen mass as a measure of immune strength in mammals*, Mammal Rev, , Volume 38, No. 1, 108-115, Texas, USA.
- Durán Ángel, Vargas Agustín, (2008). *Bioestadística*, UNAM, FES-Iztacala, Estado de México.
- E. M. Liburd, H. F. Pabst, W. D. Armstrong, (1972). *Transfer factor in rat coccidiosis* Cellular Immunology, Volume 5, Issue 3, November 1972, Pages 487-489.
- Estrada Parra Sergio (2007), *Indications, usage, and dosage of the transfer factor*. Revista alergia México; 54 (4) 134-139.
- Estrada Parra Sergio, R. Cabezas (2004). *El sistema inmune y el uso del factor de transferencia*. Revista científica Ciencia UANL, vol. 2 No. 3, julio- septiembre. p 237-243.
- *Fine Geneser*, (2000). *Histología sobre bases moleculares, 3° ed.*, Editorial Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- Gartner Leslie, (2001). *Texto y Atlas de Histología*, 2ª edición, Ed. Mc Graw Hill Interamericana, México D. F.

- Good Robert, (1971). *Transfer factor*, Department of Pathology, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota.
- Gottlieb A., (1991). *Clinical and immunologic observations in patients with AIDS related complex treated with IMREG-1*, Journal Immunopharmacology, 13: 29-32.
- *Guía para el análisis de datos*. Hispanoportuguesa SPSS, Madrid 2002.
- June CH, Ledbetter JA, Lindsten T, Thompson B. (1989). *Evidence for the involvement of three distinct signals in the induction of IL-2 gene expression in human T lymphocytes*. J Immunol ; 143:153-61.
- Junqueira y Carneiro, (2004). *Histología Básica- texto y atlas*, 5ª edición , Ed. Masson . España.
- Kaplan DR, Bergmann CA, Gould D, Landmeiner B., (1988). *Membrane associated interleukin 2 epitopes on the surface of human T Lymphocytes*. J Immunol ;140:819-26.
- Kirkpatrick, Hamad and Morton LC, (1995). *Murine transfer factors: dose response relationships and routes of administration*, Cellular Immunology, 164: 2003-2006.
- Kitamura K, Matsuda KI de M, Tokunaga T, Honda MA., (1989). *Fluorescence sandwich ELISA for detecting soluble and cell associated human interleukins-2*. J Immunol Meth 1989; 121:281-8.
- Krieger Nancy, (1983). *Immunoregulation of the anti-bovine serum albumin response by polyclonal and monoclonal antibodies*, Cellular Immunology, 80 279-287.
- Kindt Thomas, (2007). *Kuby Immunology*, Ed. Freeman, 6a. Edición, New York, Estados Unidos.
- Lawrence H. S. and Borkowsky William, (1981). *Transfer factor: Recent developments in the pursuit of an idea*. Cellular Immunology, 62 301-308 .
- Michael W. Rytel, Thomas M. Aaberg, Thomas H. Dee, Lyle H. Heim, (1975). *Therapy of cytomegalovirus retinitis with transfer factor* Cellular Immunology, Volume 19, Issue 1, September 1975, Pages 8-21.
- Morris Quevedo Humberto Joaquín, Martínez Clara, (1999). *Adyuvantes inmunológicos*, Rev Cubana Invest Bioméd Vol.18 No.2 Ciudad de la Habana, Cuba.
- Nieuwenhuis and W. L. Ford, (1976). *Comparative migration of B and T- Lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes*. Cellular Immunology, 23, 254-267.
- Pineda B. Estrada Parra S. (2005). *Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma*. J. Exp Clin Cancer Res. 2005: 24 (4) 207-215.
- Regueiro Gonzalez, (2003). *Inmunología, biología y patología del sistema inmune*, 3ª Ed., Editorial Panamericana, España.
- Roitt Ivan, (2000). *Inmunología*, 5ª Ed., Harcourt, España.
- Ross E. Rocklin, Richard A. Chilgren, Richard Hong, John R. David, (1970). *Transfer of cellular hypersensitivity in chronic mucocutaneous candidiasis monitored in vivo and in vitro*, Cellular Immunology, Volume 1, Issue 3, September 1970.

- Ross M. (2005). *Histología, Texto y atlas a color con biología celular y molecular*. 4° Edición. Editorial Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- Ruiz Cazares Omar Asaf, (2008). *Evaluación de la capacidad adyuvante del factor de transferencia*. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias, FES- Cuautitlan, UNAM.
- Shirley E. Maddison, Martin D. Hicklin, Irving G. Kagan, (1976). *Schistosoma mansoni: Reduction in clinical manifestations and in worm burdens conferred by serum and transfer factor from immune or normal rhesus monkeys* Experimental Parasitology, Volume 39, Issue 1, February 1976, Pages 29-39.
- Sotelo, Julio, (2004). *Efecto específico del factor de transferencia de origen porcino como agente inmunoterapéutico en glioma C6 de rata*. Resúmenes de investigación. Instituto nacional de neurología y neurocirugía. Departamento de inmunología. ENCB. IPN.
- Stevens Alan, (2006). *Histología Humana*, 3a Ed., Elsevier, España.
- Thomas K. Huard, Tawfik Sabet, Peter Baram (1978). *In vivo effects of dialyzable leukocyte lysates (DLL): Changes in the responses of murine spleen cells to T- and B-cell mitogens, spleen weight, and morphology of splenic tissue* Clinical Immunology and Immunopathology, Volume 11, Issue 2, October 1978, Pages 229-244.
- Thomas K. Huard, Tawfik Sabet, Peter Baram (1980). *In vivo effects of dialyzable leukocyte lysates (DLL): II. Augmentation of the spleen cell proliferative response to antigen in KLH- Sensitive mice*. Cellular Immunology, 56 120-131 (1980).
- Togawa Atsushi, Joost J. Oppenheim, (1979). *Ability of dialysates containing transfer factor to induce lymphocyte activating factor by human mononuclear cells* Cellular Immunology, Volume 45, Issue 1, June 1979, Pages 133-141
- Vacek Antonin, (2007). *The role of G-CSF and IL-6 in the granulopoiesis-stimulating activity of murine blood serum induced by perorally administered ultrafiltered pig leukocyte extract*, *IMUNOR*. International Immunopharmacology, 7 656-661 (2007).
- *Workshop on basic properties and clinical applications of transfer factor held at the Arizona Medical Center, Tucson, Arizona, February, 1973*. Cellular Immunology 10 165-168 (1974).
- Young Barbara, (2000). *Histología Funcional Texto y Atlas en color*, 4ª edición, Editorial Harcourt, Madrid, España.