

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA Y CLÍNICA DEL EXTRACTO LEUCOCITARIO  
DIALIZABLE PORCINO, EN CERDOS DESTETADOS, EN UN SISTEMA DE  
CRIANZA INTENSIVO**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

**PABLO HERNÁNDEZ PERALTA**

ASESORES

Dra. Laura Cobos Marín

Dr. José Iván Sánchez Betancourt

Dra. Sonia Mayra Pérez Tapia



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:

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el “Proyecto Factor de Transferencia”, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

Agradezco a mis asesores por sus consejos, paciencia y guía.

Agradezco especialmente al Dr. Jaime Alonso Navarro por su valiosa aportación al diseño experimental y análisis estadístico.

Agradezco al MVZ Roberto Martínez, MVZ Mónica Sánchez, M en C. Luis Enrique García, M en C. Ana Rodríguez por su apoyo en la realización de este trabajo.

Agradezco a mis sinodales por su tiempo y observaciones.

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Virología.

## Dedicatorias

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la tierra fértil para el crecimiento y la formación del pueblo de México, que jamás se olvide la responsabilidad de corresponderlo.

A Margarita Puga Baldazo por su apoyo, amor y resistencia eterna.

A mis padres por el ejemplo de honestidad, dignidad, respeto, justicia y humanismo, elementos necesarios para un ser humano.

A mis hermanos por ser el motor y el impulso de mi vida, a quienes agradezco su existencia y para quienes estaré siempre.

A mi familia innata y adquirida, mis tíos y tías, mis primos y primas, mis sobrinos y sobrinas, mi ahijado, a Jon, Danilo, Rod y Pedro gracias por su cariño.

A mi Asesora y maestra la doctora Laura Cobos Marín porque con su sencillez, simpatía, comprensión, calidez y conocimientos ha guiado mi formación.

A los doctores de quienes he aprendido mucho: Dra. Rosa Elena, Dra. Liliana y el Dr. Iturbe

A mis compañeros, bonobos y amigos del departamento de Microbiología e Inmunología: Alberto, Pancho, Manuel, Miguel, Cindy, Luz, Isa, Ninna, Mony, Montsa, Tere, Armando, Irlanda, Barushz, Ale y el señor Mario, por su enseñanza, paciencia y contribución en mi aprendizaje.

A mis amigos hermanos con quienes comparto esta gloriosa facultad, a quienes quiero mucho y con quienes he vivido momentos excelentes estos años: Jon, Pato, Gony, Fabricia, Maricarmen, Diana, Chiva, Princess, Shanty, Mamaury, Ximena y el señor Díaz. (si hay alguien que se me escapó no se ofendan porfa)

Especial a María Salgado Kim, por acompañarme y ayudarme en muchos momentos determinantes, tenerme paciencia, comprensión y hacer de mi una persona muy feliz.

## CONTENIDO

Resumen .....	1
Introducción .....	2
Panorama actual de la porcicultura México .....	2
Sistema de producción intensivo porcino .....	4
Problemática de destete .....	5
Destete intensivo .....	5
Extracto leucocitario dializable (DLE) .....	6
Interferón gamma (IFN $\gamma$ ) .....	8
Factor de necrosis tumoral alpha (TNF $\alpha$ ) .....	9
Justificación .....	10
Hipótesis .....	10
Objetivo general .....	11
Objetivos particulares .....	11
Material y métodos .....	12
*Diseño experimental .....	12
*Obtención del DLEp .....	12
a) Obtención del bazo .....	12

b) Dializado .....	13
c) Cuantificación de proteínas .....	14
d) Control de calidad .....	14
e) Liofilización .....	14
*Ubicación espacio tiempo .....	15
Parámetros productivos de la granja .....	16
Calendario de vacunación .....	16
*Grupos de estudio .....	16
Criterio de inclusión .....	17
Criterio de exclusión .....	17
Tratamiento y toma de muestras .....	18
Condiciones ambientales .....	19
Métodos de evaluación .....	20
I. Evaluación de parámetros inmunológicos .....	20
II. Evaluación del estado clínico .....	20
III. Evaluación del peso .....	21

Resultados .....	21
Análisis de los datos .....	21
I.    Evaluación de parámetros inmunológicos .....	22
Plaquetas .....	23
Leucocitos totales .....	24
Neutrófilos .....	25
Linfocitos .....	26
Monocitos .....	27
Eosinófilos .....	28
Interferón gamma .....	29
Factor de necrosis tumoral alpha .....	30
II.   Evaluación del estado clínico .....	31
Signos respiratorios .....	31
Diarrea .....	32
Fiebre .....	33
III.  Evaluación del peso .....	35

Discusión .....	36
Conclusiones .....	41
Anexos .....	42
Referencias .....	46

## Abreviaturas

<b>BCA</b>	Ácido bicinconinico
<b>CEIEPP</b>	Centro de enseñanza investigación y extensión en producción porcina
<b>DLE</b>	Extracto leucocitario dializable
<b>DLEp</b>	Extracto leucocitario dializable porcino
<b>ELISA</b>	Inmunoensayo Enzimático
<b>FMVZ</b>	Facultad de medicina veterinaria y zootecnia
<b>FT</b>	Factor de transferencia
<b>G-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos humanos
<b>id</b>	Intradermorreacción
<b>ID</b>	Vía Intradérmica
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IL</b>	Interleucina
<b>kDa</b>	Kilodaltones

<b>LAL</b>	Lisado de amebocitos de <i>Limulus</i>
<b>MANOVA</b>	Análisis de varianza multivariado
<b>mL</b>	Mililitros
<b>NK</b>	Células asesinas naturales
<b>NKT</b>	Células asesinas naturales T
<b>RIC</b>	Respuesta inmune celular
<b>SSI</b>	Solución salina Isotónica de cloruro de sodio al 0.9%
<b>TCD4<sup>+</sup></b>	Linfocitos T cooperadores
<b>TCD8<sup>+</sup></b>	Linfocitos T citotóxicos
<b>Th1</b>	Linfocitos T cooperadores perfil 1
<b>Th2</b>	Linfocitos T cooperadores perfil 2
<b>TLR</b>	Receptores tipo toll
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alpha
<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma de México
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramos

## RESUMEN

**Hernández Peralta Pablo. Evaluación inmunológica y clínica de extracto leucocitario dializable porcino, en cerdos destetados, en un sistema de crianza intensivo. (Bajo la dirección de: Dra. Laura Cobos Marín, Dr. José Iván Sánchez Betancourt y Dra. Sonia Mayra Pérez Tapia).**

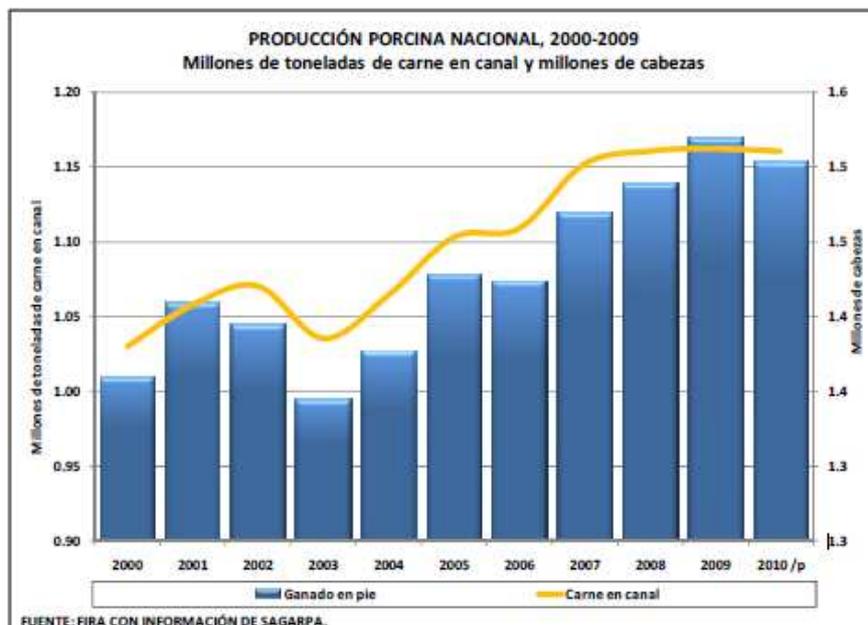
EL objetivo del trabajo fue demostrar el efecto inmunomodulador del extracto leucocitario dializable porcino (DLEp), en cerdos clínicamente sanos durante las primeras cuatro semanas del destete, divididos en tres grupos: dosis alta, dosis baja y grupo testigo (A: 72.48 - 81.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , B: 14.25 - 19.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , y C: Solución salina isotónica respectivamente), a través de tres mediciones (día 21, 34 y 50 de edad) del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e Interferón gama (IFN $\gamma$ ) con la técnica de ELISA, de la cuenta plaquetaria y de la cuenta leucocitaria (leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos) . Se determinó la incidencia de diarreas y cuadros respiratorios por medio de la observación clínica diaria, así como la medición semanal del peso de cada animal sujeto al estudio. En los resultados se observó que la dosis alta (72.48 - 81.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), produjo un aumento significativo en la concentración de IFN $\gamma$  sérico en el tercer muestreo ( $d=2.288$ ,  $\alpha=0.05$ ,  $P=0.003$ ), EL TNF $\alpha$ , las cuentas leucocitarias, la incidencia de cuadros respiratorios y diarreicos y la ganancia de peso, no mostraron diferencia significativa entre los grupos tratados y el testigo ( $P>0.05$ ).

## Introducción

### Panorama actual de la porcicultura en México

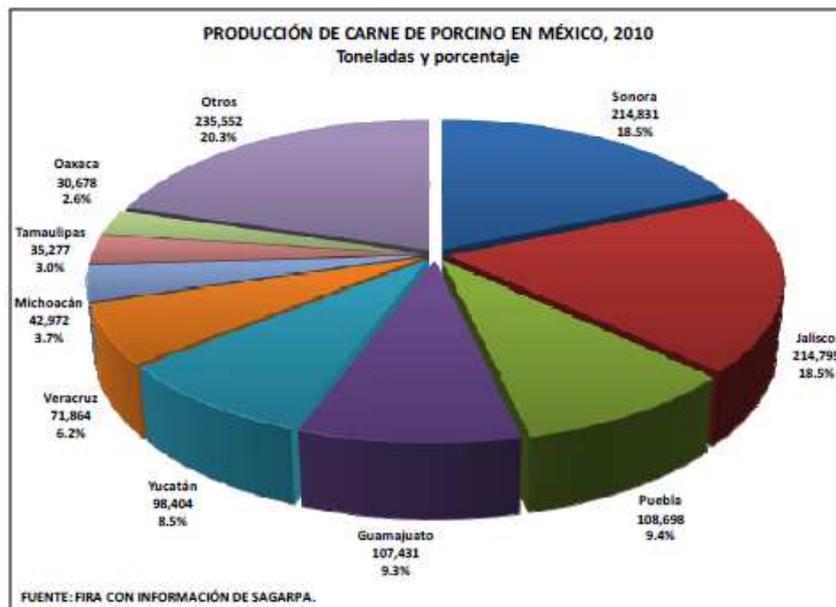
La porcicultura es una actividad pecuaria de gran importancia en México, que tiene un valor superior a los 30,000 millones de pesos, genera 350,000 empleos directos y 1.7 millones de empleos indirectos, el consumo per cápita es de 14 kilos<sup>1</sup>. México participa con el 1.9% del total de la población porcina del mundo y eso le permitió ocupar en 2003 el noveno lugar a nivel mundial.<sup>2</sup>

Durante 2009, México produjo 1.16 millones de toneladas de carne de porcino, volumen 1.4% superior a lo producido en 2008. Aun con esta reducción, de cumplirse el pronóstico la producción nacional de carne crecería a una tasa 1.2% promedio anual entre 2000 y 2010, mostrando su mayor crecimiento entre 2003 y 2009, período en el que se incrementó en promedio 2.0% la producción de carne de puerco en canal.



**Figura 1.** Producción nacional de carne de cerdo en canal, México 2000-2010

Sonora y Jalisco son las entidades de mayor producción de carne porcina, superando las 214 mil toneladas cada una. En conjunto, ambas entidades aportan el 37% de la producción nacional, seguidas por el estado de Puebla que aporta 9.4%, Guanajuato con 9.3%, Yucatán con el 8.5%, Veracruz con 6.2%, Michoacán con 3.7%, Tamaulipas con 3%, Oaxaca con 2.6% y el resto de las entidades federativas, que aportan 20.3% en conjunto.



**Figura 2.** Producción de carne de porcino en México 2010, toneladas y porcentaje

La desaparición de barreras arancelarias por el tratado de libre comercio de América del Norte ha obligado a los porcicultores mexicanos a ser más eficientes en sus procesos productivos, pues se compite a nivel nacional con productos o subproductos porcinos de otras regiones, lo que nos obliga a implementar mecanismos que aumenten la productividad de las granjas.

## Sistema de producción intensivo porcino

Los sistemas intensivos en la porcicultura han permitido optimizar la producción a través esquemas de flujo de animales (flujogramas), en espacios diseñados con base en las necesidades y el desarrollo de los cerdos en las diferentes etapas de su vida productiva. Dichos esquemas pueden ser variados según el periodo de tiempo que utilicen, las áreas que en su mayoría poseen las producciones intensivas son:

- a) Servicios: sitio en la que las cerdas permanecen cuando se destetan, así como donde se integran las hembras de remplazo, en ambos casos es aquí donde se les dará monta natural o inseminación artificial (1 a 5 semanas).
- b) Gestación: las cerdas permanecen en esta área durante el periodo de gestación y hasta una semana antes del parto (10 a 16).
- c) Maternidad: sitio donde la cerda pare y amamanta a los lechones (2-5 semanas).
- d) Reemplazos: en este espacio permanecen las cerdas de remplazo para que se adapten y conforme al peso se les dará el primer servicio (4 a 6 semanas).
- e) Crianza o destete: espacio al que llegan los lechones al ser destetados, la duración de esta etapa varía según la edad del destete, el tipo de instalaciones y la alimentación (3 a 7 semanas).
- f) Engorda: en este espacio se alimenta a los animales hasta que alcancen el peso de sacrificio, en ocasiones esta área se divide en crecimiento, engorda y finalización teniendo como variantes principalmente las características del alimento (15 a 18 semanas).

## Problemática en el destete

En la etapa de la lactancia los lechones son protegidos pasivamente de los agentes infecciosos externos por medio de calostro y la leche de la cerda, a partir de la cuarta semana son separados de la madre y de la séptima semana en adelante comienza el periodo de pre-engorda. El destete representa un cambio agudo en la fisiología del animal pues, aunado al retiro de los elementos protectores de la leche materna, hay una modificación drástica de la alimentación, un estrés causado por las nuevas condiciones ambientales a las que es sometido el animal entre las que destaca la jerarquización. En esta etapa y ante la presencia de agentes infecciosos, existe un aumento notable en la morbilidad y mortalidad de los lechones, así como una mayor incidencia de problemas neumónicos y diarréicos.

Si bien lo anterior depende en gran medida de las condiciones higiénicas y el manejo de la granja, se sabe que en esta etapa los cerdos no han alcanzado su madurez inmunológica y sus mecanismos adaptativos de defensa no funcionan eficazmente.<sup>3</sup> Esto puede explicarse por estudios en los que se ha demostrado que después del destete, los animales presentan un decremento de la respuesta *in vitro* de los linfocitos circulantes hacia los mitógenos, menor concentración de anticuerpos contra antígenos inoculados, una reducción en la respuesta inflamatoria intradérmica a mitógenos<sup>45</sup> y una disminución en las cuentas linfocitarias.<sup>6</sup>

## Destete intensivo

Ventajas del destete a los 21 días de edad

- a) Disminución en la transmisión de enfermedades de la madre hacia el lechón.<sup>7</sup>

- b) Incremento en la productividad de la cerda al aumentar su número de partos por año, generando así una mayor cantidad de cerdos finalizados<sup>7</sup>.
- c) Un menor desgaste de la cerda, por efecto de un periodo más corto de lactancia<sup>8</sup>.

#### Desventajas del destete a los 21 días de edad

- a) Ausencia de inmunidad pasiva a nivel de mucosa oral.
- b) Establecimiento de jerarquías mediante agresiones entre los animales destetados<sup>9</sup>.
- c) Cambio radical en la dieta a la que algunos animales no se adaptan rápidamente<sup>9</sup>.
- d) Aumento en la incidencia de conductas anormales como mamar el ombligo o pene de otros cerdos y aumento en el comportamiento de escape<sup>10</sup>.

#### Extracto leucocitario dializable (DLE)

En 1942 Landstainer y Chase citaron por primera vez la transferencia de la respuesta inmune celular (RIC) por parte de un donador inmune a uno no inmune, utilizando células de exudado peritoneal de cobayos sensibilizados a tuberculina o cloruro de picrilo. En estos estudios demostraron que las células de los animales sensibilizados eran transferidas a los receptores no sensibilizados y estos adquirirían la capacidad de expresar la RIC de los donadores<sup>11</sup>. En 1949 Lawrence demostró que al utilizar linfocitos viables intactos de un individuo con una intradermorreacción (id) positiva a la tuberculina e inyectarlos a uno con una i.d. negativa, provocó una respuesta id positiva al mismo antígeno, transfiriendo así una RIC<sup>12</sup>.

En 1955 Lawrence y col. observaron que la hipersensibilidad cutánea tardía podía ser transferida utilizando extractos solubles de leucocitos provenientes de 20 ml de sangre

total; a éste componente activo se le llamó “factor de transferencia” (FT). En 1955 se dio a conocer que el FT podía pasar a través de una membrana de diálisis con un corte molecular menor a 20 KDa sin perder su capacidad biológica, lo que eliminaba la posibilidad de que el efecto fuese causado por anticuerpos<sup>13</sup>. Lawrence creyó que estos dializados contenían sólo una especie molecular, hoy se sabe que en realidad son un conjunto de moléculas llamadas extractos dializables leucocitarios o DLE (por sus siglas en inglés: *Dialyzable Leukocyte Extracts*). Éstos son lábiles al calor, pero muy estables al frío y pueden almacenarse por varios años a temperaturas entre -20°C y -70°C<sup>14</sup>. En 1983 Wilson y Fudenberg demostraron que el FT producía dos efectos: uno antígeno dependiente y otro antígeno independiente, proponiendo que este último era inespecífico y mediado por componentes como: prostaglandinas, nicotinamida, ácido ascórbico, histamina, serotonina, factores de diferenciación de linfocitos (timosina), quimioatrayentes para monocitos y factores inmovilizadores de neutrófilos<sup>15</sup>. Borvak y Mayer, demostraron que el FT contenía aminoácidos como: lisina, serina, glicina y ácido glutámico<sup>16</sup>. El mecanismo por el cual el FT ejerce su efecto biológico no ha sido completamente establecido, los primeros estudios en humanos mostraron que inhibe la migración de macrófagos de una manera antígeno específica<sup>17</sup>, transfiere la RIC<sup>18</sup>, aumenta la proliferación y actividad de linfocitos T<sup>19</sup>, induce la producción de citocinas en respuesta a antígenos específicos y aumenta la resistencia a infecciones en inmunodeficiencias de carácter genético<sup>20</sup>; estudios más recientes en ratones han demostrado que el FT induce la producción de citocinas como la IL2 y el IFN $\gamma$ <sup>21 22 23</sup>.

Diversos trabajos han demostrado que el FT puede tener interespecificidad, por ejemplo: el FT bovino se ha utilizado para transferencia de inmunidad en aves<sup>24</sup> y el FT porcino se ha aplicado a un modelo de resistencia a *Listeria* en ratón<sup>25</sup>. El FT ha sido ampliamente usado en humanos en la protección y el control de enfermedades infecciosas virales<sup>26 27</sup><sup>28</sup>, micobacterianas<sup>29 12</sup> y parasitarias<sup>30</sup>. En medicina veterinaria el FT ha sido utilizado en la prevención de algunas enfermedades en suinos<sup>23 31</sup>, aves<sup>32 33 34</sup> y bovinos<sup>35</sup>.

El empleo de inmunomoduladores que mejoren la respuesta inmune ha sido abordado desde diferentes enfoques, uno de ellos es el uso de citocinas que estimulen la activación de linfocitos para modular la RIC<sup>36 37 38</sup>. Particularmente el IFN $\gamma$  se ha aplicado en la vacunación contra algunos agentes intracelulares<sup>36 39</sup>; sin embargo, el costo y la disponibilidad de citocinas comerciales hacen difícil su utilización, por lo que, al ser de bajo costo, el DLE podría emplearse como una alternativa para inducir una inmunomodulación.<sup>40</sup>

### Interferón gama (IFN $\gamma$ )

El interferón gamma es una proteína heterodimérica de 50 kDa producida por las células asesinas naturales (NK), células dendríticas plasmocitoides, células NKT, linfocitos T cooperadores 1 (Th1) y linfocitos T citotóxicos (TCD8<sup>+</sup>); es la citocina característica de la subpoblación Th1 de los linfocitos cooperadores. El IFN- $\gamma$  activa a los macrófagos para destruir microorganismos fagocitados, mediante el refuerzo de su función microbicida al estimular la síntesis de intermediarios reactivos del oxígeno y óxido nítrico. El IFN- $\gamma$  es también un estimulador en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II. Favorece la diferenciación de los linfocitos TCD4<sup>+</sup> vírgenes en la subpoblación Th1 e

inhibe la proliferación de los linfocitos Th2. El IFN- $\gamma$  activa los neutrófilos y estimula la actividad citolítica de las células NK.<sup>41</sup>

### Factor de necrosis tumoral alpha (TNF $\alpha$ )

El factor de necrosis tumoral es una proteína de 51 kilodaltones formado por tres cadenas polipeptídicas procedentes de la membrana citoplasmática ante la acción de una metaloproteinasa, la principal función biológica del TNF $\alpha$  consiste en favorecer la inflamación, estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hacia la zona de infección y activar estas células para atacar a los microorganismos mediante: a) la expresión de moléculas de adhesión como selectinas y ligandos de integrinas, en las células del endotelio vascular para la unión y salida de leucocitos. b) estimular a las células endoteliales y a los macrófagos para la secreción de quimiocinas e Interleucina 1.

El TNF $\alpha$  en altas concentraciones actúa en el hipotálamo produciendo fiebre, en los hepatocitos aumenta la síntesis de proteínas séricas como la proteína A amiloidea sérica y el fibrinógeno, y ocasiona la pérdida de células musculares y adiposas al disminuir la síntesis de lipoproteína lipasa.

En cantidades muy elevadas ( $> 10^{-7}$  M) genera una condición de choque al inhibir la capacidad contráctil del miocardio y disminuir la presión arterial, también provoca trombosis intravascular por la estimulación en la expresión del factor tisular.

## **Justificación**

Durante las primeras cuatro semanas del destete, los cerdos se encuentran vulnerables a sufrir diversas infecciones debido a que su sistema inmunológico aún inmaduro no es capaz de generar una respuesta completamente efectiva. Esto, aunado al estrés post destete ocasionado por el cambio de alimentación y jerarquización, eleva la incidencia de cuadros respiratorios y diarreas; en consecuencia, se incrementa la mortalidad, baja la producción y aumentan las pérdidas económicas. El DLEp, al ser un inmunomodulador puede mejorar la respuesta inmune del animal, al aumentar los niveles de citocinas como el TNF $\alpha$  y el IFN $\gamma$ , que favorecen los procesos inflamatorios y el control de infecciones.

Es compromiso del médico veterinario garantizar que el sector agropecuario sea un sistema eficiente y productivo, capaz de satisfacer las demandas alimenticias del país. Dentro de los rubros que resultan importantes en las explotaciones pecuarias, está el uso de tratamientos que permitan la adecuada prevención de las enfermedades infecciosas y con ello reducir pérdidas económicas.

## **Hipótesis**

La aplicación intradérmica de siete dosis de DLEp en cerdos, durante las primeras cuatro semanas del destete, aumentará los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), de interferón gama (IFN $\gamma$ ) y las cuentas leucocitarias, en sangre periférica.

La aplicación intradérmica de siete dosis de DLEp en cerdos, durante las primeras cuatro semanas del destete, disminuirán la incidencia de diarreas, tos, exudado nasal y respiración abdominal en cerdos, durante este período.

La aplicación intradérmica de siete dosis de DLEp en cerdos, durante las primeras cuatro semanas del destete, aumentará la ganancia de peso semanal, durante este período.

## **Objetivo general**

Demostrar el efecto inmunomodulador del DLEp, mediante la medición de: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y cuentas leucocitarias en sangre periférica, la incidencia de diarrea, tos y fiebre, así como la ganancia de peso semanal en cerdos destetados.

## **Objetivos particulares**

\*Obtener DLEp a partir del bazo de un cerdo adulto clínicamente sano, mediante choque térmico y diálisis.

\*Evaluar parámetros inmunológicos en lechones (tratados y no tratados con DLEp), durante las primeras cuatro semanas del destete, mediante la obtención de muestras sanguíneas para determinar los niveles TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y cuentas leucocitarias.

\*Evaluar el estado clínico en lechones tratados y no tratados con DLEp durante las primeras cuatro semanas del destete, mediante la determinación diaria de la incidencia de diarrea y cuadros respiratorios.

\*Evaluar la ganancia de peso y la mortalidad por camada en lechones (tratados y no tratados con DLEp), durante las primeras cuatro semanas del destete, mediante su medición semanal.

## **Material y métodos**

### **\*Diseño experimental:**

El presente estudio consistió en un experimento para determinar el efecto inmunomodulador del DLEp. El análisis de los resultados se hizo por medio de un modelo completamente aleatorio de un factor (tratamiento: DLEp, 16 repeticiones) con mediciones repetidas.

### **\*Obtención de DLEp.**

#### a) Obtención del bazo:

EL DLEp fue obtenido a partir del bazo de una cerda adulta clínicamente sana, de tercer parto, 173 Kg de peso, destinada al sacrificio mediante choque eléctrico y desangrado, en el centro de enseñanza, investigación y extensión en producción porcina (CEIEPP) FMVZ. UNAM. La obtención del órgano se llevó a cabo en el en el área de faenado donde se realizaron los siguientes pasos:

- Desinfección del área con hipoclorito de sodio al 1%
- Incisión sobre la línea media de aproximadamente 25 cm iniciando en el proceso xifoides en dirección caudal.

- Flameado de la incisión
- Extracción del órgano con material estéril.
- Colocación del órgano en una bolsa de plástico estéril y en refrigeración.

El bazo extraído pesó 310 gramos y se sometió a un proceso de extracción del parénquima, para el cual se quemó la cápsula y capa superficial del tejido con una espátula calentada en un mechero, con la finalidad de evitar al máximo la contaminación microbiana. De este procedimiento se obtuvieron 151 gramos de parénquima que se colocaron en solución salina isotónica de cloruro de sodio al 0.9% estéril y se congelaron a -20°C, en un vaso de precipitados previamente horneado a 300 °C por dos horas.

b) Dializado:

El proceso de Dializado del DLEp se llevó a cabo en la planta piloto del Proyecto Factor de Transferencia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, donde el parénquima extraído se maceró con una malla de aluminio con 30 mL de solución salina isotónica de cloruro de sodio al 0.9% El macerado se sometió a 10 ciclos de congelación-descongelación y se dializó, por centrifugación a 5000 gravedades, en tubos Amicon® ultra con corte de 10 kDa. El dializado se esterilizó por filtración en membrana de 0.22 micras y se almacenó en frascos de 3 mL.

c) Cuantificación de proteínas:

La cuantificación de proteínas se hizo utilizando un estuche comercial por el micrométodo del ácido Bicinconinico (BCA) (*Pierce™*) siguiendo las instrucciones del fabricante; por este método se pueden detectar concentraciones de 0.5–20 µg/ml.

El método señala el uso de una placa de 96 pozos, en donde se combinan 150 µL de la muestra por triplicado con un volumen igual de la mezcla de reactivos de BCA. Posteriormente, se incubó a 37°C durante 2 horas y se lee la absorbancia de la reacción a 570 nm en un lector de ELISA. El valor de las lecturas se correlaciona en una curva estándar de calibración con una solución de albúmina sérica bovina (BSA). Se procedió a envasar los extractos a una concentración de 500µg/2ml<sup>42</sup>.

d) Control de calidad:

Se determinó que el producto se encontraba libre de endotoxinas bacterianas por el método de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL)<sup>43</sup>. Ver anexo 1

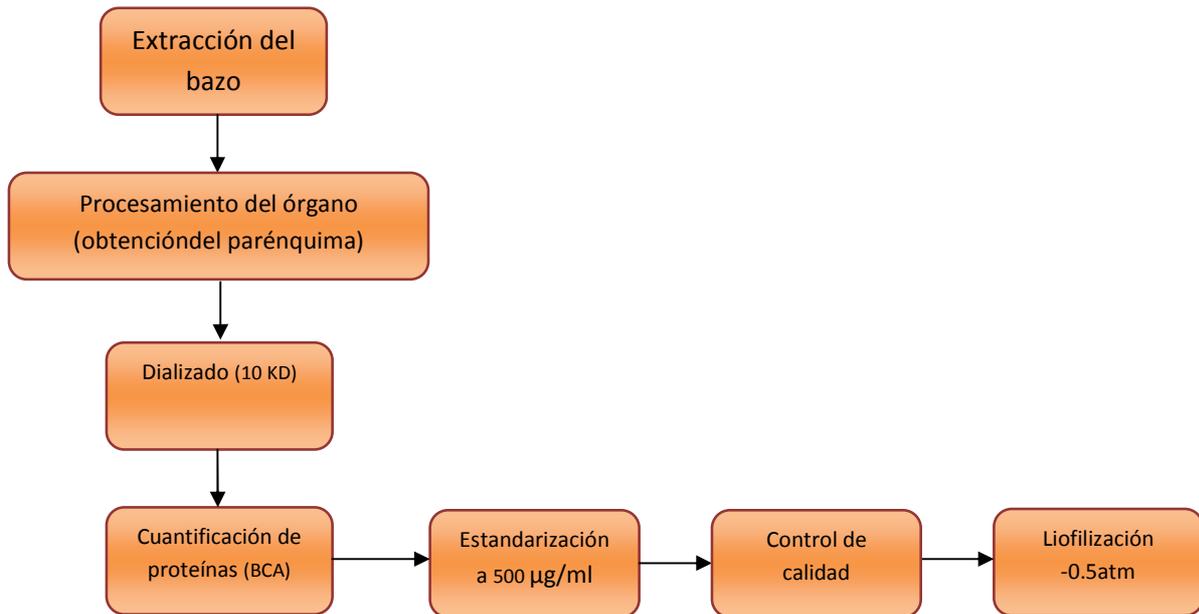
Se realizó un barrido espectrofotométrico UV, en un intervalo de 200 a 350 nm, para conocer la huella espectral del DLEp. Esta obtuvo un pico máximo de absorbancia entre los 240 y 260 nm. Ver anexo 2

e) Liofilización:

Una vez envasados en líquido, se llevó a cabo su liofilización en el Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM. Para ello, los frascos se congelaron a -78 °C durante 24 hrs, después se trasladaron

en hielo seco a la liofilizadora LABCONCO Free Zone 2.5 donde se liofilizó a -0.5 atmosferas durante 16 horas.

Se obtuvieron frascos con un concentración de 500 microgramos de DLEp los cuales se reconstituyeron en 0.5 mL de solución salina isotónica de cloruro de sodio al 0.9% para su aplicación.



**Figura 3.** Flujograma en la elaboración del DLEp

**\*Ubicación espacio-tiempo:**

El estudio se llevó a cabo en el centro de enseñanza investigación y extensión en producción porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, el cual tuvo inicio el sábado 25 de enero del 2011 y concluyó el miércoles 23 de febrero del 2011. La evaluación de parámetros inmunológicos se realizó en los laboratorios de Patología Clínica del Departamento de patología y en el laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.

## Parámetros productivos de la granja

Es una granja con un sistema de crianza intensivo de ciclo completo que cuenta con un inventario de 144 cerdas en producción y 29 sementales. Sus parámetros de mortalidad en el destete son aceptables, con un índice menor al 1.3 % en el periodo que comprendió el estudio. En el Anexo 3, se muestran los detalles de los parámetros productivos.

En estudios serológicos la granja se encuentra negativa a Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, *Leptospira spp*, Gastroenteritis Transmisible de los lechones, Rúbula Virus Porcino, enfermedad de Aujeszky, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma Hyopneumoniae* y *Streptococcus suis* tipo 2, aunque es positiva a Influenza porcina, Parvovirus porcino, Erisipela, rinitis atrófica y áscaris suum.

## Calendario de vacunación de las cerdas en producción

15 días antes del parto se vacunan con la vacuna triple (parvovirus porcino, *Leptospira* y Erisipela) y 18 -20 días después del servicio se vacunan con influenza porcina.

### \*Grupos de estudio:

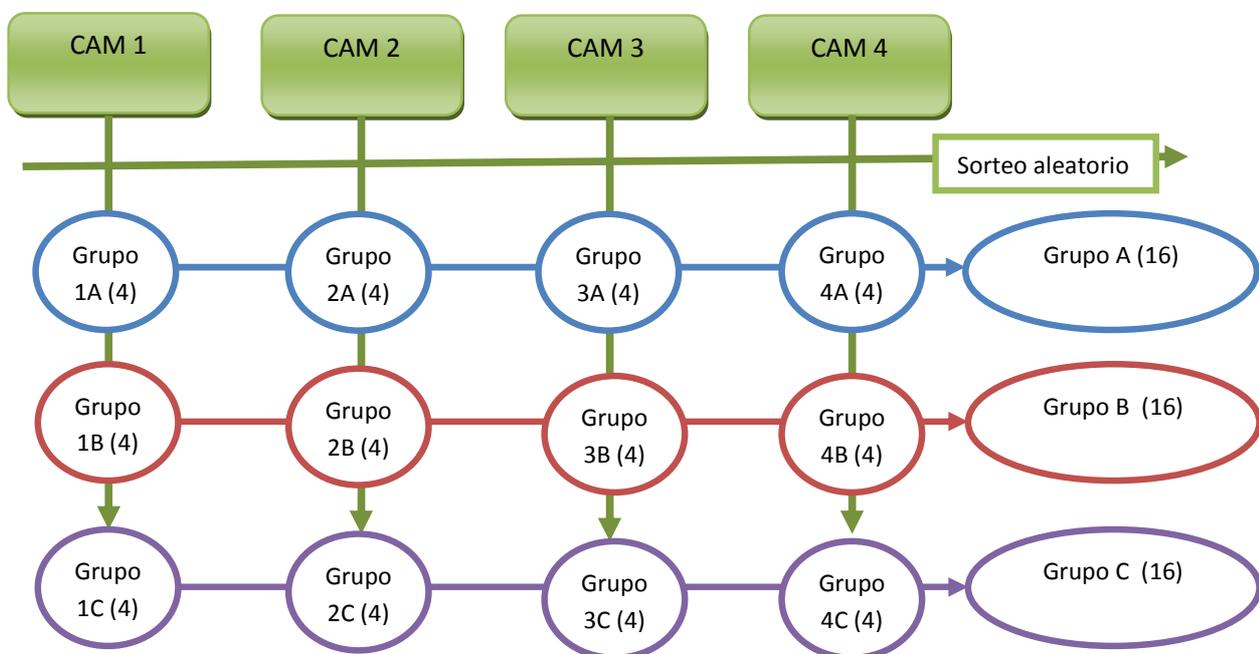
Se tomó como objeto de estudio a cuatro camadas de lechones York- Landrace procedentes de cerdas en producción del Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP, FMVZ- UNAM), con identificación 814 (5º parto), 884 (3º parto), 849 (4º parto), 873 (3º parto), programadas a parir el mismo día (5 enero del 2011).

El criterio de inclusión se basó en la disponibilidad y el tamaño de la camada cumpliendo con los siguientes puntos:

- a) Lechones de la misma edad
- b) Camada de 12 individuos

El criterio de exclusión fue la muerte del sujeto

A los 12 animales de cada camada se les dividió en tres grupos de cuatro animales (A, B, C). El grupo A recibió una dosis alta de DLEp (0.5ml/animal en la etapa uno, y 1ml en la etapa dos); el grupo B recibió una dosis baja de DLEp (0.1ml/animal en la etapa uno, y 0.2ml en la etapa dos); el grupo C fue de control, recibiendo solución salina isotónica de cloruro de sodio al 0.9% (0.5ml/animal en la etapa uno, y 1ml en la etapa dos) a cada uno de los animales se les identificó mediante un arete plástico donde se indicó camada, grupo de tratamiento y número de animal.



**Figura 4.** Formación de los grupos de estudio.

**\*Tratamiento y toma de muestras:**

A los grupos tratados se les aplicaron 7 dosis de DLEp, en dos etapas: a) etapa uno: 5 inoculaciones en intervalos de 3 días; b) etapa dos: 2 inoculaciones en intervalos de 8 días. Todas ellas por vía intradérmica (ID) en la región de la tabla del cuello. A todos los grupos se les realizaron 3 muestreos sanguíneos de 7 ml, con la técnica de la vena cava anterior: 1) Antes de comenzar los manejos (día 21 de edad); 2) Al final de la etapa 1 (día 34 de edad); 3) al final de la etapa 2 (día 50 de edad), para obtener suero y sangre completa para la detección de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y el conteo de poblaciones leucocitarias, según se muestra en el cronograma siguiente:

**Manejo en días de edad de los animales.**

Día 21: 1ª inoculación DLEp (tratados) y SSI (testigo),

1ª toma de muestras sanguíneas.

Día 24: 2ª inoculación DLEp (tratados) y SSI (testigo).

Día 27: 3ª inoculación DLEp (tratados) y SSI (testigo).

Día 30: 4ª inoculación DLEp (tratados) y SSI (testigo).

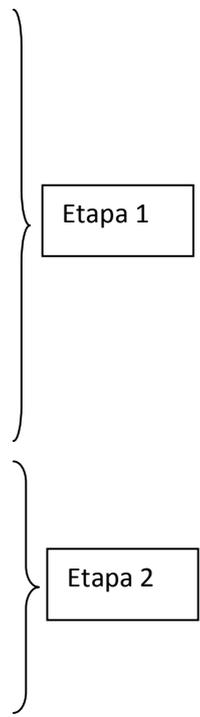
Día 33: 5ª inoculación DLEp (tratados) y SSI (testigo).

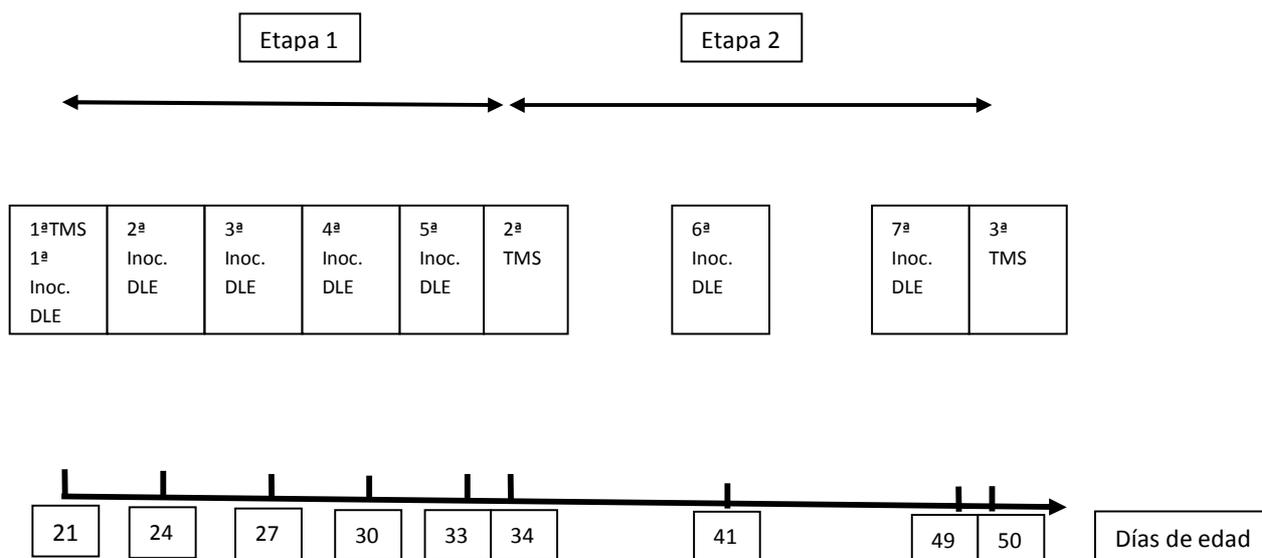
Día 34: 2ª toma de muestras sanguíneas

Día 41: 6ª inoculación DLEp (tratados) y SSI (testigo).

Día 49: 7ª inoculación DLEp (tratados) y SSI (testigo).

Día 50: 3ª toma de muestras sanguíneas.





**Figura 5** Línea del tiempo de manejos en días de edad. TMS: toma de muestra sanguínea.

**Cuadro 1.** Dosis de DLEp aproximadas por etapa y grupo

Grupo	n	Etapa 1, Dosis (1-5ª inoc. 21-32 días de edad)	Etapa 2, Dosis (6,7ª inoc. 33-49 días de edad)
A	16	500 µg/animal (~72.48µg/kg)	1000 µg/animal (~81.8 µg/kg)
B	16	100 µg/animal (~14.25µg/kg)	200 µg/ animal (~19.6µg/kg)
C	16	0.5 ml SSI NaCl 0.9%	1ml SSI NaCl 0.9%

~: Aproximadamente

**\*Condiciones Ambientales:**

En la granja se cuenta con un sistema de corraletas elevadas de 5.25 m<sup>2</sup> teniendo 0.437 m<sup>2</sup> por animal, se colocó cada camada en una corraleta distinta, el área de destete cuenta

concalentadores de gas para mantener la temperatura de la caseta en 27°C. Los lechones recibieron durante el periodo del estudio, alimento comercial iniciador etapa dos de la marca nupig®, tres veces al día.

**\*Métodos de evaluación:**

#### I. Evaluación de parámetros inmunológicos:

A las muestras sanguíneas con anticoagulante se les realizó el conteo y determinación de poblaciones leucocitarias (plaquetas, leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos y eosinófilos.) El suero obtenido de los tubos sin anticoagulante se utilizó para detectar la concentración de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  mediante pruebas de ELISA de captura con los estuches comerciales: invitrogen C#KSC4022 einvitrogen C# KCS3012, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### II. Evaluación del estado clínico:

El estado clínico fue evaluado diariamente durante el tiempo del estudio, para poder determinar la incidencia de fiebre, cuadros respiratorios (presencia de tos, respiración abdominal y exudado nasal) y diarrea (observación perianal y estimulación en la región lumbar), la información se llevó en el registro que se muestra en el anexo 4.

Los animales que no resolvían el cuadro diarréico o respiratorio al tercer día fueron tratados con gentamicina (4 mg/kg) o enrofloxacin (2.5 mg/kg) respectivamente.

### III. Evaluación del peso:

El peso corporal individual de los animales, fue medido los lunes de cada semana acumulando cinco mediciones y registrándose en el formato que se muestra en el anexo 5.

## Resultados

### Análisis de los datos:

El análisis de las variables cuantitativas se realizó de manera descriptiva para obtener estimadores de: número de observaciones, promedios, error estándar de la media e intervalo de confianza de 95% para media; asimismo se determinó que las variables: cuentas plaquetarias, linfocitos, interferón gamma y peso corporal se distribuyeron normalmente por medio de la prueba de bondad de ajuste Shapiro-Wilk por fecha de muestreo considerando que en las distintas fechas pudiera modificar los resultados, a las que se realizó el análisis de varianza multivariado (MANOVA) ya que los grupos fueron observados en tres tiempos diferentes. Para este análisis se consideró como criterio de decisión estadística la lambda de Wilks ( $\lambda$ ) con la aproximación F y  $\alpha= 0.05$  como nivel de significación estadístico. En el caso del interferón gamma donde sólo fueron detectados valores en el tercer muestreo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor entre los tratamientos, y la correspondiente prueba de comparación de promedios de Dunnett. Las variables leucocitos totales, neutrófilos y factor de necrosis tumoral no se distribuyeron normalmente, por lo que para poder realizar el análisis paramétrico

correspondiente fueron transformadas por la función Box-Cox, obteniendo con ello su distribución normal. Las variables: monocitos y eosinófilos, que ni mediante esta transformación se comportaron normalmente, los estimadores descriptivos fueron: número de observaciones, el valor mínimo, máximo y mediana. El efecto del tratamiento para dichas variables fue analizado por medio de contraste no paramétrico de la suma de rangos Willcoxon/Kruskal/Wallis con aproximación Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) y nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

Para el análisis de la frecuencia de signología respiratoria, presencia de diarrea y fiebre se utilizaron tablas de contingencia con la prueba de  $\chi^2$  de Pearson para determinar la posible relación entre el acumulado en la incidencia casos y tratamientos.

En los cuadros de resultados se observan datos faltantes produciendo variaciones en las muestras (n); ésto es debido a condiciones de la muestra que impidieron obtener resultados en el laboratorio.

## I Evaluación de parámetros inmunológicos

Correspondiente al estudio de las variables: plaquetas, cuentas leucocitarias (leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos), concentración de interferón gamma y factor de necrosis tumoral alpha.

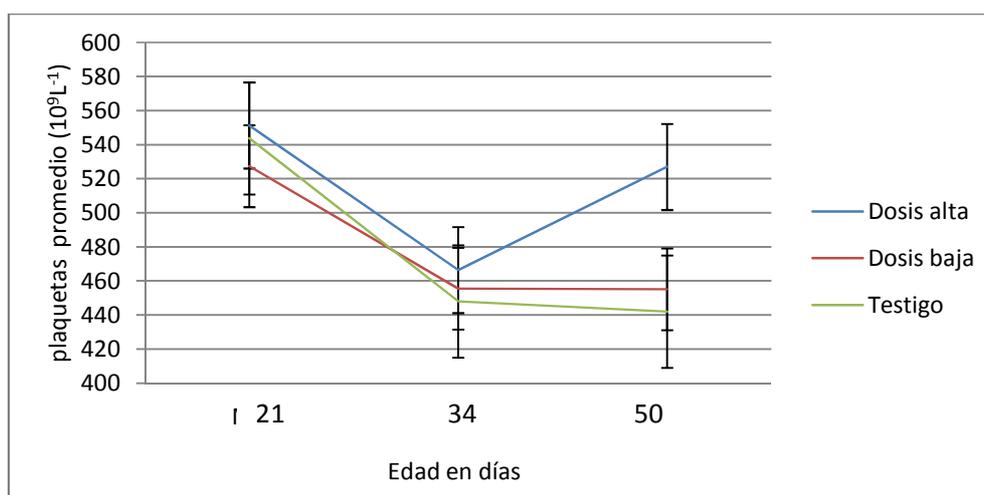
## Plaquetas

En el análisis de la cuenta de plaquetas, no se observó diferencia significativa debida a la interacción tratamiento\* fecha de muestreo ( $\Lambda=0.9314$ ,  $F_{4, 118} = 1.068$ ,  $P=0.3758$ ). Tampoco se observó dicha diferencia entre tratamientos ( $F_{2, 60} = 0.78$ ,  $P=0.463$ ), mientras que la cuenta de plaquetas fue diferente entre las fechas de muestreo ( $F_{2, 59} = 6.766$ ,  $P=0.0023$ ).

Cuadro 2. Estadística descriptiva plaquetas

Tratamiento	Muestreo	n	Promedio $10^9L^{-1}$	EEM	IC 95%
Dosis alta	1	16	573.81	42.46	664.32, 483.30
	2	7	466.42	35.44	553.16, 379.69
	3	15	526.93	24.63	579.76, 474.09
Dosis baja	1	10	527.4	48.82	637.85, 416.94
	2	7	455.57	51.29	581.09, 330.05
	3	15	455.13	37.17	534.87, 375.39
Grupo testigo	1	16	543.68	33.56	615.23, 472.14
	2	7	448	40.98	548.27, 347.72
	3	12	442.08	39.56	529.16, 354.99

n: tamaño de la muestra, EEM: Error estándar de la media, IC 95%: Intervalo de confianza del 95% de la media.



**Figura 6.** Cuenta de plaquetas( $10^9L^{-1}$ ) en sangre en cerdos York-Landracea tres dosis de DLEp, las barras verticales corresponden a un error estándar del promedio.

## Leucocitos totales

En el análisis de la cuenta de leucocitos totales, no se observó diferencia significativa debida a la interacción tratamiento\* fecha de muestreo ( $\Lambda=0.9405$ ,  $F_{4, 176} = 1.370$ ,  $P=0.2461$ ). Tampoco se observó dicha diferencia entre tratamientos ( $F_{2, 89} = 0.117$ ,  $P=0.899$ ), mientras que la cuenta de leucocitos fue diferente entre las fechas de muestreo ( $F_{2, 88}=6587.13$ ,  $P<.0001$ ).

Cuadro 3. Estadística descriptiva leucocitos totales

Tratamiento	Muestreo	n	Promedio $10^9L^{-1}$	EEM	IC 95%	transformación box-cox
Dosis alta	1	16	9.94	0.658	11.34, 8.54	$((1^{\circ} M)^{-0.8}) - 1) / -0.0152$
	2	16	14.31	0.747	15.90, 12.71	$\text{Log}((2^{\circ} M)) * 14.3854$
	3	16	17.56	0.793	19.26, 15.87	$((3^{\circ} M)^{-0.4}) - 1) / -0.006$
Dosis baja	1	16	8.36	0.442	9.30, 7.42	$((1^{\circ} M)^{-0.8}) - 1) / -0.0152$
	2	16	15.11	0.664	16.42, 13.70	$\text{Log}((2^{\circ} M)) * 14.3854$
	3	15	20.39	1.359	23.30, 17.47	$((3^{\circ} M)^{-0.4}) - 1) / -0.006$
Grupo testigo	1	16	9.62	0.692	11.10, 8.14	$((1^{\circ} M)^{-0.8}) - 1) / -0.0152$
	2	15	14.60	0.915	16.56, 12.64	$\text{Log}((2^{\circ} M)) * 14.3854$
	3	14	18.02	1.147	20.50, 15.54	$((3^{\circ} M)^{-0.4}) - 1) / -0.006$

n: tamaño de la muestra, EEM: Error estándar de la media, IC 95%: Intervalo de confianza del 95% de la media, Box-cox: Función para transformación de la variable a la normalidad, M: muestreo.

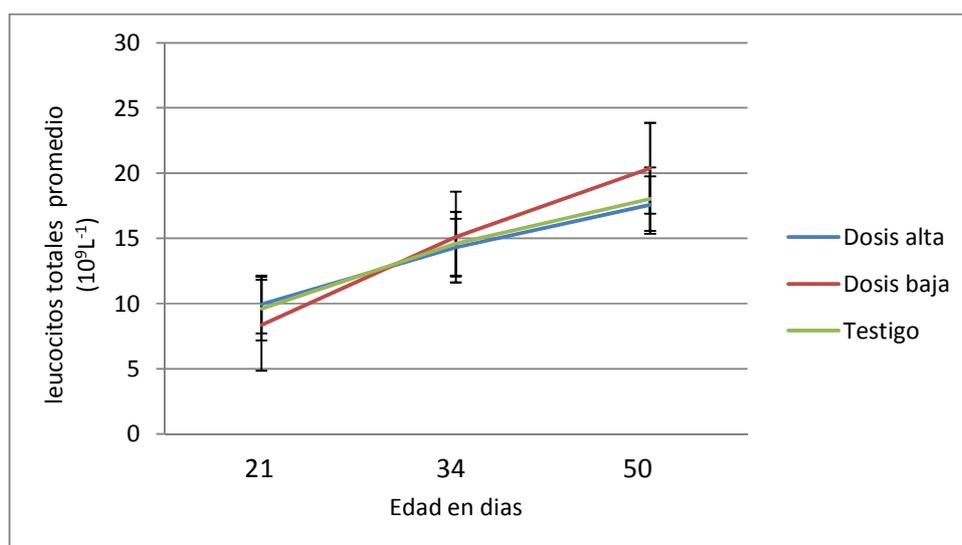


Figura 7. Cuenta de leucocitos totales ( $10^9L^{-1}$ ) en sangre en cerdos York-Landrace a tres dosis de DLEp, las barras verticales corresponden a un error estándar del promedio

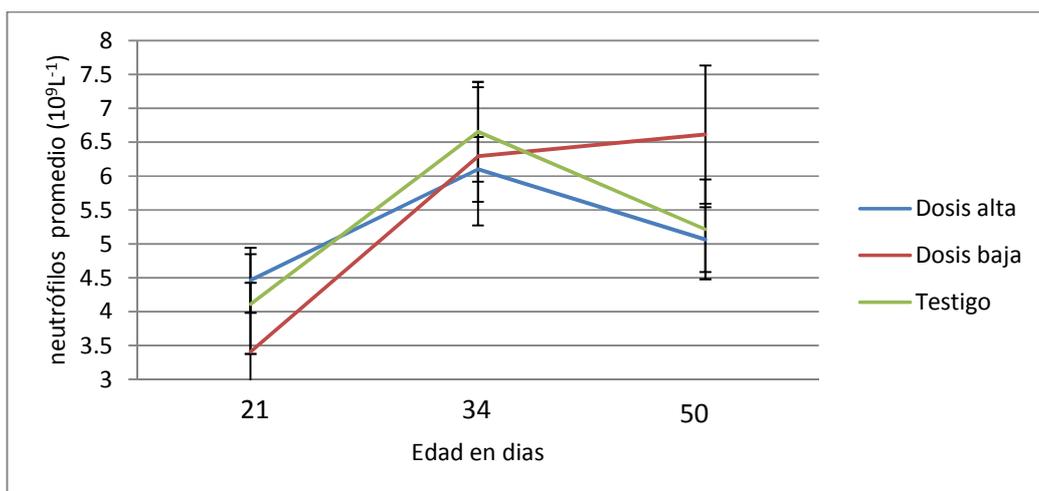
## Neutrófilos

En el análisis de la cuenta de neutrófilos, no se observó diferencia significativa debida a la interacción tratamiento\* fecha de muestreo ( $\Lambda=0.9682$ ,  $F_{4, 164} = 0.6671$ ,  $P=0.6157$ ). Tampoco se observó dicha diferencia entre tratamientos ( $F_{2, 83} = 0.1425$ ,  $P=0.8674$ ), mientras que la cuenta de neutrófilos fue diferente entre las fechas de muestreo ( $F_{2, 82}=1118.38$ ,  $P<.0001$ ).

Cuadro 4. Estadística descriptiva neutrófilos

Tratamiento	Muestreo	n	Promedio $10^9 L^{-1}$	EEM	IC 95%	Transformación Box-Cox
Dosis alta	1	16	4.46	0.636	5.81, 3.10	$(("1^\circ M")^{-0.8}) - 1) / -0.0152$
	2	16	6.1	0.378	6.90, 5.29	$\text{Log} ("2^\circ M") * 14.3854$
	3	15	5.19	0.393	6.03, 4.34	$(("3^\circ M")^{-0.4}) - 1) / -0.0069$
Dosis baja	1	14	3.40	0.276	4.0, 2.80	$(("1^\circ M")^{-0.8}) - 1) / -0.0152$
	2	16	6.29	0.534	7.43, 5.15	$\text{Log} ("2^\circ M") * 14.3854$
	3	14	6.86	1.204	9.46, 4.26	$(("3^\circ M")^{-0.4}) - 1) / -0.0069$
Grupo testigo	1	16	4.11	0.589	5.36, 2.85	$(("1^\circ M")^{-0.8}) - 1) / -0.0152$
	2	15	6.65	0.588	7.91, 5.39	$\text{Log} ("2^\circ M") * 14.3854$
	3	12	5.66	0.703	7.21, 4.11	$(("3^\circ M")^{-0.4}) - 1) / -0.0069$

n: tamaño de la muestra, EEM: Error estándar de la media, IC 95%: Intervalo de confianza del 95% de la media, Box-cox: Función para transformación de la variable a la normalidad, M: muestreo.



**Figura 8.** Cuenta de neutrófilos( $10^9 L^{-1}$ ) en sangre en cerdos York-Landracea tres dosis de DLEp, las barras verticales corresponden a un error estándar del promedio

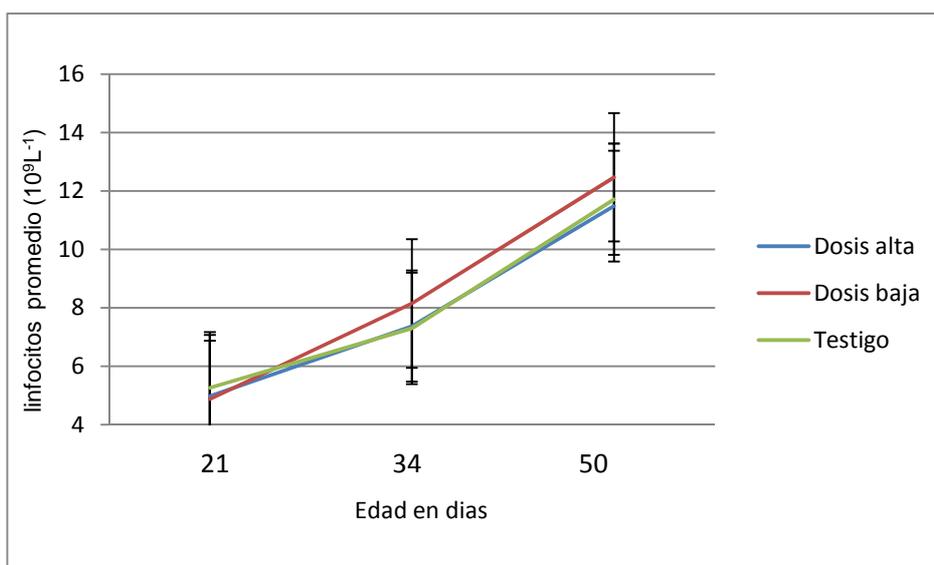
## Linfocitos

En el análisis de la cuenta de linfocitos, no se observó diferencia significativa debida a la interacción tratamiento\* fecha de muestreo ( $\Lambda=0.9322$ ,  $F_{4, 76} = 0.6786$ ,  $P=0.6089$ ). Tampoco se observó dicha diferencia entre tratamientos ( $F_{2, 39} = 0.7637$ ,  $P=0.4728$ ), mientras que la cuenta de linfocitos fue diferente entre las fechas de muestreo ( $F_{2, 38}=56.6648$ ,  $P<.0001$ ).

Cuadro 5. Estadística descriptiva linfocitos

Tratamiento	Muestreo	n	Promedio $10^9 L^{-1}$	EEM	IC 95%
Dosis alta	1	16	4.97	0.299	5.61, 4.33
	2	16	7.37	0.708	8.88, 5.86
	3	16	11.47	0.809	13.20, 9.74
Dosis baja	1	13	4.86	0.392	5.72, 4.01
	2	16	8.01	0.743	9.72, 6.55
	3	15	12.46	0.990	14.59, 10.34
Grupo testigo	1	16	5.25	0.266	5.82, 4.68
	2	15	7.29	0.503	8.37, 6.21
	3	14	12.38	1.420	15.45, 9.31

n: tamaño de la muestra, EEM: Error estándar de la media, IC 95%: Intervalo de confianza del 95% de la media



**Figura 9.** Cuenta de linfocitos en sangre ( $10^9 L^{-1}$ ) en cerdos York-Landrace a tres dosis de DLEp, las barras verticales corresponden a un error estándar del promedio

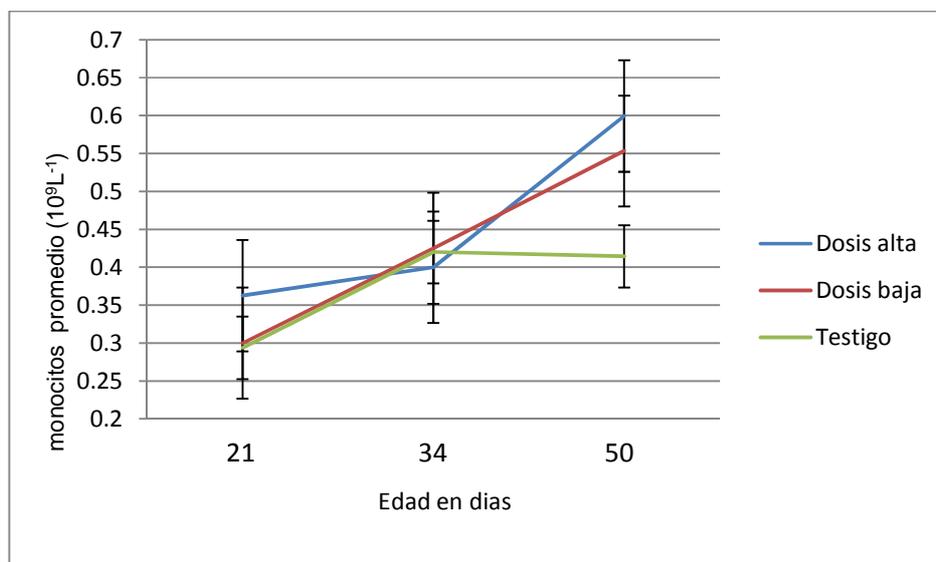
## Monocitos

En el análisis de la cuenta de monocitos no se observó diferencia estadística significativa para el efecto de tratamiento por medio de contraste no paramétrico de la suma de rangos en ninguno de los tres muestreos ( $\chi^2=1.2243$ ,  $P=0.5422$ ), ( $\chi^2=0.2405$ ,  $P=0.8867$ ), ( $\chi^2= 3.5866$ ,  $P=0.1664$ ) respectivamente.

Cuadro 6. Estadística descriptiva monocitos

Tratamiento	Muestreo	n	min $10^9L^{-1}$	max $10^9L^{-1}$	mediana $10^9L^{-1}$
Dosis alta	1	16	0	0.8	0.4
	2	16	0	0.8	0.35
	3	16	0.2	1.6	0.4
Dosis baja	1	14	0.1	0.8	0.25
	2	16	0	1.2	0.4
	3	15	0	1.9	0.3
Grupo testigo	1	16	0	0.7	0.25
	2	15	0	1.6	0.3
	3	14	0	0.8	0.3

n: tamaño de la muestra, min: valor mínimo, max: valor máximo.



**Figura 10.** Cuenta de monocitos en sangre ( $10^9L^{-1}$ ) en cerdos York-Landrace a tres dosis de DLEp, las barras verticales corresponden a un error estándar del promedio

## Eosinófilos

En el análisis de la cuenta de eosinófilos, no se observó diferencia estadística significativa para el efecto de tratamiento por medio de contraste no paramétrico de la suma de rangos en ninguno de los tres muestreos ( $\chi^2=0.5776$ ,  $P=0.7492$ ), ( $\chi^2=2.8826$ ,  $P=0.2366$ ), ( $\chi^2=2.3177$ ,  $P=0.3138$ ) respectivamente.

Cuadro 7. Estadística descriptiva eosinófilos

Tratamiento	Muestreo	n	min $10^9L^{-1}$	max $10^9L^{-1}$	mediana $10^9L^{-1}$
Dosis alta	1	16	0	0.6	0.1
	2	16	0	0.5	0.35
	3	16	0	1.5	0.3
Dosis baja	1	14	0	0.2	0.1
	2	13	0	0.4	0.2
	3	15	0	0.9	0.2
Grupo testigo	1	16	0	0.3	0.1
	2	15	0	0.6	0.2
	3	14	0	0.3	0.2

n: tamaño de la muestra, min: valor mínimo, max: valor máximo.

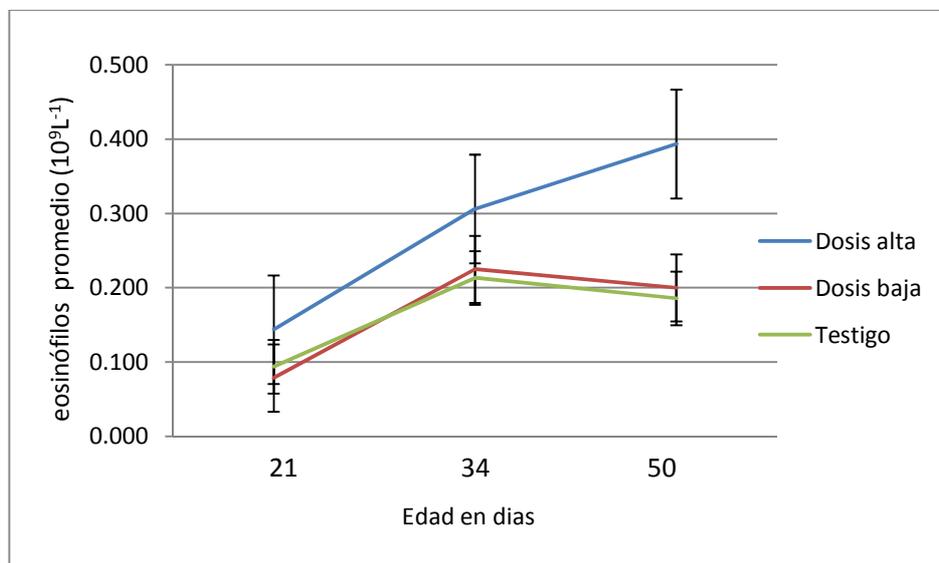


Figura 11. Cuenta de eosinófilos en sangre ( $10^9 L^{-1}$ ) en cerdos York-Landrace a tres dosis de DLEp, las barras verticales corresponden a un error estándar del promedio

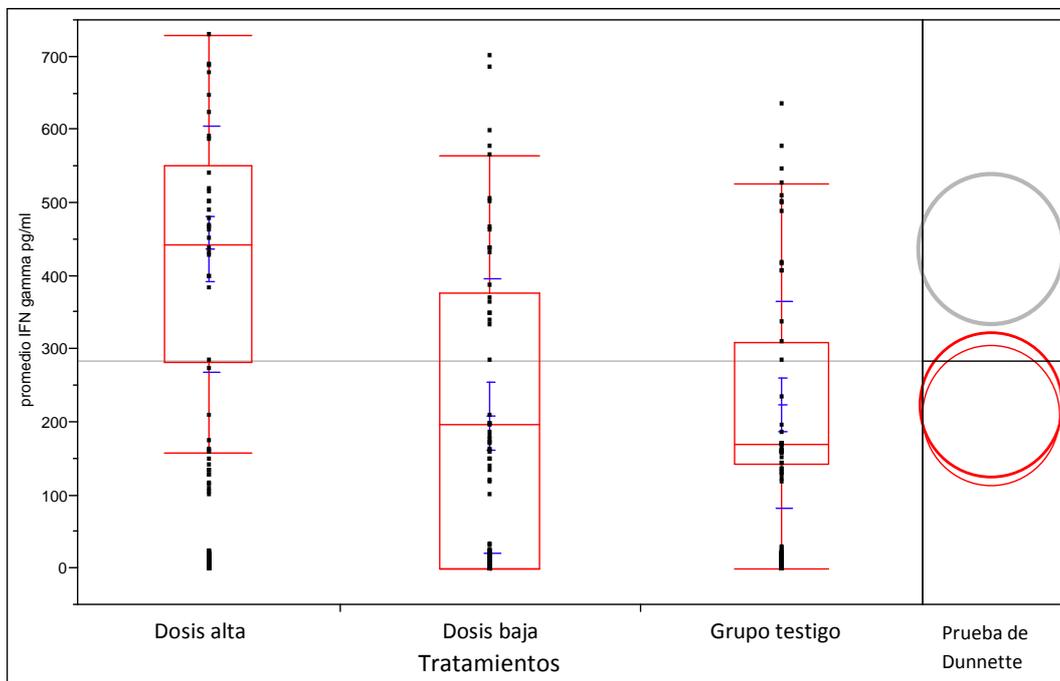
## Interferón gamma

En el análisis de la concentración sérica de IFN $\gamma$ , se observó diferencia significativa para el efecto de tratamiento, por medio de el método de Dunnett para el análisis de varianza con grupo de control, ( $d=2.288$ ,  $\alpha=0.05$ ,  $P=0.003$ ). Los valores correspondientes a los muestreos 1 y 2 fueron inferiores a los que puede detectar la prueba, por lo cual no se incluyeron en el cuadro de estadística descriptiva.

Cuadro 8. Estadística descriptiva IFN $\gamma$

Tratamiento	Muestreo	n	Promedio pg/mL	EEM	IC 95%
Dosis alta	3	14	437.15	45.19	534.8, 339.5
Dosis baja	3	16	208.84	47.05	309.1, 108.5
Grupo testigo	3	15	223.65	36.45	301.8, 145.4

n: tamaño de la muestra, EEM: Error estándar de la media, IC 95%: Intervalo de confianza del 95% de la media, pg/mL: picogramos por mililitro.



**Figura 12.** Concentración de IFN $\gamma$  sérico (pg/ml) en cerdos York-Landrace a tres dosis de DLEp, tercer muestreo, los puntos indican los valores de IFN $\gamma$  de cada tratamiento, los diagramas de caja, la distribución, y los círculos la comparación de los promedios por Dunnette.

## Factor de necrosis tumoral alpha

En el análisis de la concentración de TNF $\alpha$ , se observó diferencia significativa debida a la interacción tratamiento\* fecha de muestreo ( $\Lambda=0.7009$ ,  $F_{4, 72} = 3.4995$ ,  $P=0.0114$ ), así como entre los muestreos ( $F_{2, 36}=2031.96$ ,  $P<0.0001$ ), mas no entre tratamientos ( $F_{3, 37}=0.1522$ ,  $P=0.0727$ ).

Cuadro 9. Estadística descriptiva TNF $\alpha$

Tratamiento	Muestreo	n	Promedio pg/mL	EEM	IC 95%	Formula Box-Cox
Dosis alta	1	14	98.57	10.74	121.79, 75.36	$(("1^\circ M")^{-0.8}) - 1) / -0.0152$
	2	16	85.18	7.20	100.53, 69.83	$\text{Log} ("2^\circ M") * 14.3854$
	3	14	131.90	6.10	145.09, 118.71	$(("3^\circ M")^{-0.4}) - 1) / -0.0069$
Dosis baja	1	14	76.05	9.25	96.05, 56.04	$(("1^\circ M")^{-0.8}) - 1) / -0.0152$
	2	16	75.21	5.36	86.65, 63.78	$\text{Log} ("2^\circ M") * 14.3854$
	3	13	156.54	7.53	172.96, 140.12	$(("3^\circ M")^{-0.4}) - 1) / -0.0069$
Grupo testigo	1	16	173.86	20.18	216.88, 130.85	$(("1^\circ M")^{-0.8}) - 1) / -0.0152$
	2	15	114.68	13.58	143.81, 85.5	$\text{Log} ("2^\circ M") * 14.3854$
	3	14	150.60	5.57	162.54, 138.5	$(("3^\circ M")^{-0.4}) - 1) / -0.0069$

n: tamaño de la muestra, EEM: Error estándar de la media, IC 95%: Intervalo de confianza del 95% de la media, Box-cox: Función para transformación de la variable a la normalidad, pg/mL: picogramos por mililitro, M: muestreo.

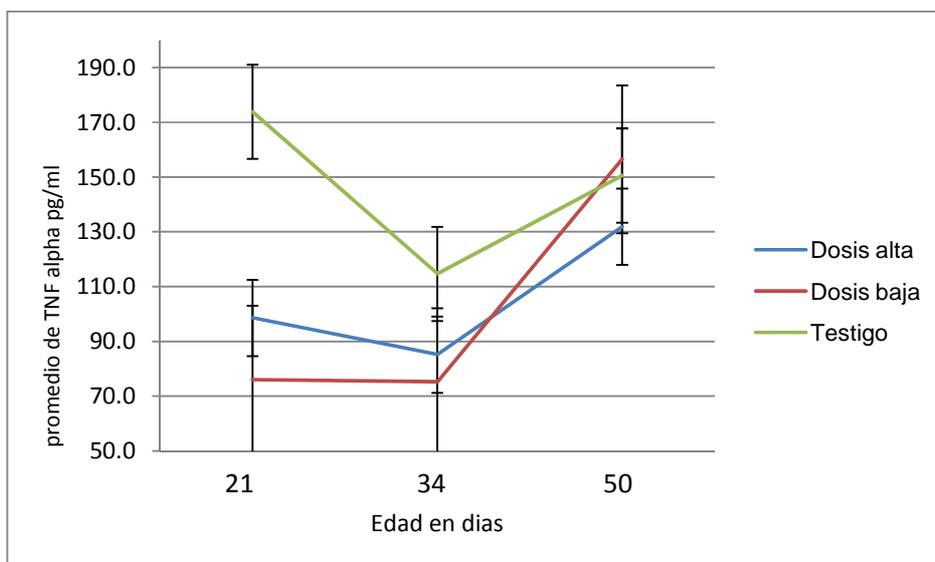


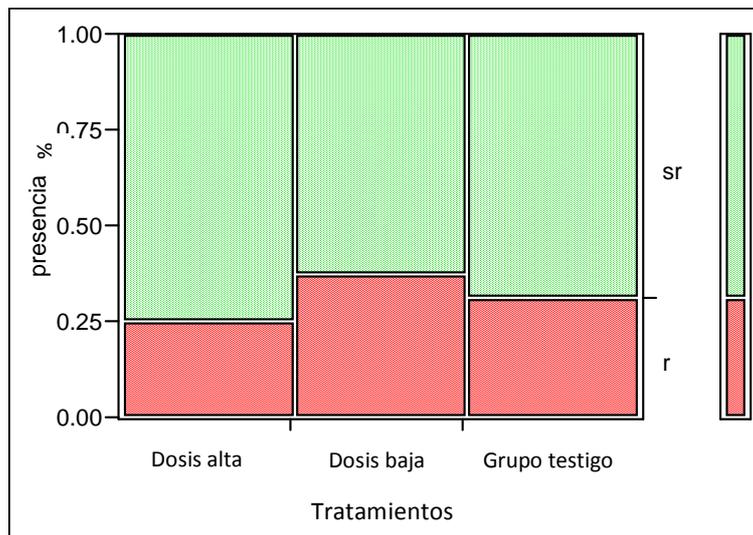
Figura 13. Niveles séricos de TNF $\alpha$  (pg/ml) en cerdos York-Landrace, las barras verticales corresponden a un error estándar del promedio.

## II Evaluación del estado clínico

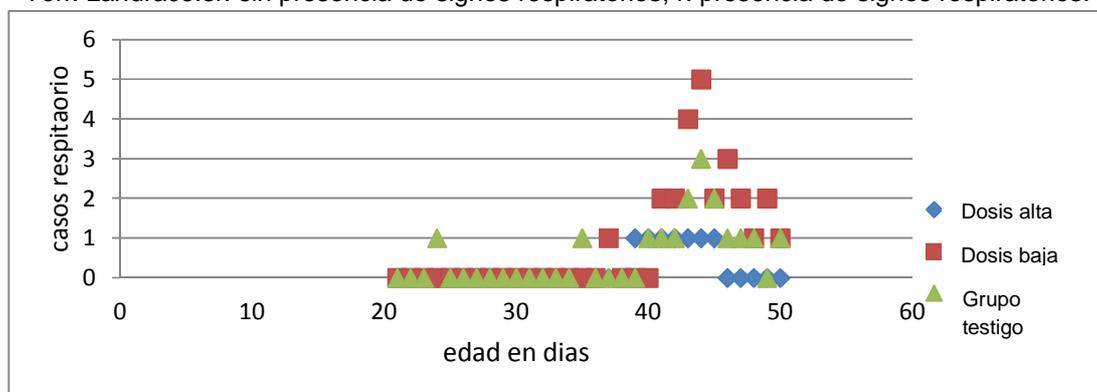
Correspondiente al análisis de las variables: incidencia de signología respiratoria, incidencia de diarrea e incidencia de fiebre.

### Signos respiratorios

Con los datos observados no encontramos evidencia suficiente de que la signología respiratoria esté asociada con los tratamientos, esto mediante la prueba de  $\chi^2$  Pearson ( $R^2=0.0098$ ,  $\chi^2_2=0.582$ ,  $P=0.747$ ).



**Figura 14.** Frecuencia acumulada de signología respiratoria por tratamiento, en cerdos destetados York-Landrace. sr: sin presencia de signos respiratorios, r: presencia de signos respiratorios.

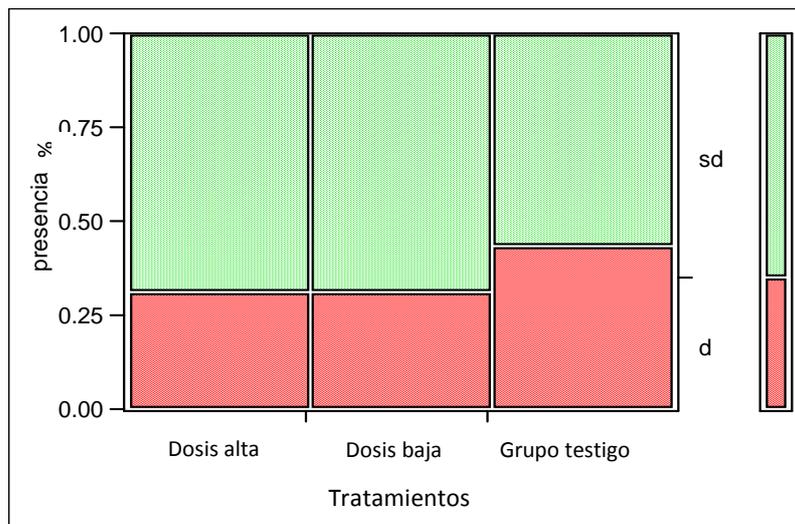


**Figura 15.** Incidencia, por días de edad, de cuadros respiratorios por tratamiento en cerdos York-Landrace a dos diferentes dosis de DLEp.

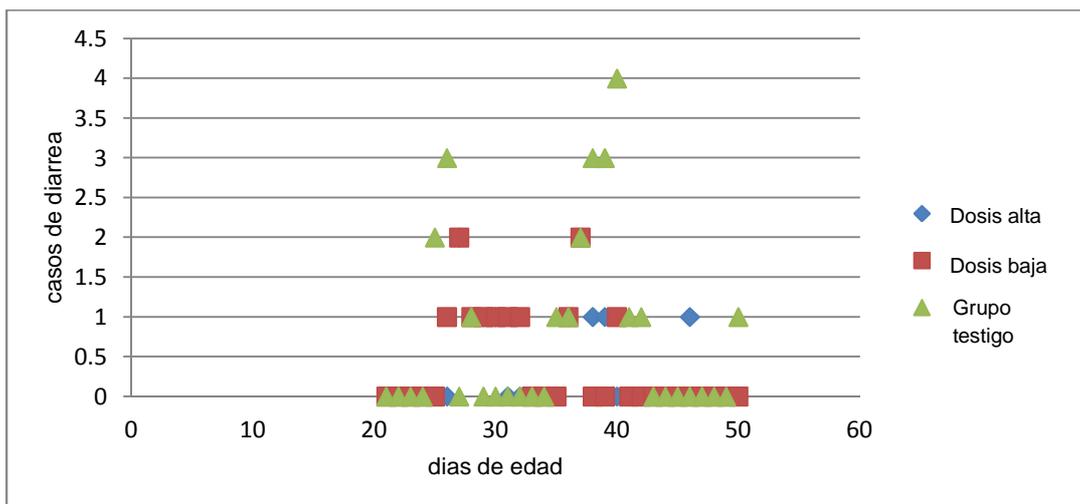
## Diarrea

Con los datos observados no encontramos evidencia suficiente de que la signología diarreica esté asociada con los tratamientos, esto mediante la prueba de  $\chi^2$  Pearson

( $R^2=0.0115$ ,  $\chi^2=0.729$ ,  $P=0.6947$ ).



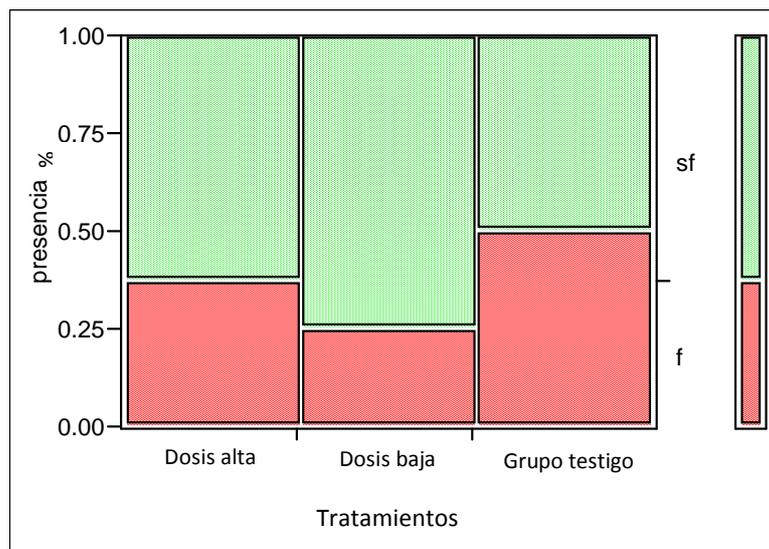
**Figura 16.** Porcentaje en la incidencia acumulada de diarrea en cerdos destetados York-Landrace, por tratamiento. sd: sin presencia de diarrea, d: presencia de diarrea.



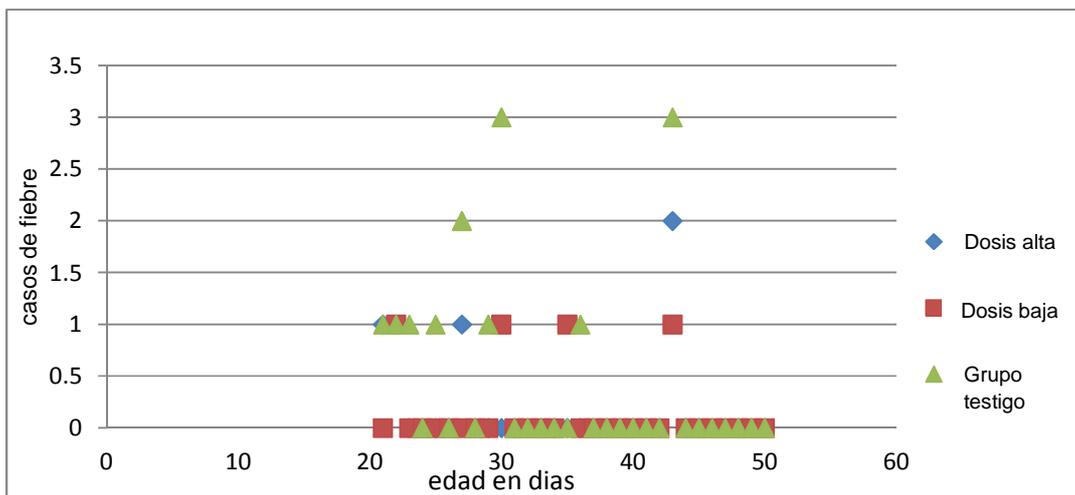
**Figura 17.** Incidencia de diarrea, por días de edad, en cerdos York-Landrace tratados a dos diferentes dosis de DLEp

## Fiebre

Con los datos observados no encontramos evidencia suficiente de que la signología febril esté asociada con los tratamientos, esto mediante la prueba de  $\chi^2$  Pearson ( $R^2=0.0341$ ,  $\chi^2_2=2.133$ ,  $P=0.3442$ ).



**Figura 18.** Porcentaje en la incidencia acumulada de fiebre, en cerdos destetados York-Landrace, por tratamiento. sf: sin presencia de fiebre, f: presencia de fiebre, tx: tratamientos



**Figura 19.** Incidencia de fiebre, por días de edad, en cerdos York-Landrace tratados a dos diferentes dosis de DLEp

Al día 34 de edad, murió un integrante del grupo testigo (arete 2C3). En la necropsia se encontró un cuadro de gastroenteritis hemorrágica sobre aguda y úlceras orales, el patólogo señaló una posible inmunodeficiencia de origen desconocido. Se tomó una muestra de bazo para observación histopatológica, donde se vio una atrofia esplénica con despoblación linfocítica marcada.

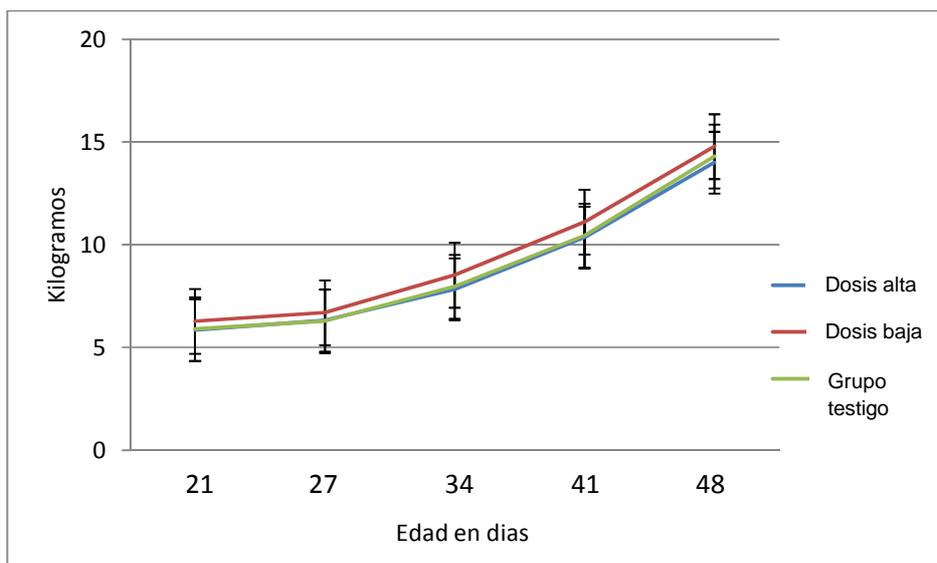
### III Evaluación del peso

En el análisis del peso corporal, no se observó diferencia significativa debida a la interacción tratamiento\* fecha de medición ( $\Lambda=0.8620$ ,  $F_{8, 82} = 0.7897$ ,  $P=0.6131$ ). Tampoco se observó dicha diferencia entre tratamientos ( $F_{2, 44} = 0.8792$ ,  $P=0.4223$ ), mientras que el peso corporal fue diferente entre las fechas de medición ( $F_{4, 41}=352.1889$ ,  $P<0.0001$ ).

Cuadro 10. Estadística descriptiva de la ganancia de peso corporal

Tratamiento	Medición	n	Promedio kg	EEM	IC 95%
Dosis alta	1	16	5.85	0.223	6.32, 5.37
	2	16	6.31	0.269	6.88, 5.73
	3	16	7.83	0.304	8.47, 7.18
	4	16	10.35	0.367	11.13, 9.57
	5	16	14	0.516	15.10, 12.89
Dosis baja	1	16	6.26	0.227	6.75, 5.77
	2	16	6.69	0.210	7.14, 6.24
	3	16	8.51	0.311	9.18, 7.85
	4	16	11.11	0.454	12.08, 10.14
	5	16	14.78	0.553	15.96, 13.60
Grupo control	1	16	5.89	0.309	6.54, 5.23
	2	16	6.28	0.261	6.84, 5.73
	3	15	7.96	0.326	8.66, 7.25
	4	15	10.44	0.466	11.44, 9.43
	5	15	14.3	0.575	15.53, 13.06

n: tamaño de la muestra, EEM: Error estándar de la media, IC 95%: Intervalo de confianza del 95% de la media.



**Figura 20.** Promedios de peso corporal en cerdos York-Landrace tratados a dos diferentes dosis de DLEp. Las barras verticales corresponden a un error estándar de la media.

## Discusión

Los resultados del presente estudio, en el que se evaluó la respuesta inmunológica de cerdos destetados de 21 a 50 días de edad, tratados con siete dosis de extractos dializables porcinos por vía intradérmica, demostraron que la dosis alta (72.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  – 81.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) aumentó significativamente la concentración de interferón gamma sérico con respecto del grupo testigo.

En la literatura se encuentra que los extractos leucocitarios dializables estimulan tanto *in vitro* como *in vivo* la producción de IFN $\gamma$  e Interleucina 2, esta estimulación viene acompañada de concentraciones bajas de interleucina 4<sup>22 23 40</sup>.

Los hallazgos en la investigación del DLE, demuestran que éste estimula una inmunomodulación hacia un perfil de tipo Th1<sup>23 44</sup>. Los resultados de este estudio

concuerdan con esta premisa, pues observamos una modulación significativa de interferón gamma en el suero sanguíneo. Se sabe que la producción de IFN $\gamma$  es llevada a cabo por las células NK, células NKT, células dendríticas plasmocitoides, los linfocitos Th1 y linfocitos TCD8<sup>+</sup><sup>41</sup>. Se ha encontrado que el DLE posee la característica de estimular TLR 2<sup>45</sup>. Este receptor puede activarse por diversos componentes microbianos y desencadenar la síntesis de citocinas entre las que destacan: IL1, IL6, TNF $\alpha$  e IL12, esta última tiene la capacidad de estimular a las células NK y linfocitos Th1 para la producción de IFN $\gamma$ <sup>46</sup>. Es posible pensar que el DLEp utilizado en este trabajo, tuvo la capacidad de estimular por la vía de TLRs. Sin embargo, se sabe que el DLE tiene un efecto antígeno específico, por lo que también podría pensarse que el aumento en los niveles de IFN $\gamma$ , sea atribuible a la memoria inmunológica del animal del que procede el bazo.

Para poder conocer la ruta de producción del IFN $\gamma$  sería necesario observar en futuros estudios, el comportamiento de las distintas poblaciones celulares y su relación con la estimulación de receptores celulares y la transferencia de inmunidad celular.

Analizando los resultados de incidencias de signos respiratorios (figura 10) observamos que el aumento de IFN $\gamma$  se presenta después de registrarse un incremento en los cuadros respiratorios. Lo anterior podría sugerir que en este período del experimento, los animales estuvieron expuestos a una estimulación antigénica, que coincide con el decremento de la inmunidad pasiva obtenida del calostro. Lo anterior podría ser un factor determinante en la síntesis de IFN $\gamma$ , ya que sabemos que la estimulación antigénica en conjunto con el extracto leucocitario dializable puede inducir una respuesta de tipo Th1<sup>40 22</sup>. Este hallazgo

podría ser relevante en granjas dónde la presencia de enfermedades infecciosas sea alta, y el aumento significativo del IFN $\gamma$  pudiera jugar un papel relevante en el control de dichas infecciones. Cabe destacar que el experimento realizado en este trabajo se hizo en una granja con buenas medidas de bioseguridad y poca incidencia de enfermedades infecciosas, debido a que se trataba de un estudio piloto que pudiera orientarnos sobre los efectos moduladores del DLEp. Esta información puede ayudar a establecer las decisiones para hacer los protocolos de tratamiento en cerdos destetados.

Con respecto a TNF alfa, no se pudo demostrar ninguna modulación al estimular a los animales con el DLEp. Otros estudios realizados *in vitro* con células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con DLE bovino han logrado aumentar niveles de TNF $\alpha$ <sup>42</sup>. Sin embargo, las condiciones en un animal no pueden ser tan controladas, lo que podría explicar que en este estudio no se encontrara esta modulación. Revisando los resultados de los niveles de esta citocina en suero (figura 8), podemos observar que en el primer muestreo, el grupo testigo presentó un aumento en ésta, lo cual no era de esperarse pues cuando se realizó, todos los grupos estaban bajo las mismas condiciones experimentales (sin tratamiento alguno). Una explicación a lo anterior puede ser que el TNF $\alpha$  tiene un efecto pro inflamatorio, por lo que diversas condiciones, incluso algún traumatismo podrían haber aumentado los niveles de esta citocina en algunos cerdos. Por lo anterior, creemos que ésta no es un buen indicador de modulación en estudios *in vivo*. En los resultados del presente proyecto, no se encontró diferencia significativa en las cuentas leucocitarias de cerdos de 21 a 50 días de edad clínicamente sanos, tratados con siete dosis de DLEp por vía intradérmica, en comparación con el grupo de control.

Lo anterior difiere de lo reportado por Vacek, quien demuestra que los extractos leucocitarios dializables potencializan la proliferación de células hematopoyéticas progenitoras de granulocitos y macrófagos, al estimularlas en presencia de factor estimulador de colonias de granulocitos humano (G-CSF) y el aumento de cuentas celulares de aspirado de la medula ósea en ratones irradiados con rayos gamma<sup>47</sup>. Comparando este estudio con los resultados del presente trabajo, podemos pensar que la estimulación del DLE para aumentar las cuentas leucocitarias, se lleva a cabo en presencia de otros estimuladores de colonias o cuando hay situaciones que disminuyen los conteos leucocitarios, condición que en este estudio no se cumple. En este sentido, es importante señalar que si bien la literatura menciona una ventana inmunológica y período de susceptibilidad al destete,<sup>3 4 6</sup> los hallazgos del presente trabajo no coinciden con estos reportes; particularmente con lo descrito por González Vega, quien demuestra una disminución linfocitaria durante la cuarta y quinta semana de edad en los cerdos destetados, misma que en este estudio no se observó. Lo anterior sugiere que debe haber otros factores que desencadenen las patologías asociadas al destete.

Con respecto al estado clínico, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, lo cual podría explicarse por que en la granja hay una baja presencia de enfermedades en relación a otras explotaciones porcinas. Lo anterior se sustenta en el hecho de que la incidencia, tanto de signos respiratorios como de diarreas y fiebre a lo largo del experimento, fueron muy bajas. Como se mencionó anteriormente, los estudios en donde se demuestra una disminución en parámetros clínicos se han hecho con animales infectados experimentalmente. Esto sugiere la necesidad de repetir este estudio

en granjas con problemas importantes de salud o en algún modelo experimental con cerdos desafiados con un microorganismo.

Diversos estudios han demostrado que el DLE induce una inmunomodulación en animales estimulados antigénicamente, ya sea con una vacuna o un microorganismo<sup>47</sup>. EL presente trabajo realizó un estudio en el que los animales no fueron expuestos a ningún antígeno en forma controlada y demostró que aún en estas condiciones el DLEp tiene una acción inmunomoduladora. Estudios realizados en individuos sanos, demostraron que el DLE no altera sus parámetros clínicos normales pero que estimula poblaciones de linfocitos T cooperadores y de células NKT.<sup>48</sup>

La ganancia de peso no fue estadísticamente significativa entre los grupos tratados y el testigo, lo anterior se explica por el hecho de que no hubo animales cuya signología comprometiera su desempeño productivo.

## Conclusiones

La aplicación de siete dosis de DLEp por vía intradérmica en cerdos destetados aumentó significativamente la concentración de IFN $\gamma$  en el suero sanguíneo.

La aplicación de siete dosis de DLEp por vía intradérmica en cerdos destetados no aumentó significativamente las cuentas leucocitarias ni la concentración de TNF $\alpha$ .

La medición de TNF $\alpha$  no representó un estimador de la respuesta inmune confiable para estudios *in vivo*.

Se observó la Inmunomodulación producida por el DLEp aun en condiciones donde no se administran antígenos en forma controlada.

La aplicación de siete dosis de DLEp por vía intradérmica en cerdos destetados no produjo una diferencia significativa en la incidencia de cuadros respiratorios y diarréicos, ni una modificación en las ganancias de peso de los cerdos destetados.

## Anexos

### Anexo 1. Resultados de la prueba de endotoxinas bacterianas por la prueba de *limulus*



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATORIO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA TÉCNICA  
"F. ERNESTO FAVELA ALVAREZ"



#### INFORME DE RESULTADOS

N° INFORME: A-68-11  
Fecha de Informe: 04/02/11

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA  
DEPTO. AC/AREA DE LABORATORIO DE CALIDAD

Análisis efectuado en la muestra proporcionada por el Cliente con No. de Registro: 44-ID-11, recibida el 20/02/11.

Producto:	MUESTRA DE INVESTIGACION DEL PROYECTO FACTOR DE TRANSFERENCIA		
Concentración:	500 µg/mL	Forma Farmacéutica:	n.a.
Cantidad:	6 envases con 2 mL	N° Lote:	FBP19011110KDaC4
Fecha de Ensayo:	03/02/11	Fecha de Caducidad:	n.a.
Descripción:	Vial de vidrio con producto congelado.		

#### RESULTADOS

DETERMINACIÓN	RESULTADO
1. Endotoxinas bacterianas	Menos de 0,06 UE/mL Cumple con especificaciones

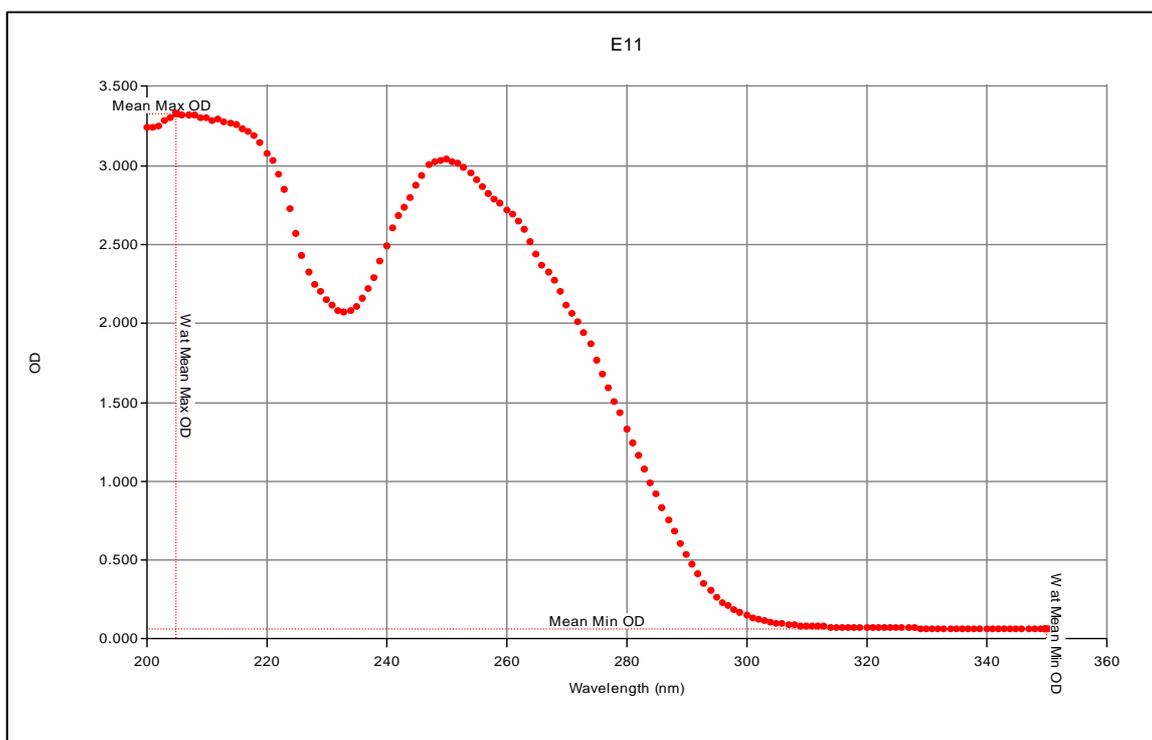
**BIBLIOGRAFÍA:** FEUM 9ª Edición 2008 Vol. I, págs. 321 - 325

AUTORIZADO POR:

QFI. FRANCISCO C. FERNÁNDEZ LÓPEZ  
JEFE DEL LABORATORIO

FIN DEL INFORME

Anexo 2. Huella espectrofotométrica UV del DLEp elaborado de bazo de cerda York-Landrace de tercer parto



Promedio mínimo de Densidad óptica [Espectro]	Longitud de onda al promedio mínimo de densidad óptica [Espectro]	Promedio máximo de Densidad óptica [Espectro]	Longitud de onda al promedio máximo de densidad óptica [Espectro]
0.063	350	3.326	205

### Anexo 3. Detalles de parámetros productivos de la granja

#### Detalles del Servicio

Servicios totales: 92

Retorno a servicios: (%) 8 (8.7%)

Total Montas: 194

Montas/Servicio: 2.1

#### Detalles del parto

Partos: 95

Total nacidos/camada: 1186 (12.5)

Nacidos vivos/camada: 1077 (11.3)

Nacidos vivos/cerda/año: 30.3

Nacidos vivos/hembra/año: 29.8

Tasa de parición: 85.8%

Índice de partos por año: 2.48

#### Detalles Bajas de Lechones

Total de bajas: 91 (8.4%)

Bajas de < 2 días edad: 37 (3.4%)

Bajas entre 2-8 días edad: 40 (3.7%)

Bajas de > 8 días edad: 14 (1.3%)

#### Detalles en Destete

Destetados/camada: 892

Destetados/cerda/año: 25.1

Anexo 4. Formato de monitoreo diario de los cerdos.

29 DE ENERO 11 MONITOREO DE LECHONES PROYECTO DLE

IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL	TEMPERATURA	OBSERVACIONES
1A1		
1A2		
1A3		
1A4		
1B1		
1B2		
1B3		
1B4		
1C1		
1C2		
1C3		
1C4		

Anexo 5. Formato de monitoreo del peso semanal.

21 DE FEBRERO 11 MONITOREO DE LECHONES PROYECTO DLE

IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL	PESO	TEMPERATURA	CC	OBSERVACIONES
1A1				
1A2				
1A3				
1A4				
1B1				
1B2				
1B3				
1B4				
1C1				
1C2				
1C3				
1C4				

## Referencias

- <sup>1</sup><http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2009-B106.aspx>
- <sup>2</sup>Banamex. Estructura y perspectivas de la cadena productiva porcícola. Boletín informativo de agro negocios y fondos de fomento subdirección de información y análisis sectorial de agro negocios. México.1997.
- <sup>3</sup>Wilson, MR. Immunologic development of the neonatal pig. *J. Anim Sci* 1974; 38:1018-1021.
- <sup>4</sup>Blecha F, Kelley KW. Effects of cold and weaning stressors on the antibody-mediated immune response of pigs. *J. Anim Sci* 1981; 53:440-447.
- <sup>5</sup>Blecha F, Pollmann DS, Nichols DA. Weaning pigs at an early age decreases cellular immunity. *J. Anim. Sci* 1983; 56:396-400.
- <sup>6</sup> González VD., Cisneros MI, Vega L .M.A., Morilla GA. Perfil Inmunológico del cerdo durante las primeras diez semanas de edad, *Vet. Mex* 1993; 24: 217-221.
- <sup>7</sup>BrithJH, Almond GW, Flowers WL, Disease of the reproductive system. In: Taylor JD, Barbara E, Straw EB, D' Allarie S, William L, Mangellin LW, Editors. *Diseases of swine 8<sup>th</sup> IOWA: IOWA STATE UNIVERSITY PRESS 2000: 883-912.*
- <sup>8</sup> Kim. SW, Osakal, Hurley WL., Easter RA. Mammary gland growth as influenced by litter size in lactating sows: impact of lysine requirement. *J Anim Sci* 1999; 77: 3316-3321.
- <sup>9</sup>Hessel EF, Reiner K S, Van Den Weghe. Socializing piglets before weaning: effects on behavior of lactating sows, pre and postweaning behavior, and performance of piglets. *J Anim Sci* 2006; 84: 2847-2855.
- <sup>10</sup>Worobec EK, Duncan IJH, Widowsky TM. The effects of weaning at 7, 14 and 28 days on piglet behavior. *Applied Animal Behavior Science* 1999; 62:173-182.
- <sup>11</sup>Landstainer K, Chase MW. Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. *Proc Soc Exp Biol Med* 1942; 49: 688-690.
- <sup>12</sup>Lawrence HS. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949; 71: 516-519.
- <sup>13</sup>Lawrence HS. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leukocytes. *J Clin Invest* 1955; 34:219.
- <sup>14</sup> Estrada-Parra S, Velasco—Castrejon O, Rébora F, Díaz ML, Padierna J. Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con factor de transferencia específico. *Salud Pública de México* 1983; 25:589-599.

- 
- <sup>15</sup>Wilson GB, Fudenberg HH. Is controversy about transfer factor therapy nearing an end?. *Immunol Today* 1983; 4: 157-161.
- <sup>16</sup>Borvak J, Mayer V, Moravek L. Amino acid analysis of selected reversed-phase high performance liquid chromatograph peaks of crude and partially purified lysed human leukocyte ultrafiltrate. *Acta Virol* 1990; 33:417-427.
- <sup>17</sup>Wilson GB, Fudenberg HH. Leukocyte migration inhibition as a method for assaying transfer factor activities. *Lymphokines Res* 1981; 4: 107-73.
- <sup>18</sup>Spitler LE, Levin AS, Stites DP, Fudenberg HH, Pirofsky B, August CS, Stiehm ER, Hitzig WH, Gatti RA. The Wiskott-Aldrich syndrome: results of transfer factor therapy. *J Clin Inv* 1972; 51: 3216-24.
- <sup>19</sup>Kirkpatrick CH, Rich RR, Smith TK. Effects of transfer factor on lymphocyte function in anergic patients. *J Clin Inv* 1972; 51: 2948-58.
- <sup>20</sup>Levin AS, Byers VS, Fudenberg HH, Wybran J, Hackett AJ, Johnston JO, Spitler LE. Osteogenic sarcoma: immunologic parameters before and during immunotherapy with tumor specific transfer factor. *J Clin Inv* 1975; 55: 487-99.
- <sup>21</sup>Alvarez-Thull L, Kirkpatrick CH. Profiles of cytokine production in recipients of transfer factors. *Biotherapy* 1996; 9:55-59.
- <sup>22</sup>Fabre RA, Pérez TM, Aguilar LD, Range MJ, Estrada-García I, Hernández-Pando R, Estrada-Parra S. Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 215-223.
- <sup>23</sup>Calzada NG. Uso en lechones de Factor de Transferencia y *Parapoxvirus* inactivado (*Baypamun*) en la vacunación contra la enfermedad de Aujeszky. (Tesis Grado Maestra en Ciencias con especialidad en Inmunología). DF México: IPN, 2000.
- <sup>24</sup>Wilson GB. De Novo initiation of specific cell-mediated immune responsiveness in chickens by transfer factor (specific immunity inducers) obtained from bovine colostrums and milk. *Acta Virol* 1988; 32: 6-18.
- <sup>25</sup>Karhumaki E, Marnela KM, Khron K. Chromatographic and enzymatic effects on transfer factor-like activity from human leukocyte and porcine spleen dialysate. *Int J Biochem* 1988; 20:1067-1072.
- <sup>26</sup>Padierna L, Godinez S, Díaz J, García E, Arguez MA, Velasco O, Padierna J, Estrada-Parra S. Factor de transferencia en pacientes con herpes zóster. *Infectología* 1985; 11:293-299.
- <sup>27</sup>Pizza G, Chiodo F, Colangeli V, Gritti F, Raise E, Fudenberg HH, De Vinci C, Viza D. Preliminary observations using HIV-specific transfer factor in AIDS. *Biotherapy* 1996; 9:41-7.

- 
- <sup>28</sup>Steele RW, Myers MG, Vincent MM. Transfer factor for the prevention of varicella-zoster infection in childhood leukemia. *N Engl J Med* 1980; 303:355-9.
- <sup>29</sup>Bullock WE, Fields JP, Brandriss MW. An evaluation of transfer factor as immunotherapy for patients with lepromatous leprosy. *N Engl J Med* 1972; 287:1053-1059.
- <sup>30</sup>Delgado O, Romano EL, Belfort E, Pifano F, Scorza JV, Rojas Z. Dialyzable leukocyte extract therapy in immunodepressed patients with cutaneous leishmaniasis. *Clin Immunol Immunopathol* 1981; 19:351-359.
- <sup>31</sup> Rojas BS. Uso de suero hiperinmune y del factor de transferencia para la prevención y tratamiento de la colibacilosis neonatal en lechones. (Tesis de licenciatura). DF México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1987.
- <sup>32</sup>Klesius PH, Giambrone JJ. Adoptive transfer of delayed hypersensitivity and protective immunity to *Eimeria tenella* with chicken-derived transfer factor. *Poult Sci* 1984; 63:1333-7.
- <sup>33</sup>Wilson GB, Fudenberg HH. Leukocyte migration inhibition as a method for assaying transfer factor activities. *Lymphokines Res* 1981; 4: 107-73.
- <sup>34</sup>Bravo-Blas A, Téllez R, Uribe S, Salmerón F, Valdés L, Estrada-Parra S, Cobos-Marín L. El factor de transferencia como inductor de la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-2 en pollos vacunados contra influenza aviar. *Arch. Med. Vet* 2010; 42: 67-71.
- <sup>35</sup>Mateos RA. Transfer factor immunotherapy in clinically sick lactating calves. *Vet. Mex* 1992; 23:4-8.
- <sup>36</sup>Kogut MH, Rothwell L, Kaiser P. Differential effects of age on chicken heterophil functional activation by recombinant chicken interleukin-2. *Dev Comp Immunol* 2002; 26: 817-830.
- <sup>37</sup>Min W, Lillehoj HS, Burnside J, Weining KC, Staeneli P, Zhujj. Adjuvant effects of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-15, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  4 and lymphotaction on DNA vaccination against *Eimeria acervulina*. *Vaccine* 2001; 20: 267-274.
- <sup>38</sup>Rabinovich NR; McInnes P, Klein D, Fentomlall B. Vaccine Technologies: View to the future. *Science* 1994:1401-1404.
- <sup>39</sup>Yilma T, Owens S, Fennie EH, Anderson KP. Enhancement of primary and secondary immune responses by interferon-gamma. *Adv Med Exp Biol* 1989; 251:145-152.
- <sup>40</sup>Uribe S, Inducción de la expresión de citocinas por el factor de transferencia aviar en células mononucleares de sangre periférica de gallinas domésticas (Tesis de licenciatura) DF México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM 2007.

---

<sup>41</sup> Abbas A. K., Litchman A. H. Inmunología Celular y Molecular, 5<sup>a</sup> ed. Madrid España:Elsevier, 2004, 268-269.

<sup>42</sup> Avalos H, Obtención y caracterización de extractos dializables leucocitarios de origen bovino (tesis de maestría) DF México IPN 2008.

<sup>43</sup> Gould MJ. Limulus Amebocyte Lysate assays and filters applications. In: Meltzer TH, Jornitz MW, editors. Filtration in the Biopharmaceutical Industry. New York: Marcel Dekker; 1998: 605-18.

<sup>44</sup> Ortiz AL, Rojas FI, Nuñez G, Rodríguez FA, Estrada-Parra S, Uso de factor de transferencia como alternativa de tratamiento en lesiones persistentes de infecciones por el virus del papiloma humano (IVPH), 1er encuentro internacional sobre factor de transferencia "Sherwood Lawrence", IPN, México, DF, 2006.

<sup>45</sup> Robledo-Avila FH, Pérez-Tapia SM, Wong-Baeza I, Isibasi-Araujo A, Estrada-García I, Estrada-Parra S, Estudio de la presencia de ligandos para TLR2 y TLR4 en el DLE humano, memorias de 1er encuentro internacional sobre factor de transferencia "Sherwood Lawrence"; 2006 DF, México IPN.

<sup>46</sup> Abbas A. K., Litchman A. H. Inmunología Celular y Molecular, 5<sup>a</sup> ed. Madrid España Elsevier, 2004, 255-257.

<sup>47</sup> Vacek A, Hoffer M. Schaiderove H, Sovoboda J. Ultrafiltered pig leukocyte extract (UPL E INMUNOR) potentiates hematopoiesis stimulating effects of G-CSF *in vitro* and improves the outcome of treatment of hematopoietic radiation damage in mice with G-CSF. Immunopharmacology and Immunotoxicology 2005;27: 647-659.

<sup>48</sup> Rodríguez F.A. Evaluación clínica e inmunológica de individuos sanos que recibieron Extracto Leucocitario Dializable (EDL) humano por vía oral (Tesis de maestría QFI). DF México: Escuela nacional de ciencias biológicas, Instituto Politécnico Nacional, 2004.