



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**“EFECTO DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA OBTENIDO DE BAZO DE CERDO  
(FTb), EN LAS POBLACIONES CELULARES DEL BAZO EN MODELO MURINO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICA BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**BIBIANA CERVANTES TREJO**

**ASESOR: Dr. En C. ANDRES ROMERO ROJAS**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO. 2019**



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

### *Gracias:*

*A mi Mami Angélica porque gracias a tu cariño guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes en mi vida fruto del inmenso amor y confianza que en mi depositaste.*

*A los amores de mi vida mi esposo Luis y mis hermosos hijos que me han alentado a llegar aquí haciéndome mejor persona cada día. Los Amo.*

*A mis hermanos Jaqueline, Eduardo y Miguel por el apoyo incondicional, sin ustedes esto no sería posible.*

*A mi Papa y a Jessica por su enorme apoyo y cariño gracias.*

*A todos mis profesores quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede darse a un alumno, quien sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme por esto y más gracias por el conocimiento transmitido.*

*A mis Queridos profesores Paola, Ladislao, Salvador y Erik, gracias por ayudarme a llegar al final del camino.*

*A mi querido profesor Andrés Romero por su paciencia y fe en mí.*

*A el profesor Julius gracias por creer en mí y echarme porras siempre.*

*A mis amigas Montse, Vero, y Karina que siempre estuvieron ahí y aunque ahora tomemos caminos diferentes, seremos amigas por siempre.*

*Por último, a mi Hermosa UNAM que hoy me enorgullece en lo profundo de mi alma mi sangre siempre será azul y te llevare en mi corazón toda mi vida.*

*Mi FES CUAUTITLAN que siempre formare parte de ti.*

# Índice

Índice de figuras.....	III
Índice de tablas.....	IV
Abreviaturas.....	V
Resumen .....	VI
<b>1. Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
1.1 Inmunidad innata .....	2
1.2 Inmunidad adquirida .....	5
<b>2. Introducción.....</b>	<b>9</b>
2.1 Generalidades del factor de transferencia .....	9
2.1.1 Factor de Transferencia .....	9
2.1.2 Estructura del FT .....	9
2.1.3 Mecanismo de acción del FT .....	9
2.2 Fuentes de obtención del FT.....	10
<b>3. Los residuos de rastros en México .....</b>	<b>11</b>
3.1 El bazo de cerdo un desecho que puede utilizarse con fines terapéuticos .....	12
3.2 Histología del Bazo de cerdo .....	12
3.3 Pulpa blanca .....	13
3.4 Pulpa roja.....	14
3.5 Zona marginal.....	16
<b>4. Justificación .....</b>	<b>17</b>
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>18</b>
<b>6. Objetivos .....</b>	<b>19</b>
6.1 Objetivo general .....	19
6.2 Objetivos particulares .....	19
<b>7. Materiales y métodos.....</b>	<b>20</b>
7.1 Recolección y procesamiento del bazo de cerdo .....	20
7.2 Cuantificación de leucocitos en cámara de Neubauer.....	20

7.3 Rompimiento celular y obtención de FTb.....	20
7.4 Diálisis.....	21
8. Estudios de composición bioquímica.....	22
8.1 Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.....	22
8.2 Cuantificación de carbohidratos por el método de ácido sulfúrico.....	22
8.3 Estudios de actividad biológica.....	23
8.3.1 Prueba inoculación en modelo murino.....	23
8.3.2. Método.....	23
8.3.3. Técnica.....	24
9. Resultados.....	26
9.1 Conteo celular para evaluar la presencia de población leucocitaria.....	26
9.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	26
9.3 Cuantificación de carbohidratos por el método de ácido sulfúrico.....	27
9.4 Resultados de la actividad biológica.....	28
10. Discusión.....	33
11. Conclusiones.....	36
12. Referencias.....	37

## Índice de figuras

Figura 1. <b>Proceso de inmunidad innata</b> .....	5
Figura 2. <b>Linfocitos T y B en el funcionamiento del sistema inmune</b> .....	7
Figura 3. <b>Células de la inmunidad adaptativa</b> .....	8
Figura 4. <b>Imagen de bazo con coloración con H-E a 50 X</b> .....	14
Figura 5. <b>Porción de pulpa blanca y roja en tinción hematoxilina-eosina 4X</b> .....	15
Figura 6. <b>Corte histológico del bazo de cerdo 100X</b> .....	16
Figura 7. <b>Congelación de los bazos de cerdo.</b> .....	21
Figura 8. <b>Diálisis de bazo de cerdo</b> .....	21
Figura 9. <b>Método de inoculación de ratas Wistar</b> .....	23
Figura 10. <b>Vía de inoculación de ratas Wistar</b> .....	24
Figura 11. <b>Diagrama de flujo de la metodología para la obtención y prueba del FTb.</b> .....	25
Figura 12. <b>Curva patrón con albumina de concentración conocida (1mg/mL)</b> .....	26
Figura 13. <b>Curva de carbohidratos</b> .....	27
Figura 14. <b>Prueba t-student de informe de resumen</b> .....	29
Figuras 15. <b>Prueba t-student de informe de diagnóstico</b> .....	30
Figura 16. <b>Grafica de caja respuesta</b> .....	31
Figura 17. <b>Grafica de puntos de respuesta</b> .....	31
Figura 18. <b>Grafica del histograma de respuesta normal</b> .....	32

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Conteo celular en cámara Neubauer. ....	20
<b>Tabla 2.</b> Cuantificación de proteínas.....	26
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación de carbohidratos.....	27
<b>Tabla 4.</b> Determinación de lípidos. ....	28
<b>Tabla 5.</b> Determinación de ácidos nucleicos.....	28
<b>Tabla 6.</b> Grupos de control.....	28
<b>Tabla 7.</b> Grupos experimentales.....	28

## Abreviaturas

C5	Factor 5 del complemento
CD4 <sup>+</sup>	Linfocito T CD4 <sup>+</sup>
CD40	Proteína coestimuladora CD40
CD40L	Ligando de CD40
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTH	Hipersensibilidad cutánea tardía
EDL	Extracto dializable de leucocito
FT	Factor de transferencia
FTb	Factor de transferencia de bazo
GDP	Guanosin difosfato
GTP	Guanosin trifosfato
G $\alpha$	Proteína G alfa
H-E	Hematoxilina-Eosina
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL	Interleucina
kDa	Kilodaltons
LFA-1	Antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos
LPAM-1	Integrina alfa 4 beta 7
LTB4	Leucotrieno B4
MAC-1	Antígeno macrófago
NaCl	Cloruro de sodio
NK	Células asesinas naturales (del inglés natural.)
PAF	Platelet-activating factor
PGe	Prostaglandinas
PKC	Proteincinasa C
PPD	Proteico purificado de Mycobacterium tuberculosis
RNA	Ácido ribonucleico
SSF	Solución salina fisiológica
TNF	Factor de necrosis tumoral
VLA-4	Integrina alfa 4
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma



## Resumen

El FT es un extracto dializado de leucocitos descubierto por el Doctor Henry Sherwood Lawrence en 1949. En la actualidad por su modo de acción y tamaño molecular es posible distinguir dos actividades del FT: Una llamada no específica que incrementa las actividades del sistema inmunológico como un inmunomodulador y otra llamada específica que como su nombre lo indica solo aumentan la respuesta contra un antígeno determinado. Esta última fue reportado por primera vez en 1983 por H. S. Lawrence. Después se reportó que tiene la capacidad de unirse al antígeno que les dio origen y recientemente ha sido caracterizada como un conjunto de polipéptidos con un peso molecular de alrededor de 3 500 a 12 000 Da. Esta fracción es la responsable por ejemplo de transferir la inmunidad de un sujeto sano a tuberculina positivo a un enfermo con tuberculosis y tener un efecto terapéutico muy importante.

El FT, aunque descubierto en 1954, se empezó a utilizar importantemente, con fines terapéuticos hasta fines de los sesentas y principios de los ochentas.

El FT tiene muchas ventajas sobre otros modificadores de la respuesta inmune o inmunomoduladores, entre otras su relativa facilidad para prepararlo, por ser dializable el no poder llevar ni microorganismos ni antígenos de histocompatibilidad y sobre todo el prácticamente no tener efectos secundarios. La obtención de FT se hace a partir de leucocitos de sangre periférica, que generalmente son un desecho de los bancos de sangre, estos son rotos por congelación y descongelación, enseguida se colocan en una bolsa de diálisis (que excluye moléculas mayores de 10-12 kDa). Y el material que sale de la bolsa es el FT. Este puede conservarse a menos -20 °C por varios años o si se liofiliza puede guardarse, sin que pierda su actividad. Por todo lo anterior

el factor de transferencia se puede considerar como el inmunomodulador de bajo costo y con potencial de crecimiento en los países emergentes.

Así pues de acuerdo con los lineamientos establecidos para la obtención del FT a partir de sangre y calostro bovino, se planteó un protocolo para la obtención de FT a partir de bazo de cerdo. Se obtuvo un EDL a partir de dos bazos de cerdo obtenidos de un rastro, posteriormente se realizó la determinación de proteínas totales por el método de Bradford. Para comprobar que en la fracción obtenida había FT y que transferían inmunidad. Se realizó la inoculación a 5 ratas con FTb y 3 ratas control con SSF durante un mes, se sacrificaron las ratas y se extrajo el bazo y se realizó conteo celular.

## 1. Antecedentes

Han pasado más de 60 años desde que el Dr. H.S. Lawrence informó por primera vez que era posible transferir hipersensibilidad de tipo retardada de donantes sensibilizados a receptores no sensibilizados con lisados de leucocitos sanguíneos. Durante los últimos años la investigación de varios laboratorios ha demostrado que este efecto es inmunológicamente específico. Aunque las moléculas que poseen esta actividad no se han caracterizado completamente, existe un cuerpo significativo de evidencia que son polipéptidos pequeños y que pueden interactuar con moléculas de antígeno de una manera inmunológicamente específica (Kirkpatrick, 2000).

Los estudios con respuestas inmunes que están bajo control genético han demostrado que la capacidad de un animal para producir el FT está regulada genéticamente pero que la transferencia de hipersensibilidad retardada con FT no está genéticamente restringida. De hecho cuando se administran ratones de fenotipos de respuesta baja a FT de donantes de alta respuesta, expresan respuestas de hipersensibilidad retardada que son comparables a las respuestas altas. Los estudios clínicos han demostrado que el FT es un método eficaz para la inmunoterapia de ciertas infecciones virales y fúngicas (Kirkpatrick, 2000).

En el año de 1955 el Dr. H. S. Lawrence transfieren DTH empleando extractos solubles de leucocitos, al componente activo de estos extractos se le llamó FT (Fundenberg, 1989).

En el año de 1961 Jensen demostró que la inmunidad de un individuo con intradermorreacción positiva a tuberculina, podía ser transferida por EDL a otro individuo que era negativo a tuberculina y este individuo que ahora era positivo, también podía transferir la respuesta a otro individuo negativo, hacerlo positivo y así sucesivamente, sugiriendo que el FT se encontraba libre de antígeno (Lawrence & Borkowsky, 1983).

En el año de 1963 el Dr. H. S. Lawrence con sus experimentos demostraron que el extracto dializable de leucocitos era capaz de pasar por una membrana de diálisis de corte de 10 kDa sin perder su actividad biológica (Fundenberg, 1989).

A inicios de la década de los 80, el Dr. Borkowsky demuestra que los FT obtenidos dentro de los extractos eran capaces de unirse específicamente al antígeno que les da origen, pero no así a los anticuerpos contra el mismo antígeno (Kirkpatrick, 2000).

En el año de 1985 el Dr. C. H. Kirkpatrick realizó un estudio de DTH, empleando antígenos sintéticos para inmunizar ratones y obtener EDL, al igual que Petersen lo hizo con antígenos como PPD y ferritina. Los animales solo presentaron una DTH positiva con el antígeno con el cual el donador había sido inmunizado. El Dr. C. H. Kirkpatrick comprobó que la especificidad de una intradermorreacción podía ser transferida por EDL y afirmó que se trata de eventos inmunológico específicos. Utilizando ratones inoculados con un antígeno, los ratones receptores solo respondieron a ese antígeno específico (Kirkpatrick, 2000).

## **1.1 Inmunidad innata**

El sistema inmunitario innato consiste en barreras epiteliales, células circulantes y proteínas que reconocen microbios o sustancias producidas en infecciones, o daño a tejidos y esto inicia respuestas para eliminar a los agentes invasores (Roitt, 2003).

Este sistema comienza con el proceso inflamatorio, generalmente inicia cuando el complemento es activado, las células cebadas degranuladas y los macrófagos de tejidos activados. El daño tisular recluta los sistemas no inmunitarios, como el de coagulación con producción de bradicinina, un vasodilatador potente. En la inmunidad innata, las células efectoras principales son

neutrófilos, fagocitos mononucleares y células NK. Estas células atacan microorganismos que han logrado penetrar las barreras epiteliales y entrar a los tejidos o la circulación (Barret, 1990)

En respuesta a los microbios cada uno de estos tipos celulares tiene una función distinta. Algunas de las células particularmente los macrófagos y las células NK, secretan citocinas que atraen y activan a los fagocitos y estimulan la respuesta celular de la inmunidad innata, denominada inflamación. La inflamación es el reclutamiento de leucocitos hacia sitios de infección y su impulso, con el propósito de eliminar al agente infeccioso, esta reacción puede también dañar tejido normal cuando es descontrolada, constante o crónica (Roitt, 2003).

Los microorganismos que acceden a la circulación, son combatidos por varias proteínas del plasma. En la inmunidad innata, las proteínas circulantes principales forman parte de **a)** el sistema del complemento; **b)** colecitinas, familia de proteínas; entre ellas la lectina que enlaza mánanos, que se caracterizan por la presencia de un dominio de tipo colágena y otro de lectina, y que pueden activar al sistema del complemento por enlace del **c)** pentraxinas, familia de proteínas del plasma que contienen cinco subunidades globulares idénticas, entre ellas la proteína C reactiva y **d)** sistema de coagulación (Bach, 1984).

Los fagocitos reconocen a los productos microbianos y algunos mediadores originados en respuesta a la infección, a través de receptores transmembrana con siete hélices  $\alpha$ , que funcionan principalmente para estimular la migración de leucocitos hacia sitios de infección; se les encuentra en neutrófilos macrófagos y la mayoría de los otros leucocitos. Los receptores de esta clase identifican péptidos cortos que contienen residuos de N-formilmetionil, presentes en proteínas bacterianas y algunas de mamíferos sintetizadas solamente dentro de la mitocondria, lo que permite a los neutrófilos determinar y responder a estas proteínas bacterianas. Los neutrófilos y en menor proporción los macrófagos, expresan también receptores transmembrana con siete hélices  $\alpha$ , que

reaccionan con ciertas quimiocinas, especialmente IL-8: péptidos generados cuando el complemento es activado, como el C5a, y una variedad de lípidos mediadores de la inflamación, entre ellos PAF, PGe, y LTB4 (Roitt, 2003).

El enlace de ligandos como los productos microbianos y quimiocinas, a los receptores transmembrana con siete hélices  $\alpha$  induce la migración de las células de la sangre a través del endotelio y producción de sustancias microbicidas por estimulación de la intensificación súbita. Los receptores inician respuestas intracelulares asociados con proteínas G que enlazan GTP trimérico que consiste de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ . En células en reposo, las proteínas G unidas al receptor forman un complejo inactivo estable que contiene GDP y subunidades  $G\alpha$ . La ocupación del receptor por el ligando resulta en un intercambio de GTP a GDP y dímeros  $G\beta\gamma$ . Tanto la  $G\alpha$ GTP como la  $G\beta\gamma$  son activadores alostéricos de varias enzimas, entre ellas la  $\beta$  isoforma de la Fosfolipasa C específica del fosfatidilinositol en trifosfato de inositol y diacilglicerol, ocasionando incremento en la estimulación de PKC (Roitt, 2003).

Esta última aumenta la avidéz de las integrinas leucocitarias LFA-1 y MAC-1 por su ligando, la molécula ICAM1 presente sobre el endotelio. Las proteínas G triméricas excitan también proteínas G pequeñas de la familia *Rho* que promueven cambios en la actinmiosina (actina y miosina) del citoesqueleto y la difusión celular (Barret, 1990)

En general la respuesta inflamatoria es la reacción local temprana de la inmunidad innata, en donde los leucocitos son incorporados al sitio de infección y activados para erradicarla. La función de la inflamación es destruir los microorganismos invasores trayendo al tejido infectado células efectoras activadas en contacto con los agentes invasores (Barret, 1990)

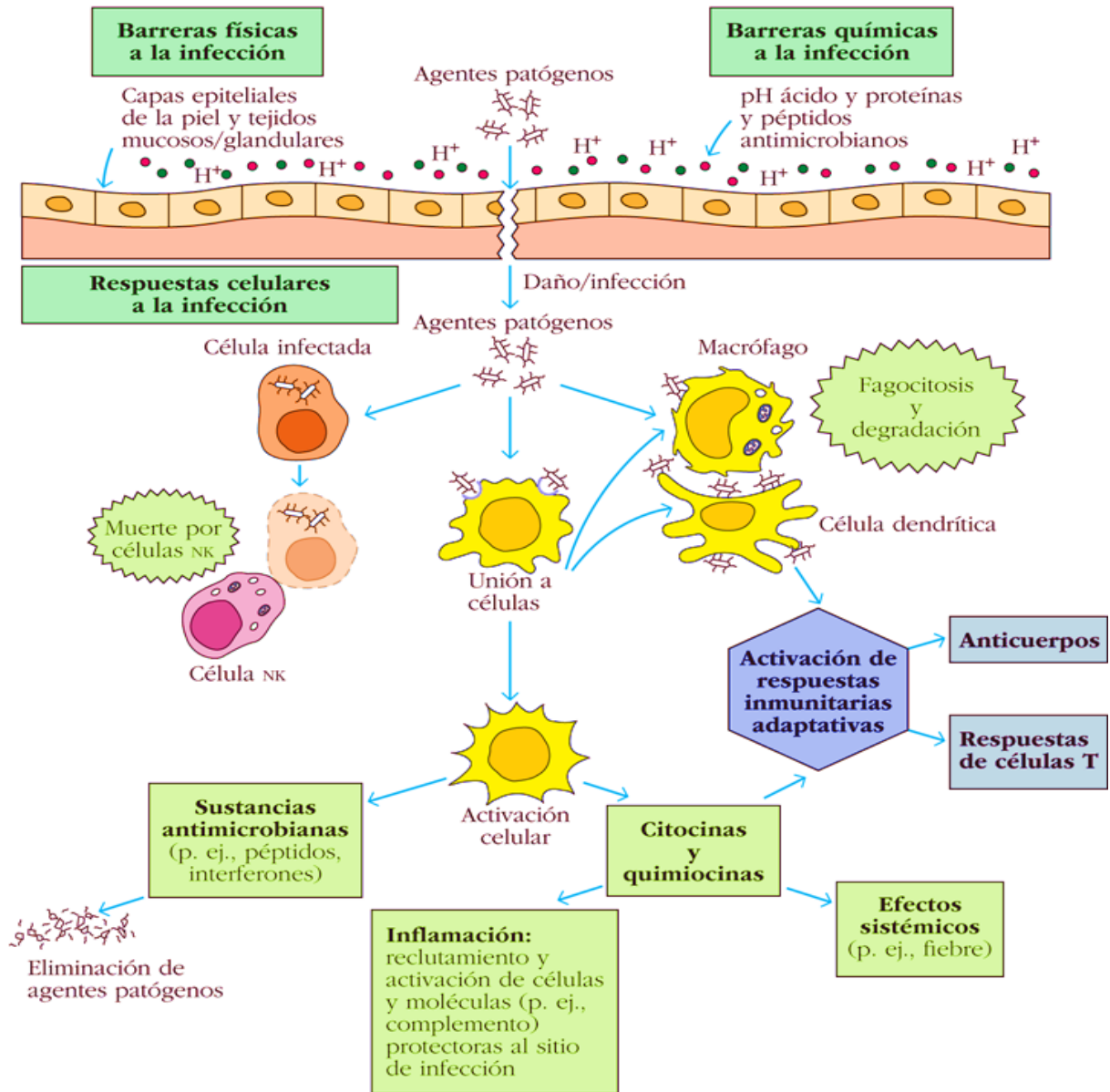


Figura 1. Proceso de inmunidad innata (Tomado de: Owen, Punt, & Stranford, 2016).

## 1.2 Inmunidad adquirida

La inmunidad innata proporciona señales que funcionan en conjunto con el antígeno para iniciar la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B antígeno específicos. Las señales para la activación de linfocitos son dos. La señal 1 es la que suministra el antígeno, mientras que la 2 es

el producto de un microbio o un componente de la respuesta inmunitaria innata que identifica al antígeno como un producto microbiano, es decir la inmunidad innata sirve como la señal inicial de alarma para que el sistema inmunitario adquirido despliegue una respuesta específica. Las moléculas formadas durante las reacciones inmunitarias innatas que actúan como segundas señales para la excitación de linfocitos son coestimuladores, citocinas, y productos de degradación del complemento (Bach, 1984).

La segunda señal generada durante las respuestas inmunitarias innatas a diferentes microbios no solamente aumenta la magnitud, sino que también influyen en la naturaleza de la respuesta inmunitaria adquirida posteriormente (Roitt, 2003).

La inmunidad adquirida se refiere a la respuesta inmunitaria en donde participan, con funciones muy importantes, los linfocitos T, B o sus efectores. En los tejidos linfoides secundarios, la primera exposición a un antígeno ocasiona la diferenciación de los linfocitos T  $CD4^+$  y B, a células efectoras. Después de la resolución de una infección, la mayoría de los linfocitos T, B mueren; pero algunas se vuelven células de memoria y recirculan en la fase de vigilancia inmunitaria. En el sitio de infección, los linfocitos son activados en presencia del antígeno que desencadenó la diferenciación inicial de estas células (Bach, 1984).

Durante la inflamación, el proceso de rodamiento, adhesión y diapédesis de los linfocitos T tiene lugar en varias etapas. Las desigualdades en el reclutamiento de linfocitos T activada, en comparación con el de monocitos y neutrófilos al sitio de inflamación, puede explicarse en términos de las moléculas de adhesión, o de sus contramoléculas, usadas en la formación de conjugados celulares leucocito/endotelio estables. En particular los linfocitos incitados y de memoria expresan concentraciones altas de integrinas, moléculas de adhesión de linfocitos de las placas de peyer (LPAM), y VLA-4 (Bach, 1984).



El curso de la inflamación es determinado por el fenotipo de las células TH generadas en respuesta al antígeno, las células TH1 secretan citocinas de tipo I (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF) que aumentan la respuesta inflamatoria. El IFN- $\gamma$  es un activador potente de macrófagos que ocasiona tanto el incremento de la fagocitosis como el de los mediadores de la inflamación y la liberación de citocinas. Se ha postulado que la interacción de la molécula CD40 presente en macrófagos y su ligando CD40L en los linfocitos T, conduce a la excitación de macrófagos, basados en que el IFN- $\gamma$  induce la expresión de CD40 sobre monocitos: Los linfocitos T estimulados exteriorizan CD40L, y los macrófagos son acelerados con CD40L soluble (Bach, 1984).

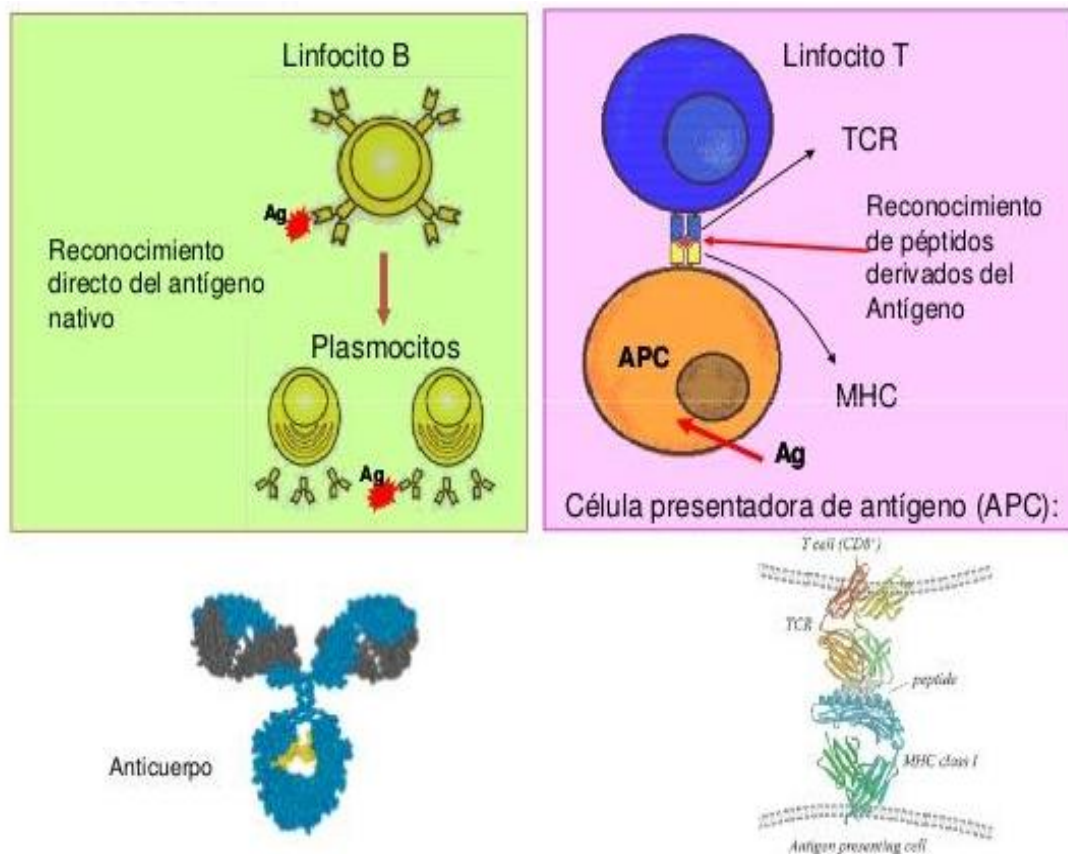


Figura 2. Linfocitos T y B en el funcionamiento del sistema inmune (Tomado de: Owen, Punt, & Stranford, 2016).

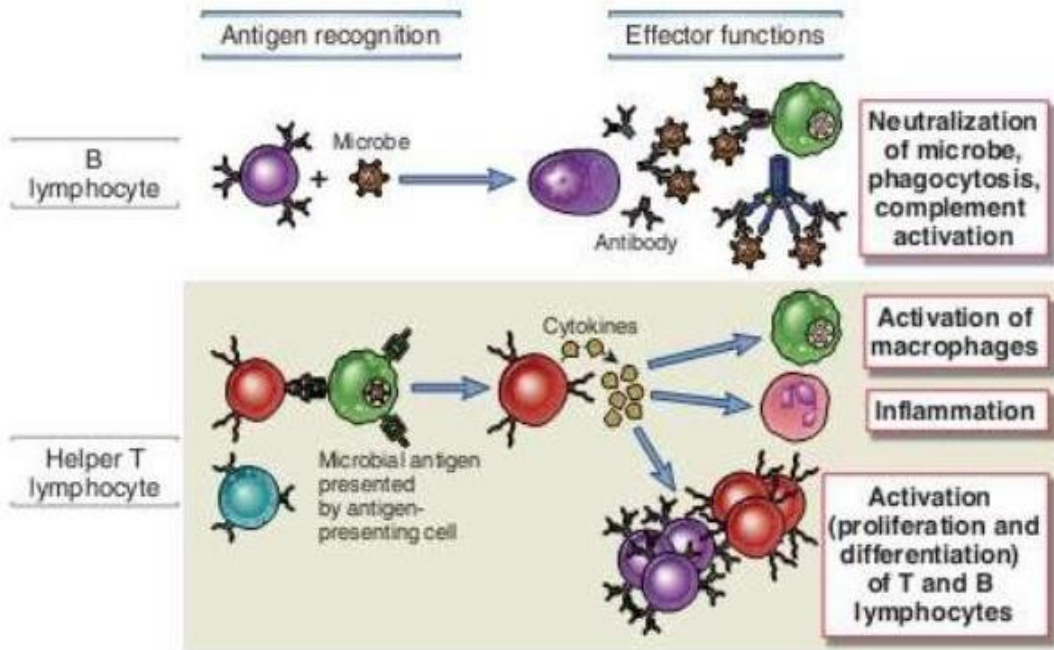


Figura 3. Células de la inmunidad adaptativa (Tomado de: Owen, Punt, & Stranford, 2016).

## **2. Introducción**

### **2.1 Generalidades del factor de transferencia**

#### **2.1.1 Factor de Transferencia**

Los FT de origen murino, bovino o humano son péptidos con un peso molecular menor de 3 500 y 12 000 Da, muy estables a bajas temperaturas, la actividad biológica se mantiene aún después de muchos años a temperatura entre -20 y -70 °C (Kirkpatrick, 2000).

#### **2.1.2 Estructura del FT**

Gottlieb postuló que el FT consiste en 12 aminoácidos y un oligonucleótido. Con absorbancias de 254/260 nm a 280 nm. La actividad del factor de transferencia es descrita como un polipéptido y es sensible a la proteasa (Fundenberg, 1989).

Se cree que contienen proteínas y RNA, pero no DNA. El hecho de que sean pequeños, hace que no ocasionen alergias y permite que conserven su máxima eficacia (Fundenberg, 1989).

Las moléculas del factor de transferencia son polares en su forma nativa. Además las actividades de las moléculas de factor de transferencia se mantienen a temperaturas mayores de 56 °C pero no a 75 °C por 30 minutos y exposiciones breves a 95 % de etanol. Son resistentes a desoxirribonucleicas, ribonucleasas y digestión de la tripsina, además poseen un pico cromatográfico mostrando mejores absorbancias a 260 nm y a 280 nm (Cabezas, et, Al. 2001).

#### **2.1.3 Mecanismo de acción del FT**

Lawrence propuso en 1969 que el FT podría desbloquear o deprimir poblaciones de linfocitos T responsables de la inmunidad celular y por lo tanto modular la misma (Kirkpatrick, 2000)

Álvarez y Kirkpatrick en 1995 propusieron que la polarización hacia la respuesta tipo TH1 se debe a la inhibición o supresión de las respuestas de tipo TH2 (Kirkpatrick, 2000)

En el año 2000 la Dra. Iris Estrada García junto con la Dra. Mayra Pérez Tapia estudian el efecto de la osteopontina (una quimiocina) y hacen estudios sobre biología molecular, observando que el factor de transferencia aumenta la producción de interferón (Cabezas, et, Al. 2001).

## **2.2 Fuentes de obtención del FT**

El factor de transferencia puede obtenerse de leucocitos de sangre periférica, de linfonodos de bovinos, bazo y placenta de diferentes especies como ratones, ratas, cobayos, burros, vacas, cabras, caballos, perros, gatos, cerdos, primates y otras especies con el hombre (Cabezas, et, Al. 2001).

En la actualidad se buscan otras fuentes de obtención que convengan como en el caso de bazo de cerdo ya que este se obtiene por un muy bajo costo en los rastros donde generalmente es desechado (Cabezas, et, Al. 2001).

### **3. Los residuos de rastros en México**

Los rastros y mataderos municipales tienen un gran impacto ambiental negativo en la mayoría de las localidades donde se asientan. Los residuos sólidos y líquidos son dispuestos de forma errónea e insalubre en el drenaje y los cuerpos de agua. Actualmente, la disposición final de los residuos en estos establecimientos tiene un impacto adverso en la biodiversidad local y en el agua con consecuencias directas e indirectas en la salud pública (Bonilla, Enero 2017).

Los residuos de los rastros no son basura de la cual debemos deshacernos rápidamente sino que son recursos que pueden tener un uso y aprovechamiento. Para lograr esto último es indispensable, primeramente, recuperar y separar los residuos de manera integral para poder manejarlos de la manera más adecuada y fácil. Lo más importante es evitar al máximo la disposición de residuos en el drenaje o cuerpos de agua ya que el tratamiento posterior resulta muy costoso y se aumentan los riesgos a la salud de la población (Bonilla, 2017).

Los residuos sólidos y líquidos son vertidos, casi en la totalidad de los rastros, en el drenaje o cuerpos de agua. Esta situación representa, además del evidente daño ambiental, un gran desperdicio de recursos que pueden ser empleados en diversas actividades y bien pueden ser considerados como un subproducto de la matanza. Esto significa que se requiere un cambio de paradigma hacia uno con visión ambientalista en el que se entienda que los residuos no son algo de lo que nos tenemos que deshacer inmediatamente sino que son recursos que podemos y debemos aprovechar. Al mismo tiempo, disminuimos la contaminación de la naturaleza y prevenimos riesgos a la salud humana directa o indirectamente (Bonilla, 2017).

La recuperación y separación de los residuos de manera integral en el rastro es esencial, primeramente para valorarlos como un subproducto y poderlos utilizar en otras actividades como la elaboración de harinas y alimentos, compostaje o, incluso, generación de energía.

Posteriormente, al separar los residuos se facilita el tratamiento del agua residual que se debe realizar para cumplir con la normatividad en la materia (NOM-001-ECOL-1996 y NOM-002-ECOL-1996) y con ello también evitar la contaminación de cuerpos de agua que abastecen a la población (Bonilla, 2017).

Es importante resaltar que no existen fórmulas o recetas probadas para todos los rastros respecto al manejo de sus residuos y que cada uno deberá encontrar las medidas de manejo más convenientes que permitan cumplir con la legislación ambiental, proteger la salud pública y aprovechar los residuos (Bonilla, 2017).

### **3.1 El bazo de cerdo un desecho que puede utilizarse con fines terapéuticos**

La recuperación y separación de los residuos de manera integral en el rastro es esencial, para valorarlos como un subproducto y poderlos utilizar en otras actividades como la elaboración de harinas y alimentos, compostaje o, incluso como se plantea en el siguiente trabajo en la elaboración de un producto con fin terapéutico como lo es el factor de transferencia.

Cabe recordar que como se mencionó anteriormente este órgano se desecha en todos los rastros, sabemos que esta es una fuente importante de leucocitos que debe ser aprovechada y al mismo tiempo evitar la contaminación del medio ambiente.

### **3.2 Histología del Bazo de cerdo**

Órgano linfoide secundario parenquimatoso, de mayor tamaño, interpuesto en la circulación sanguínea, por lo que su principal función es filtrar la sangre y elaborar una respuesta inmune específica frente a los antígenos por ella vehiculados, pero además, tiene otras funciones como almacenamiento de sangre (principalmente eritrocitos y plaquetas), retención de células de

morfología anormal. La cápsula está compuesta de tejido conectivo fibroelástico denso y fibras musculares lisas, de la que parten trabéculas hacia el interior del parénquima. La cápsula y las trabéculas son particularmente gruesas en algunas especies como el caballo, rumiantes y cerdo. El parénquima está compuesto por dos zonas diferentes denominadas pulpa blanca y pulpa roja, debido al predominio de linfocitos y eritrocitos, respectivamente, por lo que microscópicamente la primera aparece teñida con los colorantes básicos y la segunda con los colorantes ácidos, existiendo un área de transición entre ambas denominada zona marginal (Bernabé, Navarro, & Pallares, 1999).

### **3.3 Pulpa blanca**

Está formada por tejido linfoide difuso y folicular asociado a las ramificaciones de la arteria esplénica, que desde las trabéculas penetran en el parénquima. El tejido linfoide difuso se dispone rodeando a las arteriolas constituyendo las vainas linfáticas periarteriales, que se corresponden con las áreas de linfocitos T del bazo en un entramado de células dendríticas foliculares y células dendríticas interdigitadas (son células presentadoras de antígenos). Incluidos o adyacentes a estas vainas aparecen folículos linfoides que se corresponden con las áreas B. Conforme las arteriolas se ramifican la vaina linfática periarterial es más delgada, hasta que bruscamente la arteriola se ramifica en 4-6 vasos denominados arterias penicilias. Cada una de ellas origina 2-3 capilares en la pulpa roja. En algunas especies, algunos de estos capilares presentan un engrosamiento elipsoide de la pared por la presencia de macrófagos y células reticulares que los envuelven, por lo que se les denomina capilares envainados (Bernabé, Navarro, & Pallares, 1999).

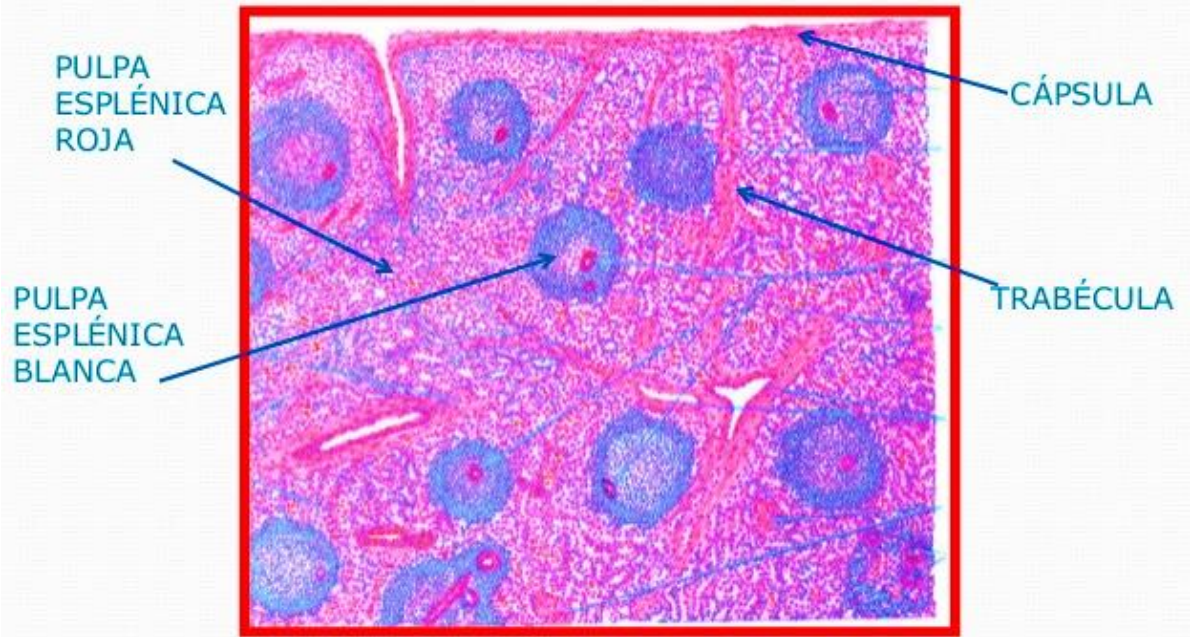


Figura 4. Imagen de bazo con coloración con H-E a 50 X (Owen, Punt, & Stranford, 2016).

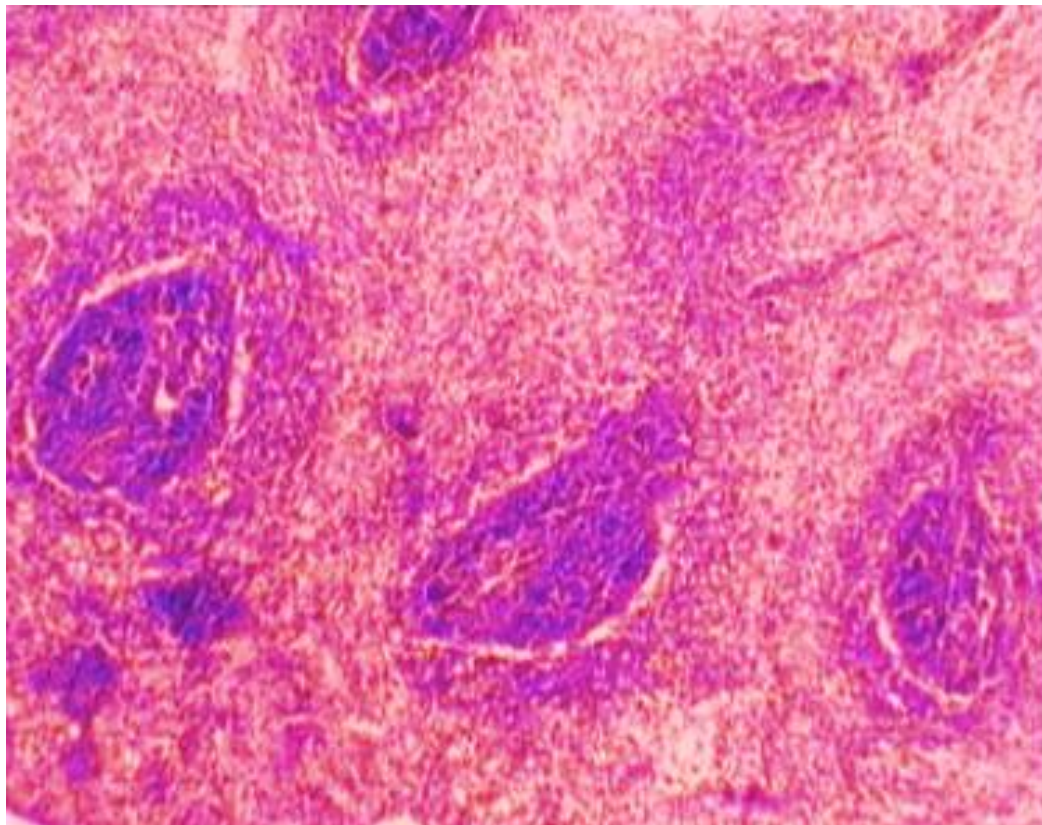
### 3.4 Pulpa roja

Ocupa la mayor parte del parénquima esplénico y se caracteriza por la gran cantidad de sangre que contiene. Está formada por células libres de la sangre (eritrocitos, macrófagos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y megacariocitos) en un entramado de células reticulares en rumiantes y cerdo y miofibroblastos en caballo y perro, constituyendo cordones que están separados por senos venosos o vénulas. Constituyen canales amplios, cortos y anastomosados, revestidos por células endoteliales y macrófagos que emiten prolongaciones que contactan con las células y/o sustancias extrañas en el interior del seno. Bajo la pared aparece una membrana basal fenestrada (Bernabé, Navarro, & Pallares, 1999).

La pared de los senos permite el tránsito de células entre los cordones y los senos. Es frecuente, sobre todo en animales viejos, la presencia en la pulpa roja de macrófagos conteniendo pigmento de hemosiderina derivado de la hemoglobina procedente de la degradación de los eritrocitos viejos que son retirados aquí de la circulación. Los antígenos vehiculados por la sangre son retenidos por



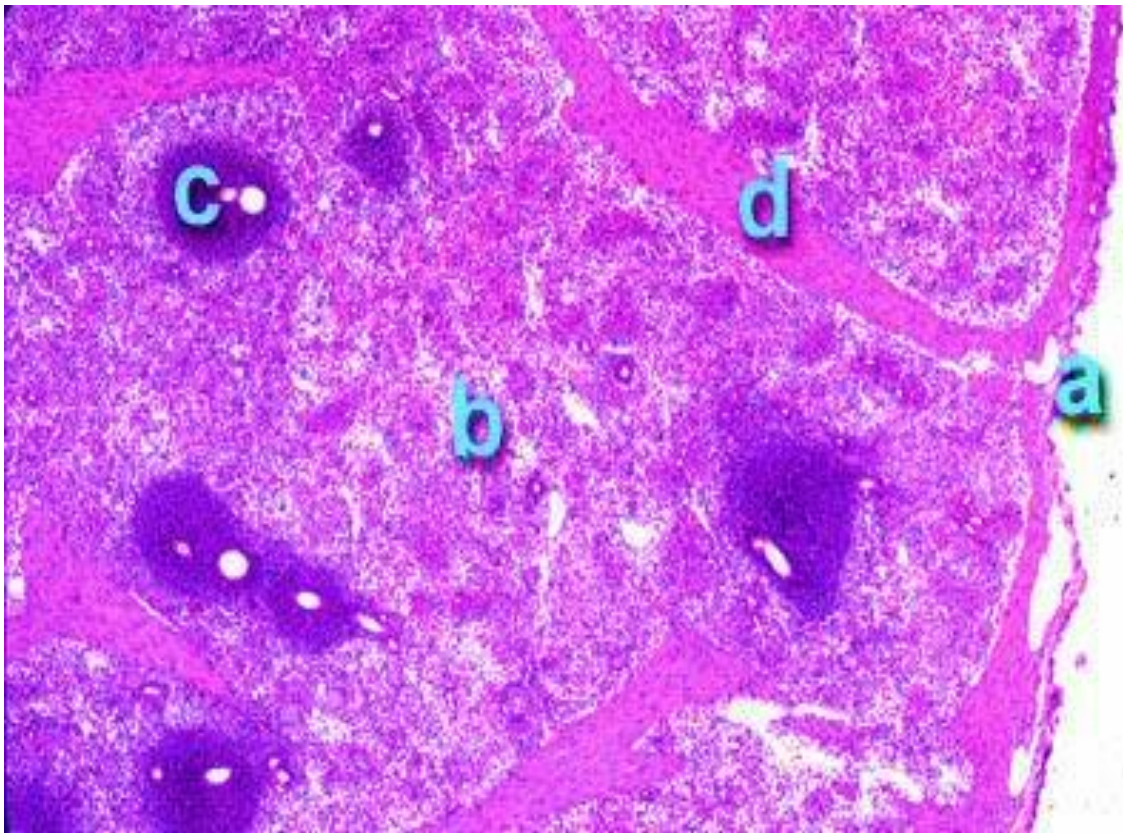
los macrófagos y células presentadoras de antígenos de la pulpa roja, que migran hacia la pulpa blanca donde interactúan con los linfocitos. No se sabe bien cómo pasa la sangre de los capilares terminales a los senos venosos y se han propuesto tres teorías: circulación cerrada, cuando la sangre pasa directamente al seno venoso; abierta, cuando el capilar termina y la sangre pasa filtrándose a través de la pulpa roja; y mixta, cuando coexisten ambas. Los senos y vénulas desembocan en las venas de la pulpa roja donde su endotelio asienta sobre una membrana basal continua delimitada por una fina capa de fibras musculares lisas. Estas venas se convierten en venas trabeculares que en el hilio forman la vena esplénica (Bernabé, Navarro, & Pallares, 1999).



**Figura 5. Porción de pulpa blanca y roja en tinción hematoxilina-eosina 4X** (Owen, Punt, & Stranford, 2016). La capsula se compone de tejido conectivo denso cubierto de mesotelio escamosos. Contiene fibras de colágeno, presenta células de músculo liso. Por las trabéculas discurren vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. Entre la cápsula y las trabéculas hay un espacio que lo ocupa la pulpa esplénica que es el parénquima. Se organiza en pulpa blanca que son pequeños islotes que se distribuyen entre la pulpa roja formada por numerosos sinusoides y células reticulares. La pulpa blanca está formada por folículos linfoides que contiene principalmente linfocitos B. estos folículos se disponen a lo largo de las ramas arteriales que surgen de las trabéculas.

### 3.5 Zona marginal

Es la zona de transición entre las pulpas blanca y roja y se encuentra interpuesta en el paso de los linfocitos circulantes, por lo que es importante en el desarrollo de la respuesta inmune. En ella encontramos capilares colaterales derivados de las arteriolas de la vaina linfáticas periarteriolares que, tras atravesarlas, acaban constituyendo los senos terminales o marginales entre la pulpa blanca y el área marginal y los senos de la pulpa roja. Los senos marginales tienen un endotelio discontinuo con espacios de hasta 2-3 micrómetros de diámetro que asientan sobre una membrana basal también discontinua que favorece el paso de células al parénquima (Bernabé, Navarro, & Pallares, 1999).



*Figura 6. Corte histológico del bazo de cerdo 100X (Owen, Punt, & Stranford, 2016). En el que se pueden observar la cápsula (a), la pulpa roja (b), la pulpa blanca (c) y las trabéculas (d).*

#### **4. Justificación**

El FT se utiliza como terapia en diversas enfermedades para aumentar la eficiencia de la respuesta inmune y en el caso del humano, principalmente se obtiene de la sangre y sus derivados.

Con el presente estudio se pretende obtener FT de otras fuentes, principalmente debido a la dificultad en el acceso a los productos sanguíneos, también con el fin de ampliar el conocimiento que hasta ahora se tiene de la función del FT y obtención menos costosa del mismo por medio del uso de bazos de cerdo obtenidos de un rastro donde estos se desechan.

## 5. Hipótesis

Si el bazo de cerdo es una fuente potencial de *Factor de transferencia*, entonces se podrá obtener el *Factor de transferencia* de una fuente económica, y poder tener un efecto positivo en el sistema inmunológico.

## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

- Obtención de factor de transferencia a través de dializado de extracto de bazo de cerdo, empleando como tratamiento en el modelo murino de rata Wistar para evaluar el incremento en poblaciones linfocitarias de bazo y con ello demostrar por medio de pruebas biológicas su efecto para uso terapéutico.

### **6.2 Objetivos particulares**

- Realizar el conteo de células blancas del bazo de cerdo por medio de cámara de Neubauer.
- Realizar la diálisis del bazo con membranas para diálisis para la separación del FTb.
- Hacer la determinación de lípidos totales, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos por medio de espectrofotometría y métodos cuantitativos.
- Emplear el dializado en modelo murino de rata Wistar
- Sacrificar y disectar ratas Wistar para obtener el bazo y realizar técnicas histológicas.
- Conteo celular de linfocitos en el corte histológico del bazo de la rata.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Recolección y procesamiento del bazo de cerdo

Se utilizaron 2 bazos de cerdo obtenidos de un rastro de 2 cerdos que se sacrificaban en el momento, inmediatamente se prosiguió a su congelación para evitar su descomposición.

### 7.2 Cuantificación de leucocitos en cámara de Neubauer

Para obtener el FT se realizó un conteo celular en una pequeña muestra de bazo de cerdo recién sacrificado.

Se obtiene una muestra de 3.093 g de bazo de cerdo recién sacrificado. Se homogenizó una sección de bazo, centrifugar y separar el sobrenadante. Se realizó una dilución 1/10 con SSF, se realizó el conteo en cámara de Neubauer contando 4 cuadrantes primarios, y obtener el número de células/mL.

**Tabla 1.** *Conteo celular en cámara Neubauer.*

	<i>Peso total del bazo (g)</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Dilución</i>	<i>Número de células/mL</i>
<i>Bazo 1</i>	<i>200</i>	<i>2.413</i>	<i>1/10</i>	<i>475 000</i>
<i>Bazo 2</i>	<i>220</i>	<i>3.093</i>	<i>1/10</i>	<i>250 000</i>

### 7.3 Rompimiento celular y obtención de FTb

Para la obtención del FTb se prosiguió a homogenizar el resto de los bazos por separado y almacenar con SSF a -70 °C por dos días, pasado este tiempo se descongeló manteniendo una



temperatura no mayor a los 37 °C. Se realizó este procedimiento 3 veces para asegurar el rompimiento de las células y obtener el FTb.



*Figura 7. Congelación de los bazos de cerdo.*

#### **7.4 Diálisis**

Se trasasó el material obtenido de la congelación y descongelación a las bolsas de diálisis con 1.5 L de agua destilada durante un tiempo de 24 horas, pasado este tiempo se realizó un segundo y tercer cambio con las mismas características.



*Figura 8. Diálisis de bazo de cerdo.*

## **8. Estudios de composición bioquímica**

### **8.1 Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford**

Se preparó una solución estándar de albúmina, conteniendo 10 mg disueltos en 10 mL de NaCl 0.15 M. Las soluciones conteniendo de 10 a 100  $\mu\text{g}$  de estándar de albúmina, se colocaron en tubos de 13 $\times$ 100 mm ó 12 x 75 mm, en un volumen de 0.1 mL de agua destilada. El volumen en el tubo de prueba también se ajusta a 0.1 mL con solución de NaCl 0.15 M. Se le agregaron 2 mL de reactivo de Bradford, el cual se preparó de la siguiente forma. Se disolvieron 100  $\mu\text{g}$  de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol al 95 %. A esta solución se le agregó 100 mL de ácido fosfórico al 85 % p/v, la solución resultante se diluyó a un volumen final de 1.0 L con agua destilada. Se dibujó una gráfica patrón de proteínas cantidad de albúmina (eje de las abscisas) contra Absorbancia obtenida a una longitud de onda de 595 nm (eje de las ordenadas). La solución problema se diluyó con NaCl 0.15 M. Se agregó en cada tubo un volumen de 0.1 mL de la solución problema en tubos de 12 $\times$ 100 mm, se le adicionaron 5 mL de reactivo. La Absorbancia resultante del problema se interpola a la curva patrón y se extrapola en la curva para conocer la cantidad de proteína contenida en la muestra.

### **8.2 Cuantificación de carbohidratos por el método de ácido sulfúrico.**

En un tubo de ensaye se colocó 1.0 mL de fenol al 5 %, se agregó 1 mL de solución estándar de glucosa (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para realizar la curva), se adicionaron 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 96 %, se mezcló y se incubó por 20 min, hasta desarrollar color. Se midió en espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. La Absorbancia resultante del problema se interpola a la curva patrón y se extrapola en la curva para conocer la cantidad de carbohidratos totales contenida en la muestra.



### 8.3 Estudios de actividad biológica

#### 8.3.1 Prueba inoculación en modelo múrino

Materiales.

8 ratas Wistar

FTb

Jeringas para insulina.

SSF

#### 8.3.2. Método

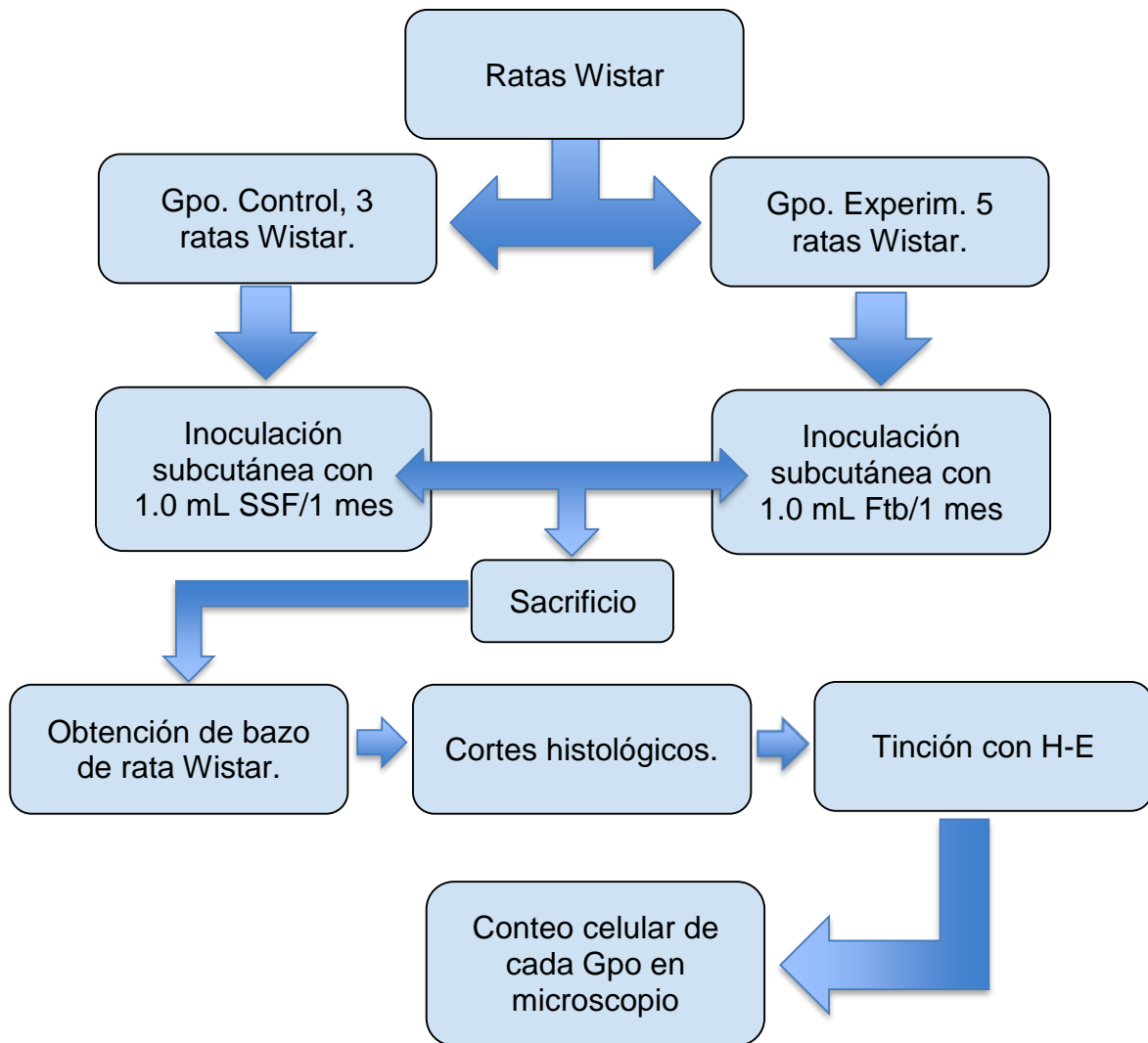


Figura 9. Método de inoculación de ratas Wistar.

### 8.3.3. Técnica

Depositar a la rata sobre la rejilla permitiéndole agarrarse a ella con las patas delanteras y levantar la piel de la espalda con los dedos índice y pulgar tal y como se muestra en la *figura 10*.



*Figura 10. Vía de inoculación de ratas Wistar.*

- Insertar la aguja en la base de la zona de piel que estamos sujetando manteniendo la aguja paralela al cuerpo de la rata para evitar inocular en capas inferiores a la piel.
- Aspirar ligeramente para asegurarnos de no haber penetrado en algún vaso sanguíneo
- Inyectar el volumen de muestra a una velocidad moderada.
- Retirar la aguja y presionar la piel en la zona de inyección para evitar que el fluido salga por el punto de la piel perforada.
- Observar que no se produzca sangrado.
- Debido a que la muestra se deposita en la zona subcutánea, y si esta se ha desarrollado correctamente, podremos observar la formación de un abultamiento en el lugar de inyección que irá desapareciendo a medida que el fluido es dispersado.

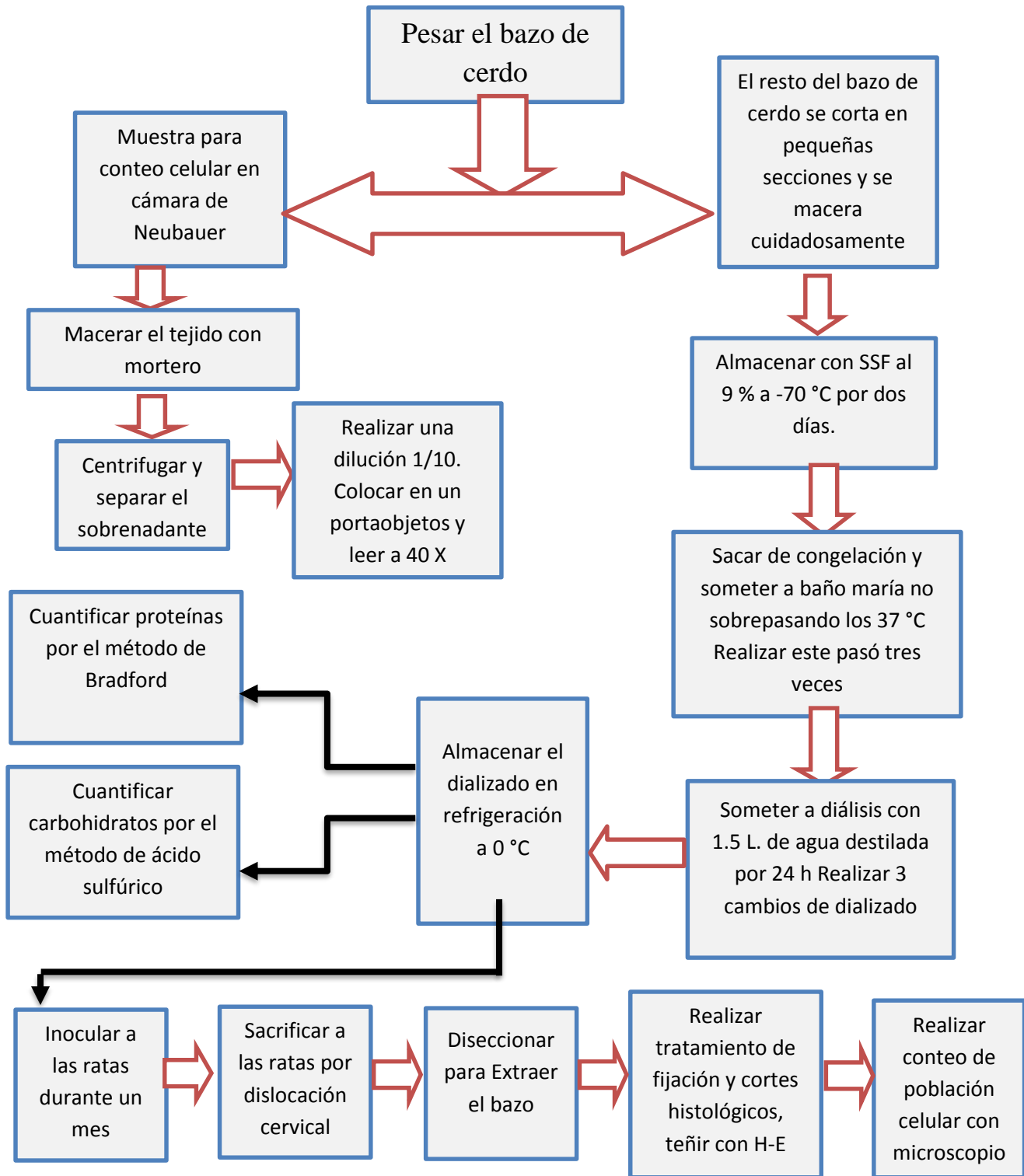


Figura 11. Diagrama de flujo de la metodología para la obtención y prueba del FTb.

## 9. Resultados

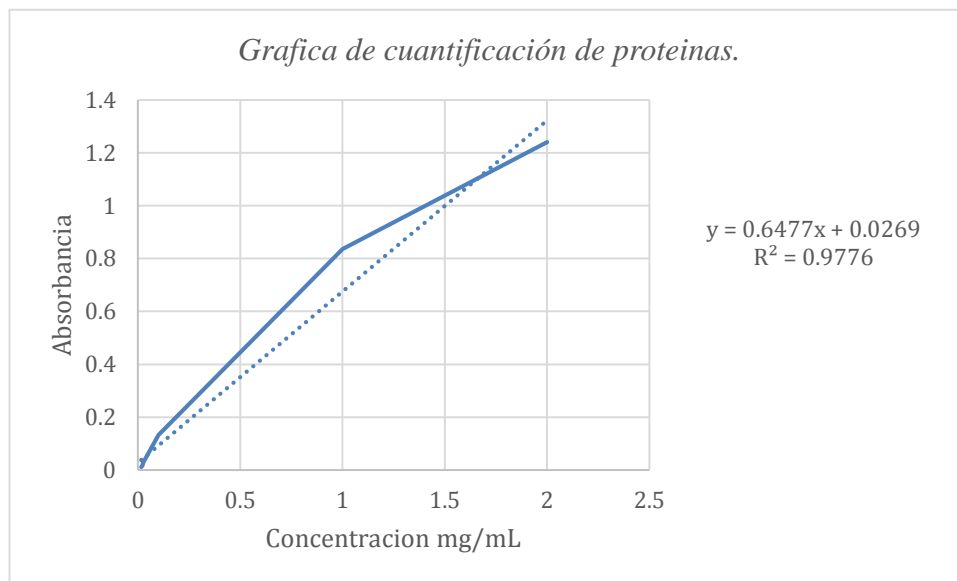
### 9.1 Conteo celular para evaluar la presencia de población leucocitaria.

Se obtuvo para el primer bazo diseccionado una suspensión de leucocitos con una concentración de 475 000 cel/mL; y para el segundo bazo se usó una concentración de 250 000 cel/mL.

### 9.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

**Tabla 2.** *Cuantificación de proteínas.*

# Tubo	Absorbancia Y (muestra)	Concentración X (mg/mL)
0	0.011	0.0167
1	0.016	0.0218
2	0.023	0.0243
3	0.025	0.0251
4	0.027	0.0257
5	0.029	0.0264
6	0.133	0.100
7	0.836	1.000
8	1.241	2.000

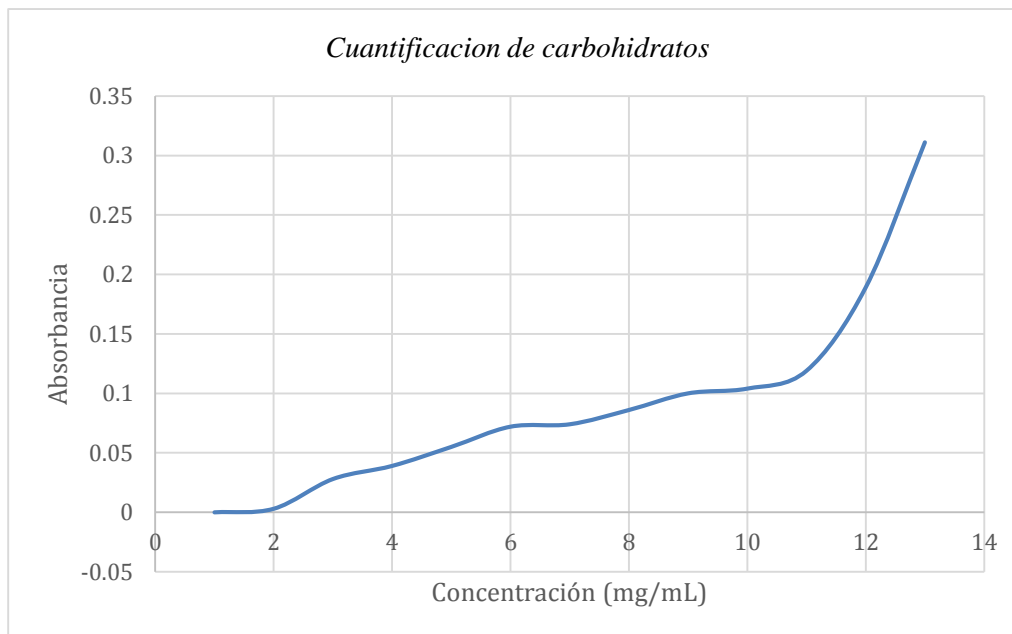


**Figura 12. Curva patrón con albúmina de concentración conocida (1mg/mL).** Curva patrón con albúmina de concentración conocida (1.0 mg/mL), al extrapolar la Absorbancia se conoce la concentración de proteínas totales presentes en el dializado. Dando una concentración de 0.023 64 mg/mL.

### 9.3 Cuantificación de carbohidratos por el método de ácido sulfúrico

**Tabla 3.** *Cuantificación de carbohidratos.*

<i># Tubo</i>	<i>Absorbancia Y</i>	<i>Concentración x</i>
<i>0</i>	<i>0.003</i>	<i>2.000</i>
<i>1</i>	<i>0.028</i>	<i>4.000</i>
<i>2</i>	<i>0.039</i>	<i>5.000</i>
<i>3</i>	<i>0.055</i>	<i>5.8235</i>
<i>4</i>	<i>0.072</i>	<i>6.8235</i>
<i>5</i>	<i>0.074</i>	<i>6.9411</i>
<i>6</i>	<i>0.086</i>	<i>7.6470</i>
<i>7</i>	<i>0.100</i>	<i>10.000</i>
<i>8</i>	<i>0.104</i>	<i>8.7058</i>
<i>9</i>	<i>0.119</i>	<i>9.5882</i>
<i>10</i>	<i>0.189</i>	<i>12.500</i>
<i>11</i>	<i>0.311</i>	<i>20.000</i>



**Figuras 13. Curva de carbohidratos.** La Curva de carbohidratos. Sustituyendo en la ecuación de la recta el valor de la Absorbancia de nuestra muestra que es de 0.085 obtenemos una concentración de 4.90 mg/mL de carbohidratos.

**Tabla 4. Determinación de lípidos.**

<i>Absorbancia</i>	<i>Concentración</i>
<i>0.004</i>	<i>8.4985</i>
<i>0.003</i>	<i>6.3739</i>
<i>0.004</i>	<i>8.4985</i>
<i>0.004</i>	<i>8.4985</i>
<i>0.002</i>	<i>4.2492</i>
<i>0.003</i>	<i>6.3739</i>

**Tabla 5. Determinación de ácidos nucleicos.**

<i>Absorbancia</i>	<i>Concentración</i>
<i>0.00</i>	<i>0.0221</i>
<i>0.0314</i>	<i>0.0225</i>
<i>0.0537</i>	<i>0.0181</i>
<i>0.0424</i>	<i>0.0272</i>
<i>0.0653</i>	<i>0.0370</i>
<i>0.0772</i>	<i>0.0471</i>

#### 9.4 Resultados de la actividad biológica

**Tabla 6. Grupos de control.**

<i>Grupo</i>	<i>Conteo celular(linfocitos)/5 campos</i>
<i>Control 1</i>	<i>5.367</i>
<i>Control 2</i>	<i>7.723</i>
<i>Control 3</i>	<i>8.041</i>

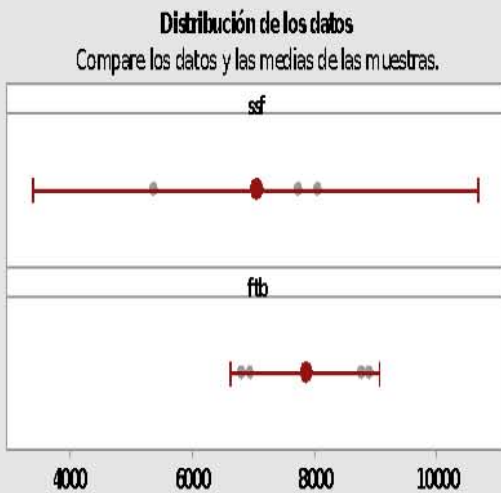
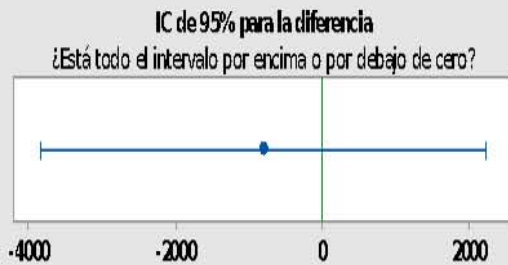
**Tabla 7. Grupos experimentales.**

<i>Grupo</i>	<i>Conteo celular(linfocitos)/5 campos</i>
<i>Experimental 1</i>	<i>6.800</i>
<i>Experimental 2</i>	<i>6.925</i>
<i>Experimental 3</i>	<i>8.753</i>
<i>Experimental 4</i>	<i>7.898</i>
<i>Experimental 5</i>	<i>8.888</i>

Prueba t de 2 muestras para la media de SSF y FTb  
informe de resumen.



La media de ssf no es significativamente diferente de la media de ftb ( $p > 0,05$ ).



**Muestras individuales**

Estadísticas	ssf	ftb
Tamaño de la muestra	3	5
Media	7043,7	7852,8
IC de 95%	(3415; 10672)	(6634,1; 9071,5)
Desviación estándar	1460,7	981,48

**Diferencia entre muestras**

Estadísticas	*Diferencia
Diferencia	-809,13
IC de 95%	(-3834,8; 2216,5)

\*Diferencia = ssf - ftb

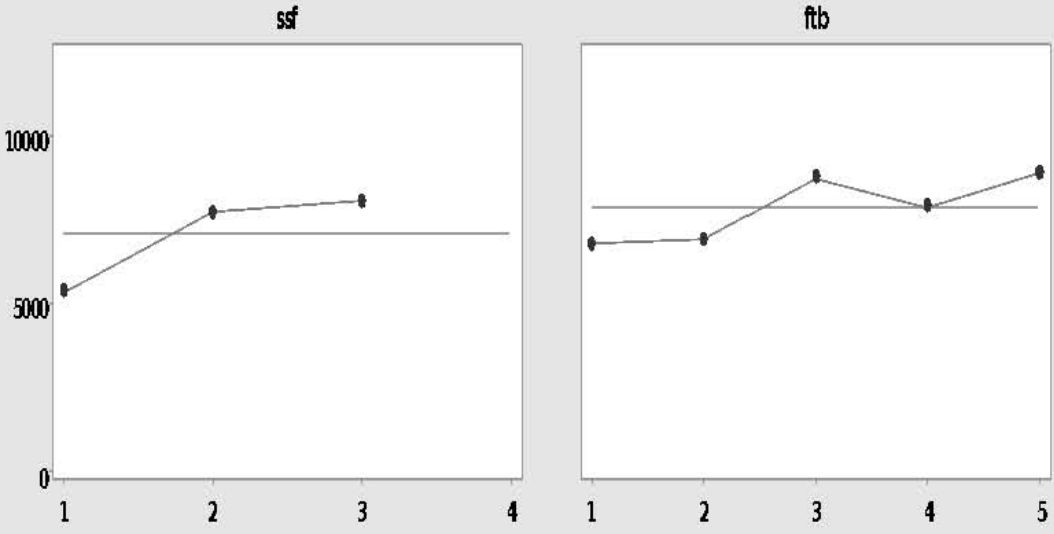
**Comentarios**

- Prueba: No existe suficiente evidencia para concluir que las medias difieren en el nivel de significancia de 0,05.
- IC: Cuantifica la incertidumbre asociada a la estimación de la diferencia en las medias a partir de los datos de las muestras. Usted puede tener una seguridad de 95% de que la diferencia verdadera se encuentra entre -3834,8 y 2216,5.
- Distribución de datos: Compare la ubicación y las medias de las muestras. Busque datos poco comunes antes de interpretar los resultados de la prueba.

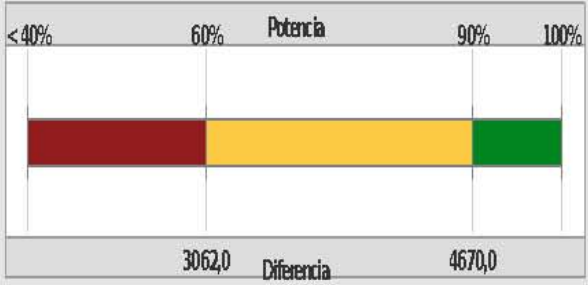
Figura 14. Prueba t-student de informe de resumen (Prog. Minitab versión 17, 2018)

**Prueba t de 2 muestras para la media de SSF y FTb  
informe de diagnóstico**

Orden de los datos en la hoja de trabajo  
Investigar cual quier valor atípico (marcado en rojo).



¿Cuál es la probabilidad de detectar una diferencia?



Para  $\alpha = 0,05$  y tamaños de muestra = 3; 5:  
Si hubiera una diferencia de 3062,0 entre las medias, usted tendría una probabilidad de 60% de detectar la diferencia. Si la diferencia fuera de 4670,0, tendría una probabilidad de 90%.

¿Qué diferencia puede detectar con sus tamaños de muestra de 3 y 5?

Diferencia	Potencia
3062,0	60%
3475,5	70%
3969,2	80%
4670,0	90%

Diferencia observada = -809,13

La potencia es una función de los tamaños de las muestras y las desviaciones estándar. Para detectar diferencias más pequeñas, considere aumentar los tamaños de las muestras.

*Figuras 15. Prueba t-student de informe de diagnóstico (Prog. Minitab versión 17, 2018)*



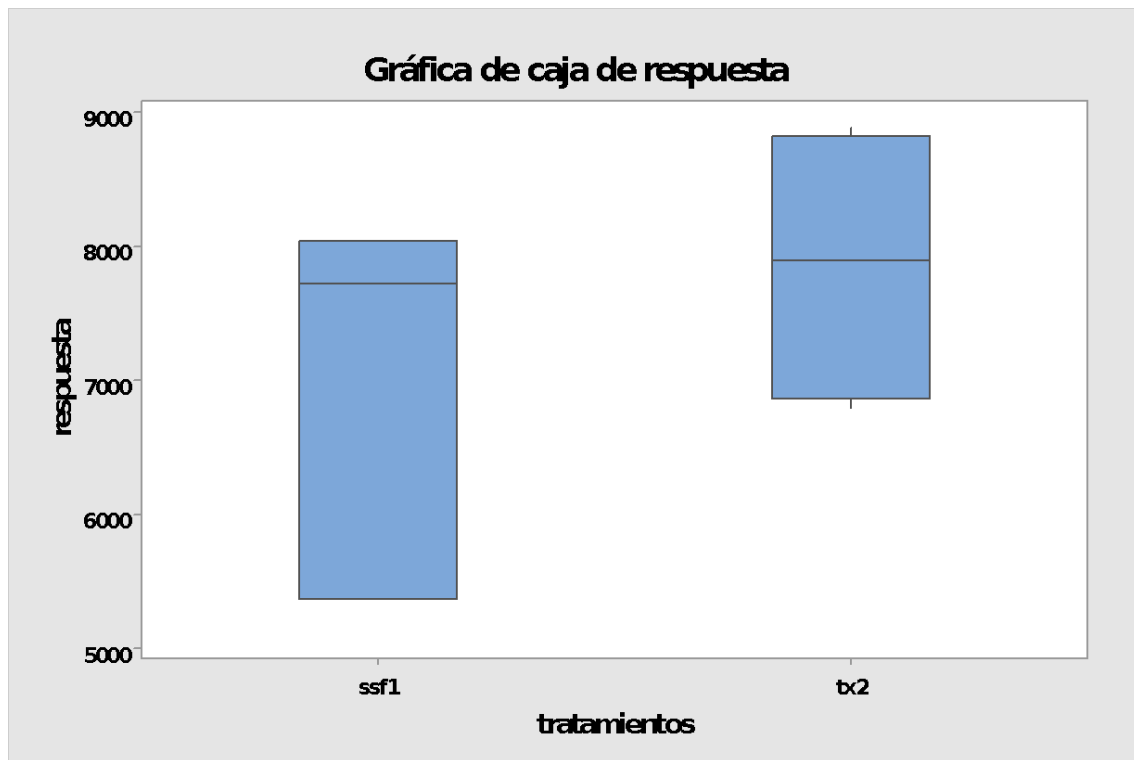


Figura 16. Gráfica de caja de respuesta (Prog. Minitab versión 17, 2018)

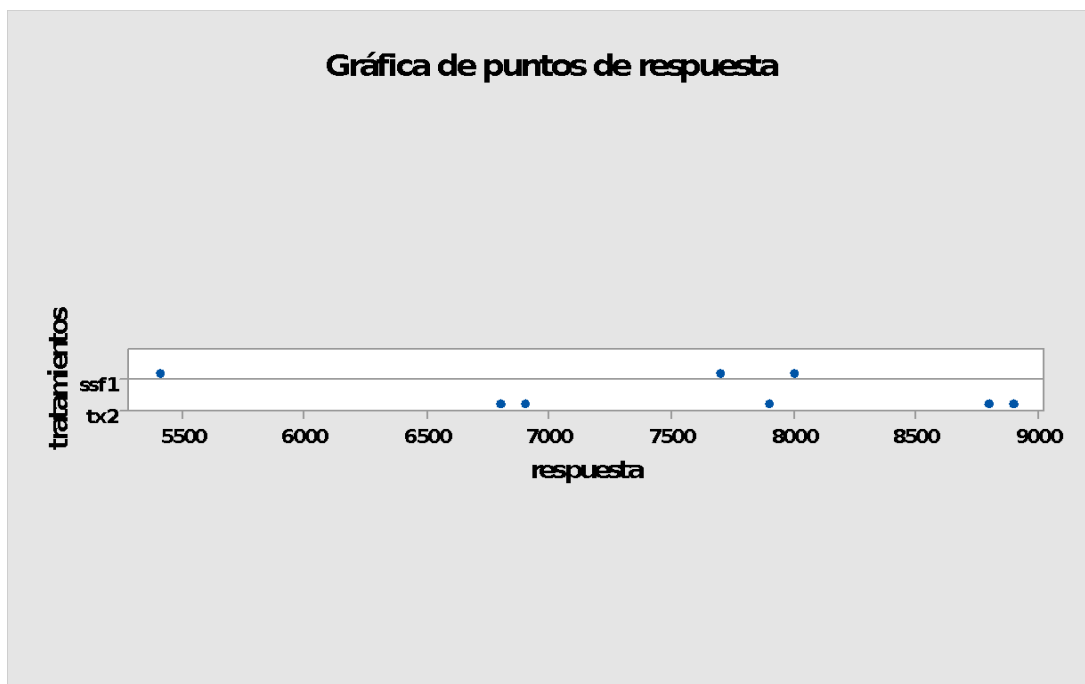


Figura 17. Gráfica de puntos de respuesta (Prog. Minitab versión 17, 2018)

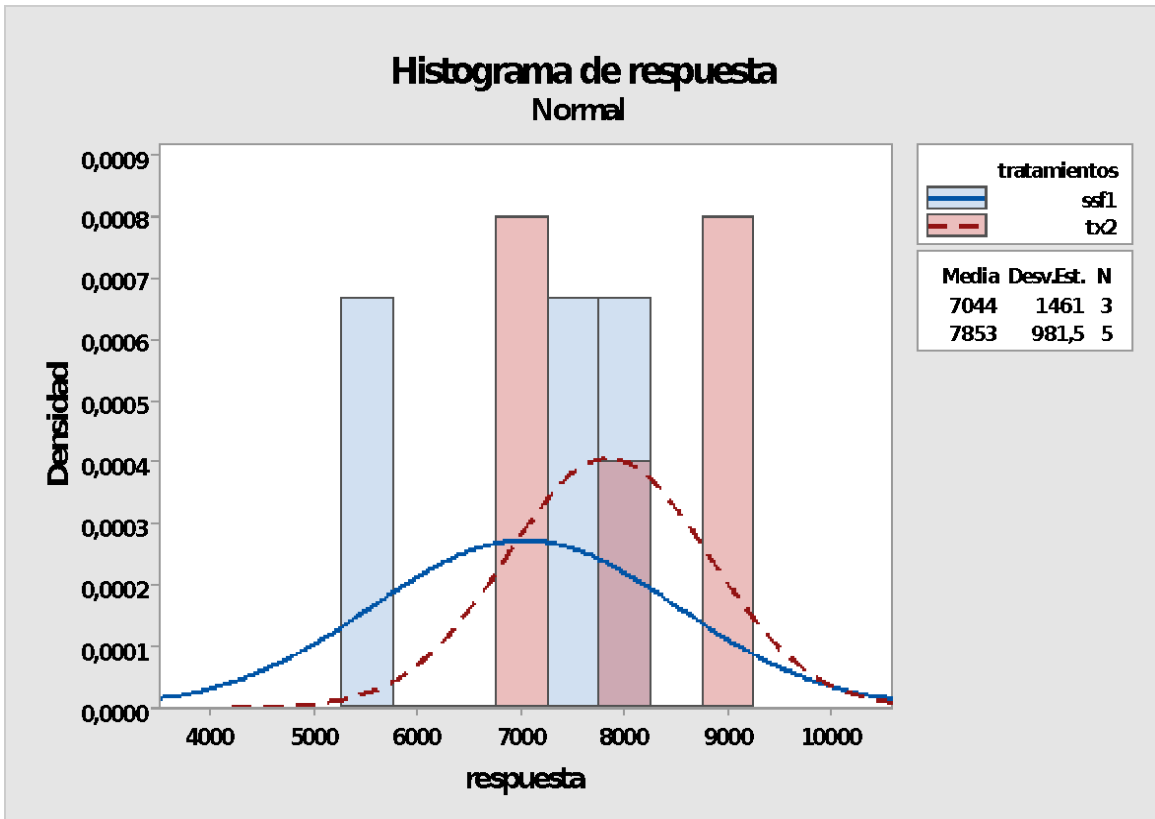


Figura 18. Grafica del histograma de respuesta normal (Prog. Minitab versión 17, 2018)  
 Se muestra en color azul el tratamiento con SSF y en color rosa con FTb.

## 10. Discusión

Esta investigación se llevó a cabo con el fin de encontrar un recurso apto para la obtención del factor de transferencia utilizando materiales diferentes a los ya conocidos, actualmente se conocen factor de transferencia de calostro bovino, sangre periférica, bazo de rata. Se han explotado estos dos recursos sin embargo se han encontrado algunas limitantes como lo es el rendimiento de los recursos para obtener una mayor producción.

Es por ello que se planteó en este trabajo una metodología para la obtención de factor de transferencia de bazo de cerdo, utilizando bases teóricas que ya existen sobre la obtención del FT. Se han obtenido de leucocitos totales de un donador sano, estas células son rotas por ciclos de congelación y descongelación. El lisado leucocitario es posteriormente dializado a través de una membrana con un punto de corte de 12 kDa.

Para este estudio se recolectaron dos bazos de cerdo de animales recién sacrificados en un rastro y se refrigeraron para conservación hasta el laboratorio, se planteó entonces un protocolo para su procesamiento como primer paso se realizó un conteo de leucocitos en una pequeña muestra de bazo con azul de tripán (tabla 1). Para tener una mejor manipulación de la muestra se cortó en trozos muy pequeños y se maceró, para llevar a diálisis, las moléculas de FT son muy pequeñas por lo que se requieren al menos 18 horas para la diálisis.

La fuente de obtención del factor de transferencia debe contener leucocitos a los cuales se les realiza lisis y diálisis para liberar el contenido y aislar moléculas de bajo peso molecular (menos de 12 KDa).

Antes de llevar a cabo la diálisis se requiere someter a congelación y descongelación con el fin de garantizar el rompimiento de las células y la liberación del FTb.

Posterior a la obtención del dializado se cuantifico proteínas totales por el método de Bradford. Se muestra en la (figura 12) la gráfica utilizando curva patrón de albúmina. El resultado obtenido fue de 0.02364 mg/mL.

Puesto que además de los péptidos, los carbohidratos (figuras 13), lípidos y ácidos nucleicos atraviesan la membrana se realizó su cuantificación.

Para demostrar la actividad biológica del FTb obtenido de bazo de cerdo se realizó la inoculación a ratas Wistar cada tercer día durante un periodo de un mes, se prosiguió al sacrificio y disección para la obtención del bazo, al cual se realizó técnica histológica y tinción con H-E. Por medio de esta técnica que abarca una serie secuencial de pasos a través de los cuales una muestra de tejido llega a transformarse en delgados cortes coloreados que pueden ser observados al microscopio, los pasos de la técnica histológica son seis.

Obtención de la muestra:

- Proveer el material para su estudio al microscopio
- Fijación (preservar el material)
- Inclusión embeber el material en un medio fácil de cortar
- Corte. Lograr laminas muy delgadas que sean atravesadas por la luz
- Tinción. Visualizar los tejidos, identificar moléculas en ellos
- Montaje. Preservar el corte, manteniéndolo aislado del aire y deshidratado

Posterior a la técnica histológica se realizó conteo de linfocitos al microscopio. Con estos resultados se realizó el análisis estadístico con la prueba t-student que arrojó como resultado una diferencia significativa del 0.457, ( $p > 0.05$ ) este dato nos dice que no existe diferencia significativa entre los resultados. Cabe mencionar como observamos en la gráfica de respuesta (figura16), y en

el histograma (figura 18) se puede observar mayor aumento de células en tx2 (el tratamiento con FTb). Además de que las campanas nos muestran una menor dispersión de los datos en tx2.

## 11. Conclusiones

- Se realizó conteo celular del bazo de cerdo por medio de cámara Neubauer
- Se realizó diálisis de la muestra para la obtención del FTb
- Se llevaron a cabo estudios de composición bioquímica para cuantificar
- Se realizó conteo celular en pulpa roja en corte histológico
- Con los datos mostrados, no podemos demostrar de manera contundente que se obtuvo el FT.
- Se puede concluir que estadísticamente, el presente estudio podía tener validez solo con poblaciones mayores a 3 000 individuos de estudio.

## 12. Referencias

- Bach, J. F. (1984). *Inmunología*. D. F. México. Editorial Limusa..
- Barret, J. (1990). *Inmunología Médica*. Edit. Interamericana.
- Bernabé, A., Navarro, J., & Pallares, F. J. (1999). *Citología e histología veterinaria*. Murcia, España. Universidad de Murcia. Ed. Dellmann.
- Bonilla, M. (Enero 2017). *Guía para el manejo de residuos en rastros y mataderos municipales*. Recuperado del sitio web de Cofepris: [www.cofepris.gob.mx/documentos/temas/guia4.pdf](http://www.cofepris.gob.mx/documentos/temas/guia4.pdf).
- Lawrence, H. S. & Borkowsky, W. (1983). *A new basis for the Immunoregulatory Activities of Transfer Factor an arcane dialect in the Language of cells*. Cellular Immunology. 82(1):102-116.
- Borkowsky, W. & Lawrence, H.S (1981) *Deletion of antigen/specific activity from leukocyte dialysates containg transfer factor by antigen/coated polystyrene*. J inmunity.126 (2): (pp. 487-489)
- Cabezas, R., Estrada, S., Fernández, C., Millán, R. & Selman, M (2001). *Uso de factor de transferencia como Complemento terapéutico en infecciones Bacterianas*. Biotecnología aplicada. Ed. Especial (18): (p. 23).
- Estrada, P (2007). Indications, usage and dosage of the transfer factor revista alergia México. 54(1): (p.134).
- Ferreira, A., Palomo, I., Roseblatt, M., Sepúlveda, C. & Vergara, U (2009). *Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica*. Talca, Chile. Universidad de Talca. Colección E-book.
- Fundenberg, H., (1989). *Transfer Factor; Past, present and future*. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29(1): (pp. 475-516).
- Gentry, L.O., Mcnitt, T. R., Moore, W.L. Sieger, B. E., & Steel, R.W (1976). *Therapy for disseminated coccidioidomycosis with transfer Factor from a Related Donor*. Arner. J. Med (pp.283-286).
- Kirkpatrick, C. H (2000). *Transfer factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules*, Molecular Medicine 6(4): (pp. 333-340).
- Lawrence H. S (1963). *Transfer of immunological information in humans with dialysates of leukocyte extracts*. Trans Assoc. Am physicians. 74(1): (p. 84).

- Liebich, H. G. & Konig, H. E (2005). *Anatomía de los animales domesticos*. Buenos Aires. Argentina. Editorial Panamericana.
- Moreno, L. & Verdín, S. L (2013). *Histología e Inmunohistoquímica. Manual de Métodos*. Ciudad Universitaria. México. ISBN.
- Owen, J. A., Punt, J. & Stranford S. A (2016). *Inmunología*. KUBY. McGraw-Hill Education. 7e: Tomado de sitio web: [www.accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com).
- Patrov, R. V (1982). *Inmunología*. Moscú. Rusia. Editorial MIR
- Roitt, I. M (2003). *Inmunología fundamentos*. Buenos Aires. Argentina Editorial Panamericana. 10° Edición.
- Rozzo, S. J. & C. Kirkpatrick (1992). *Purification of Transfer factors* (pp. 167-182).
- Zambrano, S. A (2007). *Inmunología básica y clínica*. D.F. México. Editorial. Interamericana.