

11661

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INMUNOMODULADORA DE UN EXTRACTO
LEUCOCITARIO ACTIVADO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN MICROBIOLOGÍA

P R E S E N T A:
Q.F.B. ADRIANA MOLINA RAMÍREZ.

DIRECTOR:
DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO.

2005

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

OFICIO/FES-C/CPMyDCPySA/ST/CGEP/534/VIII/2004

ASUNTO: Designación de Jurado.

BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE
JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACION DE POSGRADO
DE LA DIRECCION GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
Presente.

El Comité Académico del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal autoriza a la alumna **ADRIANA MOLINA RAMIREZ**, registrada con el número de cuenta _____ con el número de expediente _____ para presentar su examen de grado de **Maestra en Microbiología**, con la tesis titulada "**Estudio de la capacidad inmunomoduladora de un extracto leucocitario activado**", a quien se le ha designado el siguiente jurado:

Presidente:	DR. FERNANDO GARCIA TAMAYO
Vocal:	DR. JORGE REYES ESPARZA
Secretario:	DRA. GABRIELA BARCENAS MORALES
Primer Suplente:	DRA. LAURA COBOS MARIN
Segundo Suplente:	DR. ANDRES ROMERO ROJAS

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 3 de agosto del 2004.

DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES
COORDINADOR DEL PROGRAMA

C.c.p. Exp. Alumno
C.c.p. Archivo
FSG/HRA/mrc

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Av. 1º de mayo S/N, Campo 1, Edificio de Estudios de Posgrado,
Apartado Postal 25, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, CP 54700
Tel.: 5623-2018, Fax: 5868 2489



ESTE TRABAJO SE REALIZÓ LABORATORIO 8 DE LA UNIDAD DE POSGRADO FESC-CUATITLÁN, CAMPO 1, EN LOS LABORATORIOS DE INMUNOLOGÍA LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL IPN. CON EL APOYO DEL DR. SERGIO ESTRADA PARRA.

LOS RECURSOS FINANCIEROS FUERON OBTENIDOS POR MEDIO DE LA CÁTEDRA DE INVESTIGACIÓN "ESTUDIOS DE INMUNOFARMACOLOGÍA E INMUNOTOXICOLOGÍA" EN LA FES – CUAUTITLÁN, UNAM.

AGRADECIMIENTOS.

A DIOS

Por todo. Porque a pesar de todo los obstáculos, nunca me abandonas, siempre me das una solución y pones en mi camino gente buena que me extiende la mano.

AL DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS.

Por tu apoyo incondicional, tus consejos, paciencia y confianza en mí.

A MIS PADRES:

Sr. J. Alberto Molina Cachón

Sra. Socorro Ramírez de Molina.

Por que éste es otro más de sus logros. Por la gran herencia que me regalaron.

Gracias a ustedes soy lo que soy. Los amo.

A MI ESPOSO:

IQ: Jorge Alejandro Gil D.

Por creer en mí, por tu apoyo, tu tenacidad y tu amor incondicional. Lo logramos.

Te amo.

A MIS NIÑAS:

Michell Alejandra y Aylín Paola.

Por ser mi estímulo día con día para esforzarme y lograr lo que me propongo. Luchen siempre por alcanzar sus sueños: nunca es tarde para lograrlos. Las amo.

A MIS HERMANAS:

Ruth y Karina.

Por que sé que mis triunfos también son motivo de alegría y orgullo para ustedes.

La amo.

A MIS SUEGROS:

Sr. Mariano y Sra. Martha Gil.

por el apoyo, comprensión y paciencia.

A TODOS MIS SOBRINOS:

Siempre los tengo en mi corazón: Selene, Mariana, Karla, Martita, Fernanda,

Yael, J. Alberto, Santiago, Julio y los nuevos bebés.

A todos los miembros del comité tutorial, por sus consejos para lograr un mejor aprendizaje y un buen trabajo.

A mis profesores, por todo lo que de ellos aprendí.

A todas las personas que de alguna u otra manera me apoyaron para poder lograr ésta meta.

GRACIAS A TODOS.

I. ÍNDICE

	PAGINA
Agradecimientos	I
i) Índice	III
ii) Lista De Figuras	VI
iii) Lista De Tablas	VII
iv) Lista De Abreviaturas	VIII
v) Resumen	X
vi) Abstract	XII
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Inmunomoduladores. ✓	1
1.2 Mecanismos de acción de los inmunomoduladores.	1
1.3 Limitaciones en el uso de los inmunomoduladores.	2
1.4 Clasificación.	2
1.4.1 Compuestos sintéticos.	3
A) Imutiol	3
B) Levamisol, Isoprinosine, Tiabendazol.	3
1.4.2 Productos fisiológicos.	4
A) Citocinas	4
• Interleucina-1 (IL-1).	6
• Interleucina-2 (IL-2)	6
• Interleucina-6 (IL-6)	6
• Interferón γ (IFN- γ)	7
B) Hormonas tísticas.	7
C) Factor de Transferencia.	8
• Características generales.	9
• Estructura química.	9
• Mecanismos de acción.	11

• Aplicaciones.	11
1.4.3 Sustancias de origen microbiano.	18
1.4.4 Productos de origen botánico.	19
2. JUSTIFICACIÓN.	21
3. HIPÓTESIS.	21
4. OBJETIVOS.	22
4.1 Objetivo General.	22
4.2 Objetivos Particulares.	22
5. MATERIAL Y MÉTODOS.	23
5.1 Animales de experimentación.	23
5.2 Preparación del ELM.	23
5.3 Diseño experimental.	24
5.4 Efecto del ELM en el conteo de poblaciones celulares sanguíneas.	25
5.5 Determinación del peso relativo del bazo	25
5.6 Determinación de porcentaje de fagocítico <i>in vitro</i> .	26
5.7 Determinación del índice de fagocítico <i>in vivo</i> (Técnica) . de la eliminación del carbón coloidal).	27
5.8 Efecto de ELM en la producción de anticuerpos en contra de eritrocitos de camero.	28
5.9 Efecto del ELM en el desarrollo de hipersensibilidad retardada (DTH).	29
5.10 Análisis estadístico	29
6 RESULTADOS.	30
6.1 Efecto del ELM en el conteo de poblaciones celulares sanguíneas.	31
6.2 Determinación del peso relativo del bazo.	33
6.3 Determinación de porcentaje de fagocítico <i>in vitro</i> .	35
6.4 Determinación del índice de fagocítico <i>in vivo</i> (Técnica). de la eliminación del carbón coloidal).	36
6.5 Efecto de ELM en la producción de anticuerpos en contra de eritrocitos de camero.	37

6.6	Efecto del ELM en el desarrollo de hipersensibilidad retardada (DTH).	38
7.	DISCUSIÓN	39
8	CONCLUSIONES	43
9	APÉNDICES	44
9.1	Técnicas de conteo de poblaciones celulares	44
9.2	Tablas.	47
10	REFERENCIAS.	50

II. LISTA DE FIGURAS.

FIG.		PÁGINA
1	Cuadro que muestra ejemplos de enfermedades que han sido tratadas exitosamente con el FT	13
2	Diagrama de flujo que muestra de manera general las actividades realizadas durante el trabajo experimental.	24
3	Efecto del ELA en el conteo de poblaciones celulares sanguíneas obtenidos de 2 grupos de ratones de 15 animales c/u. El grupo control inoculado con 0.1 ml de SSF y el grupo 2 con 0.1 ml de ELA, las muestras fueron analizadas 7 días después de las inoculaciones	32
4	Determinación del peso relativo del bazo de 3 grupos de ratones de 18 animales cada uno. Al grupo 1 se les inoculó 0.1 ml de ASB, al grupo 2 se le inocularon 0.1 ml de ELA y al grupo 3, se le aplicó 0.1 ml de SSF. Se sacrificaron 3 ratones de cada grupo a los días 3, 5, 7, 14, 21 y 28. Obteniéndose el peso relativo del bazo con la siguiente fórmula: peso relativo de bazo = peso del bazo / peso del animal.-	34
5	Determinación del porcentaje de fagocitosis <i>in vitro</i> El histograma muestra los resultados obtenidos en tres grupos de ratones, de los cuales 2 de ellos fueron inoculados 10 días antes con <i>M. tuberculosis</i> , el tercer grupo consistía en ratones sin inocular. Al grupo 1 se le inoculó ELA, al grupo 2 SSF, 2 hrs después se obtuvieron muestras de sangre y se determinó el índice fagocítico utilizando como partículas digeribles levadura de cerveza. Por ciento de fagocitosis = No. células con más de dos partículas ingeridas / No. Total de granulocitos.	35
6	Efecto del ELA en la actividad fagocítica <i>in vivo</i> (eliminación de carbón coloidal). La gráfica muestra los valores de absorbancia a 650 nm obtenidos al inocular a un grupo de ratones el ELA y a otro grupo SSF (grupo control): Dos horas después de inocular tinta china en coloide, para posteriormente obtener muestras de sangre del plexo retroorbital a diferentes tiempos.	36
7	Efecto del ELA en la producción de anticuerpos en contra de eritrocitos de carnero. A dos grupos de ratones se inocularon intradérmicamente eritrocitos de carnero, 2 hr después al grupo 1 se le inoculó el ELA y al segundo grupo SSF, se tomaron muestras de sangre a los días 3,5,7,15,21 y 28 y se determinó el título de anticuerpos hemaglutinantes producidos	37
8	Efecto del ELA en el desarrollo de hipersensibilidad retardada (DTH). El histograma muestra los resultados obtenidos del grado de induración a las 24 hr de haber sido inoculados dos grupos de ratones, uno control inoculado con SSF y el otro grupo inoculado con ELA específico para ASB. Se determinó el grado de induración utilizando la fórmula descrita en la técnica	38

III. LISTA DE TABLAS.

NÚMERO DE TABLA		PÁGINA
1	Muestra los valores hematológicos promedio obtenidos en los animales inoculados con el ELA y de animales inoculados con SSF.	47
2	Valores promedio por día de los pesos relativos (g) de tres grupos de ratones. El grupo 1 consistía en animales tratados con antígeno ASB, el segundo grupo ratones inoculados con el ELA y el grupo 3 con SSF.	47
3	Muestra los valores promedio por día, del porcentaje de fagocitosis <i>in vitro</i> , de tres grupos de ratones. En donde los dos primeros grupos fueron previamente infectados con <i>M. tuberculosis</i> : el grupo 1 inoculado con ELA, el grupo 2 sin ELA y el grupo 3 son ratones inoculados solamente con SSF.	48
4	Valores promedio obtenidos por día, de absorbancia a 650 nm en la determinación de fagocitosis en vivo por la técnica de eliminación de carbón coloidal a tiempo de 30 min.	48
5	Título promedio por día, de anticuerpos hemaglutinantes obtenidos de dos grupos de ratones: El grupo 1 inoculado con SSF y el grupo 2 con ELA, los ratones fueron inoculados dos horas antes con eritrocitos de camero.	49
6	Valores promedio del grado de inflamación de cojinete plantar de ratones inoculados con ASB (grupo 1) y ratones inoculados con SSF (grupo 2), para determinar la respuesta de hipersensibilidad retardada	49

IV. ABREVIATURAS.

ELA	=	EXTRACTO LEUCOCITARIO ACTIVADO.
GR.	=	GLÓBULOS ROJOS.
GB.	=	GLÓBULOS BLANCOS.
PMN	=	POLIMORFONUCLEARES
F.T	=	FACTOR DE TRANSFERENCIA.
céls	=	CÉLULAS.
ASB	=	ALBÚMINA SÉRICA BOVINA.
UFC	=	UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS.
EC	=	ERITROCITOS DE CARNERO.
SSF	=	SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA.
DTH	=	HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA.
ADN	=	ÁCIDO RIBONUCLEICO
mm	=	MILÍMETROS.
gr	=	GRAMOS.
hr	=	HORAS
nm	=	NANÓMETROS
min	=	MINUTOS
ml	=	MILILITROS
Kda	=	KILODALTONS
cGMP	=	GUANOSÍN MONOFOSFATO CÍCLICO.
cAMP	=	ADENOSÍN.MONOFOSFATO CÍCLICO
TCR	=	RECEPTOR DEL LINFOCITO T.
µl	=	MICRÓLITROS
%F	=	POR CIENTO DE FAGOCITOSIS
IFN_γ	=	INTERFERON GAMMA
Th	=	CÉLULAS T COOPERADORAS (HELPER)
NK	=	CÉLULAS NATURAL KILLER (asesinas naturales)
CD4+	=	GRUPO (CLUSTERS) DE DIFERENCIACIÓN LEUCOCITARIA 4

CD8+=	GRUPO (CLUSTERS) DE DIFERENCIACIÓN LEUCOCITARIA 8
IgM =	INMUNOGLOBULINA CLASE M
IgG =	INMUNOGLOBULINA CLASE G
IL =	INTERLEUCINA
T =	LINFOCITOS T
B =	LINFOCITO B
Tc =	CÉLULAS T CITOTÓXICAS
LAK=	LYMPHOKINE ACTIVATED KILLER CELLS
LPS=	LIPOPOLISACÁRIDO
TNFα	FACTOR DE NECROSIS TUMORAL.- ALFA.

V. RESUMEN.

En el presente trabajo se realizaron algunas pruebas para evaluar el papel de un extracto leucocitario activado (ELA) (en proceso de patente), utilizando como modelo de investigación ratones machos de las cepas BALB/c; trabajando grupos control y grupos inoculados con dicho extracto.

Se realizó en primer lugar el conteo de poblaciones celulares sanguíneas: conteo de glóbulos rojo, glóbulos blancos, polimorfonucleares, plaquetas y leucocitos, pudiéndose observar que la población de células rojas no presentó ninguna variación en ratones inoculados con el ELA en comparación con los ratones control inoculados con solución salina fisiológica (SSF).

Sin embargo los ratones inoculados con el ELA presentaron un aumento estadísticamente significativo en el conteo del resto de las poblaciones sanguíneas evaluadas, comparados con los resultados obtenidos de los animales control inoculados con SSF.

También se encontró que a los tres días postinoculación, el extracto leucocitario mejorado provocó que el peso relativo del bazo aumentará; a diferencia del peso registrado de este órgano, en los ratones que fueron inoculados con albúmina sérica bovina.

La inoculación del ELA en los ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* mejoró el funcionamiento de la fagocitosis llevándola a niveles casi normales. En la fagocitosis *in vivo* utilizando carbono coloidal, éste fue eliminado mucho más rápido en los ratones inoculados con el ELA comparado con los ratones control.

Además se evaluó la producción de anticuerpos en contra de glóbulos rojos de camero observando que se producen en un tiempo más corto en ratones inoculados previamente con el extracto que en los animales sin él.

Por último se evaluó la inmunidad celular representada con la prueba DTH, observando un mayor grado de induración en los ratones inoculados con ELA específico para ABS.

Sería conveniente continuar evaluando la capacidad inmunomoduladora del extracto leucocitario activado en trabajos posteriores, así como identificar completamente las moléculas involucradas en esta actividad. ya que los buenos resultados obtenidos nos dan una idea de su potencialidad,

VI. ABSTRACT

In this work an Improved leukocytary extract (patent pending) was tested using BALB/c male mice as animal model. To start, the effect on blood cells counting was tested and it was found that white cells increased in number compared with saline inoculated controls. This extract also augmented the spleen relative size from inoculated mice and the process of phagocytosis was improved in extract inoculated *Mycobacterium*-infected animals compared to non-infected control animals. Antibodies to sheep red blood cells from mice augmented in extract- inoculated animals compared to controls. Finally, animals inoculated with this extract showed a bigger delayed type hypersensitivity reaction to seric bovine albumin. More research work is needed in order to understand the effect of this extract on the immune system and to characterise its components.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 INMUNOMODULADORES.

Los inmunomoduladores son sustancias capaces de regular el funcionamiento del sistema inmune, incrementando, disminuyendo o suprimiendo la respuesta inmunológica. También son conocidos con los nombres de inmunoestimulantes, inmunopotenciadores y modificadores de la respuesta biológica (Mulcahy & Quinn, 1986, Blecha, 1988).

El interés por el estudio de los inmunomoduladores se ha visto incrementado en el campo de enfermedades infecciosas, terapia de cáncer, tratamiento de enfermedades autoinmunes, trasplantes y medicina veterinaria (Mulcahy & Quinn, 1986. Fudenberg y Pizza, 1993).

La inmunomodulación se emplea para describir y/o producir la intervención o manipulación farmacológica del estado de actividad del sistema inmune.

1.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS INMUNOMODULADORES

El modo de acción de los inmunomoduladores es muy variado y depende del producto en particular, sin embargo hasta este momento no es del todo claro de que manera actúan; en algunos casos, como la timopoyetina, el factor tímico humoral o factor de transferencia (FT), ha sido posible relacionar cambios a niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos en células inmunológicamente activas que provocan la alteración de manera directa o indirectamente. Coffey y Hadden en 1985, realizaron una revisión en la cual enlistaron sustancias fisiológicas sintéticas que actúan sobre receptores de membrana de linfocitos, afectando los niveles de cAMP y cGMP dentro de las células involucradas.

En comparación con otros inmunoestimulantes, existe más información sobre el mecanismo de acción de FT, el cual se describe más adelante.

1.3 LIMITACIONES EN EL USO DE LOS INMUNOMODULADORES.

La mayoría de los inmunomoduladores reportados hasta hoy comparten características que limitan su aplicación terapéutica, las cuales son:

- a) Dosificaciones inapropiadas pueden producir reacciones indeseables o resultados equivocados.
- b) Tienen efectos secundarios o adversos.
- c) Su acción no es específica para tipos o subclases celulares.
- d) Existen variaciones considerables en la respuesta hacia un inmunomodulador.
- e) No se han identificado efectos a largo plazo de algunos inmunomoduladores (Mulcahy y Quinn, 1986).
- f) Podría ser un peligro el mal uso de inmunomoduladores en algunos casos de enfermedades como inmunodeficiencias o autoinmunidades, debido a la exacerbación de dicha condición.
- g) La regulación de la administración de la droga es crítica, así que la eficacia del inmunomodulador varía con el ciclo de crecimiento de la célula blanco.

1.4 CLASIFICACIÓN.

Dependiendo de su origen, los inmunomoduladores han sido clasificados en (Poli, 1984):

- A) Compuestos sintéticos.
- B) Productos fisiológicos.
- C) Sustancias de origen microbiano.
- D) Productos de origen vegetal

Tanto compuestos sintéticos como las sustancias de origen microbiano pueden considerarse dentro de los modificadores biológicos.

El efecto modulador que es ejercido en el sistema inmune puede involucrar a mediadores locales que son secretados por células inmunológicamente activas, pudiendo o no influenciar otras células en el mismo ambiente (Mulcahy y Quinn, 1986).

1.4.1 COMPUESTOS SINTÉTICOS

Existe una gran cantidad de compuestos sintetizados químicamente que han demostrado tener de alguna manera efecto inmunomodulador, los siguientes son solo algunos ejemplos:

A) Imutiol

El dietildiotiocarbamato sódico (imutiol) ha mostrado marcados efectos inmunomoduladores directamente sobre la función de los linfocitos T *in vivo* (Renoux y Renoux, 1984), además también se ha reportado que induce un incremento en la respuesta proliferativa y producción de IL-2 por linfocito (Chung y col., 1985).

Comercialmente el imutiol (Inmodulen®) al ser probado en cerdos mostró tener actividad co-estimuladora en la activación de monocitos/macrófagos, debido a una expresión de citocinas proinflamatorias (Álvarez y col., 1998).

B) Levamisol, Isoprinosine y Tiabendazol

Estos son utilizados comúnmente como antihelmínticos tanto en humanos como en veterinaria, en reses y cerdos, pero también se han estudiado como inmunomoduladores. Hablando específicamente del levamisol en 1984, Renoux y Renoux reportaron su capacidad inmunomoduladora como inmunopotencializador, pero ellos reportaron que su capacidad dependía de la condición en la que se encontraban los animales, resultando ser más eficaz en animales estresados o inmunocomprometidos (Brunner y Muscoplast, 1980). También otros autores reportan que el levamisol disminuye la respuesta primaria de anticuerpos e incrementa la respuesta secundaria contra eritrocitos de camero inoculados en

cerdos, normalizando la respuesta inmunológica celular en cerdos criados artificialmente (Hennessy y col., 1987).

Se ha encontrado que algunos casos de niños con síndrome de Wiskott-Aldrich, presentan mejoría cuando son tratados con el levamisol durante varios meses (García Tamayo, 1997).

Tanto el isoprinosine como el levamisol tiene una acción timomimética, directa o indirectamente inducen factores que activan la diferenciación de protimocitos y modulan a los receptores para la maduración de linfocitos T, adicionalmente se ha encontrado que ambos compuestos químicos aumentan la fagocitosis inducida por macrófagos, además activan y aumentan la movilidad de granulocitos y macrófagos, así como la inducción de interferón (Hadden WJ, 1996).

1.4.2 PRODUCTOS FISIOLÓGICOS.

Dentro de este grupo pueden estar involucrados mediadores locales, secretados por células inmunológicamente activas que también pueden influenciar a otras células en el mismo ambiente.

La producción y liberación de estos mediadores locales son influenciadas por hormonas, interacciones celulares y estimulación antigénica. Algunos ejemplos de estos productos fisiológicos son:

A) CITOCINAS.

Las citocinas son sustancias solubles, de naturaleza proteica, generalmente glucosiladas y de bajo peso molecular (entre 8 y 70 kda): son sintetizadas por células, a menudo después de su activación. Se desempeñan como mediadores sobre células a muy baja concentración (Nemirovsky y Homberg, 2003).

Estas sustancias presentan una clara potencialidad biológica, tanto así, que incluso pequeñas cantidades son capaces de producir efectos celulares (Mulcahy y Quinn, 1986).

Las Interleucinas (IL) son citocinas que adquirieron este nombre por actuar como mensajeros que permiten la comunicación entre los leucocitos que

participan en la respuesta inmune. No obstante, la mayoría de las interleucinas no se producen exclusivamente en los leucocitos ni comunican únicamente esta población de células sanguíneas. De todas maneras, el término interleucina ha quedado fijo por el uso. Las IL se producen en una forma transitoria, durante la presentación y el reconocimiento de los antígenos, alcanzan concentraciones muy pequeñas y actúan de una manera local sobre células cercanas que tienen receptores de membrana para ellas (ILR). No obstante, algunas Interleucinas pueden pasar a la sangre circulante y actuar sobre células distantes.

Las Interleucinas han sido consideradas como mensajeros necesarios para modular las reacciones inflamatorias, que representan el mecanismo eferente más importante de la respuesta inmune. Sin embargo, las Interleucinas también actúan como factores que retroalimentan la actividad del tejido hematopoyético, que coestimulan la diferenciación de linfocitos que han reconocido un antígeno y que modulan la producción de hormonas por varias glándulas de secreción interna. Las IL controlan la intensidad, la duración y por lo tanto, la efectividad de la respuesta de los linfocitos (García-Tamayo, 1997).

La inmunomodulación a través del uso de citocinas se ha empleado para corregir el estado inmunológico de cerdos en diferentes etapas de la producción, ya que se ha observado que estas poseen una importante función de regulación tanto en estados de homeostasis como en alteraciones del estado del animal (Blecha, 1995 / Murtaugh, 1994).

El IFN- α , IFN- γ , IL-1 e IL-2, se han evaluado para investigar la capacidad de incrementar la respuesta inmunológica o resistencia a enfermedades en cerdos.

También ha sido evaluada la influencia fisiológica de la administración de citocinas proinflamatorias, tales como: IL-1, IL-6 y IFN- γ en cerdos (Murtaugh, 1994).

- **INTERLEUCINA - 1 (IL-1).**

Esta interleucina es producida por células presentadoras de antígeno, linfocitos B y células endoteliales vasculares, queratinocitos de la piel, astrocitos y células de la glía.

La IL-1 se presenta bajo dos formas: la IL-1 α que se encuentra fijada a la membrana plasmática, y la IL- β , que es secretada. Las funciones de la IL-1 son múltiples: aumento de las moléculas de adhesión; activación de los linfocitos T y B; síntesis hepática de las proteínas de la fase aguda de la inflamación; aumento del catabolismo de los miocitos y de la actividad de los osteoclastos, acción sobre el sistema nervioso central (fiebre, anorexia e insomnio).

Se ha sugerido que la IL-1 induce granulopoyesis, incrementando selectivamente la actividad antimicrobiana de los neutrófilos y promoviendo la resistencia a la infección estreptocócica en cerdos neonatales. Así, los defectos en la inmunidad no específica, asociados con la edad o el destete temprano pueden ser mejorados con la administración de esta interleucina. (Nakajima y cols., 1992).

- **INTERLEUCINA - 2 (IL- 2).**

Esta citocina es una proteína de 15 Kda producida principalmente por los linfocitos CD4+ de tipo Th0 y Th1 activados, y en grado menor por las células NK.

La IL-2 reacciona con diferentes células inmunes: a) con el linfocito T, donde provoca una proliferación y una activación que conduce a la diferenciación en Th1 y Th2. b) Con la célula NK la que se transforma en célula LAK y c) con el linfocito B provocando la proliferación del mismo.

Algunos estudios *in vitro* han demostrado que la IL-2 humana recombinante (rHuIL-2) aumenta la respuesta proliferativa de linfocitos porcinos y la actividad de células NK (Nakajima y col., 1992).

- **INTERLEUCINA - 6 (IL- 6).**

Tiene una acción semejante a la IL-1, además interviene en la maduración terminal de los linfocitos B, antes de su transformación en plasmocitos, así como la diferenciación de los linfocitos Tc. Del mismo modo que la IL-1, la IL-6 favorece

la proteólisis endógena, tiene actividad inductora de la producción de proteínas de la inflamación por el hígado, así como la acción sobre el sistema nervioso central, con producción de fiebre, anorexia y somnolencia.

El tratamiento diario con IL-6 incrementa la concentración sérica de proteínas de fase aguda, haptoglobina y disminuye la concentración de zinc en suero. Estas respuestas están caracterizadas por las propiedades proinflamatorias de esta citocina multifuncional (Blecha y col., 1995).

- **INTERFERÓN - γ**

Esta citocina es producida por los linfocitos Th1 CD4+ y Th1 CD8+, así como por las células NK. Su función esencial es activar los macrófagos, los cuales pueden destruir los microorganismos intracelulares por la penetración de O₃ (ozono) y de NO (óxido de nitrógeno). El IFN- γ posee también una acción anti-Th2 que disminuye la respuesta inmune humoral.

Existen trabajos que demuestran que la terapia con IFN- γ puede ser efectiva en cerdos inmunosuprimidos con glucocorticoides.

Se sabe entonces que citocinas como las mencionadas anteriormente han demostrado influencia en respuestas inmunológicas específicas y no específicas, sin embargo, pocas citocinas porcinas han sido usadas en cerdos *in vivo* (Sauliner y col., 1991).

B) HORMONAS TÍMICAS.

La timulina, timopoyetina y timosina, y el llamado factor tímico humoral, son de naturaleza peptídica y son producidas por el timo,

Actúan sobre los linfocitos T en las zonas timodependientes de los órganos linfáticos periféricos y permiten completar la diferenciación de éstos.

Se ha reportado que el factor tímico humoral incrementa el cAMP intracelular de los linfocitos y la timopoyetina y timosina fracción-V incrementan el cGMP (Coffey y Hadden, 1985).

C) FACTOR DE TRANSFERENCIA.

El factor de transferencia (FT) es un agente inmunoterapéutico obtenido de los leucocitos; es un extracto dializable de leucocitos descubiertos por Lawrence en 1954, del cual se sabe que funciona de una manera no específica, que incrementa las actividades del sistema inmunológico como un inmunoestimulante y otra llamada específica, la cual sólo aumenta la respuesta contra un antígeno determinado (Lawrence , 1955).

En la década de los años 80 se realizaron numerosos estudios clínicos del efecto del FT en diversos padecimientos observándose en la mayoría de ellos efectos benéficos (Fudenberg y Pizza, 1993).

Debido a sus características el factor de transferencia se considera como un potente agente inmunoterapéutico, utilizado principalmente en estados de inmunodeficiencia mediada por células.

La obtención del FT se hace a partir de leucocitos de sangre periférica, éstos son lisados por congelación y descongelación, colocándose posteriormente en una bolsa de diálisis con tamaño de poro de 12 Kda, el material que atraviesa la bolsa es el FT.

El FT tiene muchas ventajas sobre otros inmunomoduladores de la respuesta inmunológica, entre otros:

- a) Su relativa facilidad para prepararlo.
- b) El bajo costo.
- c) No lleva microorganismos, ni antígenos de histocompatibilidad por el hecho de ser dializable, y
- d) No tiene efectos secundarios.

El FT pues, se ha definido de varias maneras:

- a) Familia de moléculas hidrófilas altamente polares de bajo peso molecular, las cuales son producidas en pequeñas cantidades por células linfoides y que poseen una potente actividad biológica (Kirkpatrick y col., 1992).

b) Una familia de péptidos provenientes de donadores inmunes que transfieren la respuesta de linfocitos T de una manera antígeno específica. (Kirkpatrick y col., 1992, 1993).

c) Extracto soluble de 20 ml de sangre capaz de transferir inmunidad (Fudenberg, 1989).

• CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL FT.

a) Son moléculas de bajo peso molecular entre 3500 y 6000 Daltons (Kirkpatrick, 1993).

b) Es lábil al calor, pero estable en frío, puede ser almacenado por varios años a temperaturas entre -20°C y -70°C.

c) El FT inmunológicamente específico no es inmunoglobulina, ni es inmunogénico; solamente transforma los linfocitos normales (no sensibilizados) *in vitro* e *in vivo* para que respondan al antígeno (Padiema, Velasco y Estrada, 1967; Arala y Fudenberg, 1976; Fernández, 1985).

d) Una unidad internacional de FT se define como la cantidad derivada del extracto de 5×10^8 leucocitos colocada en un volumen final de 1 ml (Kirkpatrick y col., 1985).

• ESTRUCTURA QUÍMICA DEL FT.

Las moléculas que dan el efecto específico al FT parecen ser polipéptidos con peso molecular de 5000 Daltons. Estos se unen según lo demostró Kirkpatrick, específicamente al antígeno que le dio origen (Charles y Kirkpatrick, 1989; Kirkpatrick y col., 1985, 1992, 1993).

La mayoría de los estudios indican que el FT contiene ribonucleótidos unidos a pequeños péptidos, originando una estructura de oligoribonucleopéptido. Hadden y col., señala que este ribonucleótido podría ser la sustancia activa del FT, también mencionan que se constituye de una base de purina, de ribosa, un grupo fosfodiéster y un péptido.

Se ha demostrado también que el factor de transferencia es químicamente resistente a la ARNasa, ADNasa y a diferentes proteasas, por lo cual su estructura química ha sido difícil de determinar hasta el momento (Estrada-Parra, 1999).

Es innegable que existe discrepancia entre los diversos investigadores sobre la estructura del FT, pero hasta el momento han llegado a la conclusión de que dicha estructura depende de la forma en que se obtiene (Fundenberg, 1993).

- **MECANISMOS DE ACCIÓN PROPUESTOS PARA EL FT.**

Aunque la acción precisa del FT no se conoce exactamente, se tienen varias hipótesis, en una de ellas se cree que el FT puede eliminar el bloqueo o represión existente en los linfocitos T, los cuales por alguna razón, tal como, el estrés, la desnutrición, los cambios hormonales, etc. se encuentran disminuidos en sus funciones.

Se han propuesto varias hipótesis para poder explicarlo: Kirkpatrick (1974) estableció que el FT tiene diferentes sitios de acción tales como el timo, la interacción entre linfocitos, monocitos y linfocitos-linfocitos. Además, el FT presenta efectos directos sobre células presentes en el sitio inflamado. Sugiere también que la especificidad del FT está determinada por el estado inmunológico en el que se encuentre el individuo receptor, más que por la información molecular del factor. Este investigador también propone que muchos de los efectos del FT pueden ser debidos a cambios intracelulares de nucleótidos cíclicos, principalmente por la acumulación de cGMP en células inmunológicamente activas (Kirkpatrick y col., 1974, 1992).

También se sabe que el factor de transferencia incrementa la actividad quimiotáctica de los granulocitos y débilmente la de los monocitos; además actúa como adyuvante (Vanderbark y col 1977).

El FT también actúa como mitógeno acelerando la producción y diferenciación de las células del sistema inmunológico, regulando así las respuestas de las mismas (Zapata y col., 1981).

Asimismo, el factor de transferencia es una molécula de información que puede activar poblaciones de linfocitos T y estimular la proliferación clonal, es

decir, que provoca que los linfocitos T vuelvan a funcionar y también activa a los macrófagos (Olsen y Krakowa, 1983; Estrada y col. 1998).

Se ha propuesto que el FT forma parte del receptor del linfocito T (TCR) ya que el FT puede interactuar con la región variable de la cadena α y/o β del receptor de células T para cambiar la avidéz y afinidad por el antígeno (Dawer 1996).

En 1996 se describieron las propiedades de una subfracción del FT [IMREG(R) -1], la cual se obtiene después de una segunda diálisis con una membrana de 3500 Daltons. Esta subfracción tiene la habilidad de incrementar y acelerar la DTH contra el antígeno con el cual el donador fue sensibilizado y modifica la expresión *in vitro* de la subunidad p55 del receptor para IL-2 en linfocitos CD4 (Gottlieb y col. 1996).

• APLICACIONES DEL FT.

Se han realizado gran cantidad de ensayos para probar la efectividad de éste y de derivados de él, como una opción de terapia en algunas patologías, tanto en animales como en humanos.

En nuestro país en el área veterinaria, el FT se ha utilizado en algunas enfermedades infecciosas del aparato digestivo y respiratorio de becerros, enfermedad de Newcastle en aves, enfermedad de Aujeszky, rinitis atrófica, cólera porcino y colibacilosis en cerdos obteniéndose resultados satisfactorios (Mateos, 1992).

Se ha empleado en forma profiláctica y terapéutica en enfermedades infecciosas en diferentes especies domésticas obteniéndose buenos resultados. Por ejemplo, en el tratamiento y prevención de la colibacilosis en lechones al aplicar FT a las 6 horas después del nacimiento disminuyó la presentación de diarreas y aumentó la ganancia diaria de peso a los 28 días (Rojas, 1987); de igual manera disminuyó la incidencia y mortalidad por *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasterella multocida* en cerdos, mejorando los parámetros producidos en forma significativa (Torres, 1994). La administración del FT bovino en pollos inicia la activación de una respuesta inmune celular en contra de enfermedades virales

como laringotraqueitis e infección de la Bolsa de Fabricio protegiendo en forma similar a la inducida por las vacunas comerciales, sin importar la presencia de anticuerpos maternos (Wilson, 1988). Por otro lado, al aplicar el FT en forma terapéutica en perros infectados con el virus de moquillo se ha tenido alrededor de un 80% de éxito del total de animales tratados (Calzada, 2000).

Otro estudio muestra que ratones inoculados con *M. tuberculosis*, tratados posteriormente con FT de ratón y humano, recuperan la producción de linfocinas Th-1, TNF- α e inhiben la producción de isoformas de la sintetasa del óxido nítrico, así como, un incremento significativo de la DTH, inhibición de proliferación bacteriana y la supervivencia de los animales. Se observó que el suministro del FT combinado con la quimioterapia común, producen una eliminación significativa de la cantidad de bacterias en los pulmones de los animales, comparado con los resultados obtenidos cuando se administra solamente la quimioterapia (Fabre & Pérez, 2004).

El FT se ha utilizado clínicamente como un agente inmunoproláctico o inmunomodulador en diferentes padecimientos humanos (fig.1).

FIGURA 1. Enfermedades que han sido tratadas exitosamente con el FT.

I. ENFERMEDADES INFECCIOSAS	
1.-Protozoarios.	a) Leishmaniasis cutánea b) Toxoplasmosis
2.-Bacterianas.	a) Tuberculosis b) Lepra c) <i>Mycobacterium fortuitum</i>
3.-Micóticas.	a) Candidiasis mucocutánea crónica b) Histoplasmosis diseminada c) Coccidioidomicosis diseminada
4.-Virales.	a) Varicela b) Sarampión c) Herpes Zoster d) Citomegalovirus
II. CÁNCER	
	a) Osteosarcoma b) Hipernefroma c) Cáncer de mama d) Carcinoma nasofaríngeo e) Carcinoma renal f) Carcinoma prostático
III. INMUNODEFICIENCIAS SEVERAS	
1.-Defectos congénitos	a) Síndrome de Wiskott-Aldrich b) Ataxia telangiectásica c) Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada d) Síndrome parcial de Di George e) Disgammaglobulinemia con defectos en inmunidad celular
IV. ENFERMEDADES AUTOINMUNES	
1.-No órgano específicas	a) Lupus eritematosos crónico discoide b) Síndrome de Behcet

(Gottlieb y Sizemore 1995).

Existen varios trabajos que reportan los beneficios obtenidos al utilizar el FT como una medida terapéutica, por ejemplo:

a) Leishmaniasis.

A tres pacientes que presentaban la forma diseminada de leishmaniasis, se les trato con FT específico (obtenido de individuos sanos leishmanino positivos), dichos pacientes presentaban un porcentaje de linfocitos menor a lo normal, posteriormente del tratamiento con 12 unidades de FT, presentaron mejoría clínica y sus linfocitos T empezaron a llegar a las cifras normales. Sin embargo, se termino el factor específico y al aplicarles FT de población sana leishmaniano negativo tuvieron una recaída. Esto demostró que en las infecciones intracelulares debe usarse FT específico y la mejor terapia antimicrobiana disponible (Velasco y col., 1974).

b) Tuberculosis.

En los casos de infecciones bacterianas como tuberculosis se han realizado varios ensayos, utilizando el FT; en uno de estos trabajos evaluaron un grupo de 30 pacientes, a 15 de los cuales, se les administró FT y a la otra mitad un placebo, ambos grupos siguieron con la terapia acostumbrada.

El grupo que recibió el placebo siguió el curso natural de la enfermedad y la mayoría de los pacientes que recibieron FT mejoraron notablemente, aumentando el número de linfocitos y manifestando una mejoría clínica muy clara por primera vez en la historia de su enfermedad además la mayoría se volvieron PPD positivos. En muchos incluso, hubo cambios favorables en la imagen radiológica pulmonar (Estra-Parra & Velasco, 1983).

c) Lepra.

Con respecto a esta patología se trataron a pacientes lepromatosos, tanto nodulares como de la variedad difusa con fenómeno de Lucio (eritema necrosante), con FT específico (obtenido de sujetos donde más del 90% de la población es Mitzuda positiva) por periodos de varios años con resultados alentadores (Zapata y col., 1981).

d) Coccidioimicosis anérgica generalizada:

En enfermedades causadas por hongos también se ha utilizado el FT, como es el caso de la coccidioimicosis, la cual es muy parecida a la tuberculosis, presentando una primoinfección que se resuelve dejando en el pulmón una calcificación, los individuos que la padecen son positivos a la intradermorreacción con coccidioidina.

Sin embargo, un cierto número de pacientes presenta una infección generalizada con lesiones de la piel, los cuales no responden a la terapia convencional antifúngica, y muchas veces llegan a morir. Estos enfermos son negativos a la coccidioidina (anérgicos).

Pacientes anérgicos tratados con el FT específico (obtenido de sujetos sanos de la zona endémica, positivos a coccidioidina) tuvieron una franca mejoría tanto clínica como en sus parámetros inmunológicos, elevando el porcentaje de linfocitos T y volviéndose positivos a la coccidioidina (Steel & Sieger, 1976) (Cabezas y col., 1988).

e) Varicela.

La varicela es una infección causada por un virus; en general es benigna y ocurre principalmente en la niñez, pero pueden presentarse casos graves tanto en niños como en adultos. Además en individuos inmunocomprometidos la varicela puede ser mortal casi en un 100%, pacientes con este caso en particular fueron tratados con el FT específico (obtenido de pacientes sanos que ya han tenido varicela) observándose que la mayoría de los pacientes sobrevivieron (Alvárez y Muñoz., 1992).

f) Herpes zoster.

Se trata de un padecimiento considerado como una forma clínica de la actividad del virus varicela-zoster.

El primer contacto con este virus sucede en la infancia. En un cuadro autolimitado que evoluciona hasta la curación aparente sin embargo, permanecen

partículas virales latentes dentro de las células del sistema nervioso, estableciéndose en muchos, una etapa de reproducción lenta del virus.

La complicación más común en adultos mayores de 40 años es la neuritis postherpética que en mayor o menor grado es refractaria al tratamiento con analgésicos. Existen otras complicaciones graves como la queratoconjuntivitis herpética que puede dar lugar a la pérdida del globo ocular.

La rápida detección del padecimiento permite una terapia temprana con el FT, lo cual se traduce en una pronta evolución del cuadro clínico, el primer síntoma que se modifica es el dolor, lo cual para el paciente es el principal beneficio en cuanto a los signos, las lesiones empiezan a involucionar después de las primeras 24 hrs., siendo franca hacia las 48 hrs. (Padierna y col., 1985).

También el FT se ha empleado con resultados satisfactorios aunque menos espectaculares, en pacientes con compromiso de su respuesta inmune que han desarrollado la infección con este virus. Tal ha sido el caso de pacientes con enfermedad neoplásica sujetos a quimioterapia y/o radioterapia (Fundenberg, 1989) (Bukowski, y col., 1983).

g) Infecciones frecuentes en niños.

Existe un gran número de niños que se infectan con mucha más frecuencia y de manera más severa que otros, principalmente los que acuden a centros de desarrollo o estancias infantiles, Estos pacientes representan un problema para los pediatras porque apenas salen de una infección y pronto desarrollan otra, estos a pequeños no tienen una inmunodeficiencia primaria como las agammaglobulinemias. Sin embargo al practicarles un perfil inmunológico presentan un porcentaje bajo de linfocitos T.

En un estudio realizado a 50 pacientes con las características descritas anteriormente, se encontró que al administrarles un tratamiento con el FT por un mes aproximadamente, mejoraban notablemente, presentando una elevación del número de linfocitos T a valores normales (Estrada-Parra, 1999).

f) Asma.

El asma es una enfermedad caracterizada por un estado de hiperreactividad en el árbol traqueobronquial. La enfermedad es crónica variando en su gravedad que va desde episodios leves hasta la obstrucción bronquial grave que pone en peligro la vida.

Las crisis pueden ser desencadenadas por alérgenos y por factores no alérgicos como el ejercicio, el frío, infecciones y aún por factores psicológicos.

El FT se ha utilizado en pacientes con asma en forma satisfactoria; de un total de 250 pacientes, que en presentaban en promedio 7 crisis asmáticas por mes, después del tratamiento en un 60% de los pacientes el número de crisis disminuyó a cero; en un 23% el promedio de crisis bajo a 2 por mes y el 17% restante el número de crisis siguió en 7, pero éstas fueron más leves y manejables. Lo anterior se ha correlacionado con parámetros de laboratorio existiendo una clara correspondencia, tal es el caso en la disminución de las concentraciones de IgE (Cabezas, y col., 1988).

Como característica común se puede observar que un gran porcentaje de pacientes con este tipo de padecimientos tiene marcada disfunción en sus linfocitos T, en estos casos, el FT específico, obtenido de una población sana expuesta y posteriormente recuperada, hace que dichos linfocitos se activen y vuelvan a realizar su función, además de activar macrófagos (Estrada & Cabezas, 1999).

Otro de los efectos notables del FT es en el área de oncología, donde ha contribuido a mantener al paciente libre de enfermedad recidivante o metastásica. Ejemplos de esto son los carcinomas prostáticos tanto en su sitio primario como en focos metastásicos. En estos carcinomas se ha evidenciado desde remisión total de la neoplasia, hasta limitar la metastásis del carcinoma (Corrado 1989). Siendo también eficiente en el caso de carcinoma renal, nasofaríngeo y pulmonar (Crusinberry, 1999, Prasad 1996, Pilotti 1996).

El FT se administra por vía oral o parenteral, la mayoría de los investigadores no han encontrado diferencias significativas en la eficacia según la vía de administración.

El Factor de Transferencia se puede encontrar comercialmente en forma de tabletas, cápsulas, solución o liofilizado; el costo del factor de transferencia es relativo, en México se puede obtener aun precio menor que en otros países del mundo.

En virtud de la importancia de contar con inmunomoduladores efectivos, resulta importante continuar con la investigación del FT en el campo de la medicina, tanto a nivel veterinario como humano, para evaluar el efecto en la práctica (Álvarez y col., 1988).

1.4.3 SUSTANCIAS DE ORIGEN MICROBIANO.

Dentro de este grupo tenemos, una gran cantidad de derivados celulares de diferentes tipos de microorganismos que presentan actividad inmunomoduladora sumamente interesante, por ejemplo:

Esqueletos de paredes de *Mycobacterium bovis* (BCG), *Nocardia rubra*, *Propionibacterium acnes* y *Listeria monocytogenes*, especialmente las dos primeras han demostrado ser efectivas en periodos prolongados de supervivencia en pacientes con cáncer y en protección contra infecciones virales.

Algunos productos derivados de diferentes cepas de *Mycoplasma* se han propuesto como moduladores del sistema inmune (Ruuth & Praz, 1989). Un producto de *M. arthritis*, conocido como MAS (superantígeno de *M. arthritis*) ha demostrado que estimula tanto la proliferación de linfocitos (Taquin & Cole, 1986), como la producción de IFN- γ (Kirchner & Bauer A, 1986).

Acholeplasma spp. (Sugama K, 1990) y *Spiroplasma spp.* (Sher T. 1990) estimulan la síntesis de FNT- α y *M. arginini* como *M. arthritis* inducen la proliferación por inducción de GM-CSF (Stuart, 1990).

También se ha reportado que partículas de alto peso molecular provenientes de *M. fermentans* inducen *in vitro* la producción de IL-6, así como de IL-2 e IL-4, que juegan un papel importante en la generación de células T citotóxica (Mühlradt, 1991).

La presencia de *M. orale* durante la incubación de macrófagos con células tumorales, provoca que estas últimas mueran por la inducción de FNT- α (Gallily

R, 1989); resultados similares se han reportado al utilizar membranas de *M. capricolum* (Sher T, 1990).

Las membranas obtenidas de *M. pulmonis*, así como el sobrenadante del cultivo celular estimulan células B mientras que las células T son levemente estimuladas. Las células del bazo de ratones estimulados con estas mismas membranas producen más IL-4 y menos IFN- γ que las células no estimuladas con las membranas (Romero y cols., 2001).

Productos de marcas registradas como: Luivac, Biostim y Ribomunyl (mezclas estandarizadas de bacterias contra infecciones respiratorias) han mostrado una gran estimulación a células dendríticas *in vitro*, (comparadas con la utilización de LPS), dichas células dendríticas inducen la proliferación de linfocitos T alogénicos. (Spisek 2004).

Otros factores inmunoestimulantes, de origen exógeno y muy importante, son las endotoxinas o lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias Gram negativas que son comensales en el intestino. Los residuos de los LPS que se absorben por vía porta estimulan los macrófagos y las células endoteliales provocando la liberación de varias Interleucinas que pasan a la circulación y se distribuyen por todo el cuerpo. Las Interleucinas son citocinas que actúan como mensajeros porque, al unirse a sus receptores, transmiten señales que inducen diversas actividades celulares (García-Tamayo 1994).

En 1992, Yamato y cols. fue el primero en reportar que el ADN bacteriano (bADN) tiene efectos inmunoestimulantes en células NK.

1.4.4 PRODUCTOS DE ORIGEN BOTÁNICO.

Existen varios estudios con extractos formulados obtenidos partir de varias plantas medicinales tales como: *Withania somnifera*, *Tinospora cordifolia* y *Asparagus racemosus*, demostrando actividad inmunoestimulante significativa, particularmente a nivel humoral en sistemas experimentales con y sin inducción de inmunosupresión (Patwardhan 1990, Ziauddin 1996, Agarwal 1999, Patwardhan 2000).

Un extracto acuoso de *Asparagus racemosus*, se ha reportado como un potencial inmunoadyuvante, ya que se le ha evaluado valorando parámetros serológicos y hematológicos, observándose un aumento en el título de anticuerpos en contra de *Bordetella pertussis*, así como una inmunidad protectora; además, se observaron resultados terapéuticos benéficos, tanto en morbilidad como en mortalidad (Gautam., 2004).

Se ha reportado el aumento de la actividad fagocítica y la producción de peróxido de hidrógeno en macrófagos al utilizar concentraciones bajas de una fracción acuosa (2 alcaloides) de *Ipomea carnea*, una planta tóxica brasileña (Hueza, 2003).

2. JUSTIFICACIÓN.

A partir de los resultados tan alentadores que se han obtenido con el uso de extractos leucocitarios, muchos investigadores han realizado una gran cantidad de estudios con el propósito de caracterizarlos, mejorarlos; así como evaluar sus efectos tanto en el área veterinaria, como en humanos. Aunado al uso indiscriminado de los antibióticos que ha provocado el aumento de la resistencia de los microorganismos a estos, hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

De esta manera, se están probando los efectos inmunomoduladores, de una variante patentada de un extracto leucocitario, para que pueda ser utilizado como una alternativa en la terapia de varias enfermedades que hasta el momento son difíciles de erradicar, o bien en las cuales los tratamientos actuales no son del todo eficaces.

Como ya se ha demostrado, la especificidad de la respuesta inmune se transfiere de un individuo sensibilizado a otro no sensibilizado por medio de células y algunos productos derivados de éstas, como son los diferentes dializados y el factor de transferencia, los cuales se producen a partir de células de individuos sensibilizados (e incluso de individuos no sensibilizados).

2. HIPÓTESIS

El extracto leucocitario activado (ELA) específico e inespecífico según corresponda, producirá inmunomodulación de la repuesta inmune en ratones: esperando un aumento en la activación de la respuesta tanto celular (DTH), como humoral (anticuerpos anti-eritrocitos de carnero), el aumento del peso del bazo, el aumento en la cantidad células blancas, así como un incremento en la inmunidad inespecífica (fagocitosis), en el modelo de experimentación utilizado.

3. OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluación de la capacidad inmunomoduladora de un extracto leucocitario activado (ELA) en ratones.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Determinar el efecto de ELA en los niveles de las poblaciones celulares sanguíneas. (Glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, PMN).
- 2) Determinar la actividad de ELA en el peso del bazo.
- 3) Estudiar el efecto de ELA en el índice fagocítico, tanto, *in vitro* como *in vivo* (técnica del carbono coloidal)
- 4) Analizar la influencia de ELA en la respuesta de anticuerpos contra eritrocitos de camero.
- 5) Determinar el efecto de ELA en el desarrollo de la hipersensibilidad retardada.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/C, de aproximadamente 25 gr de peso, mantenidos con alimento comercial (Purina, Inc.) y agua *ad libitum*.

5.2 PRODUCCIÓN DEL ELA

El extracto leucocitario activado (ELA) utilizado en este trabajo fue preparado de acuerdo a una metodología que se encuentra actualmente en proceso de patente; de manera general se puede mencionar que se obtuvo a partir de leucocitos de ratones sensibilizados (con albúmina sérica bovina) y no-sensibilizados (de acuerdo al experimento correspondiente), sometiendo dichas células a un tratamiento de modificación del ciclo celular y a un proceso especial de activación de la síntesis de proteínas por métodos artificiales, en donde se obtuvieron moléculas menores a 5 kda, que incluyen derivados de nucleótidos, proteínas de bajo peso molecular y restos de polisacáridos.

Cabe mencionar que dicho extracto leucocitario fue proporcionado por otro grupo de investigación para realizar las pruebas mencionadas en el presente trabajo.

Una unidad de este extracto se entiende como el producto obtenido a partir de 100,000 células.

5.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.

El siguiente diagrama de flujo muestra la secuencia de las actividades experimentales desarrolladas.



Fig.2. Diagrama de flujo que muestra de manera general las actividades realizadas durante el trabajo experimental.

5.4 EFECTO DEL ELA EN LOS NIVELES DE POBLACIONES CELULARES SANGUÍNEAS. [glóbulos rojos (GR), glóbulos blancos (GB). polimorfonucleares (PMN), plaquetas y linfocitos].

Se formaron 2 grupos de ratones, de 15 animales cada uno: el grupo 1 fue inoculado con 0.1 ml de SSF por vía subcutánea, el grupo 2 fue inoculado con una unidad de ELA en 0.1 ml de SSF, por la misma vía. Los ratones se sacrificaron a los siete días realizándose mediciones hematológicas, utilizando las siguientes técnicas de rutina (descritas en el apéndice 9.1):

- a) Cuantificación de células rojas.
- b) Cuantificación de leucocitos.
- c) Cuenta diferencial (polimorfonucleares y linfocitos)
- d) Cuenta de plaquetas.

Para cada grupo se calcularon los promedios de los valores hematológicos obtenidos (Davidsohn & Henry, 1978).

5.5 DETERMINACIÓN DEL PESO RELATIVO DEL BAZO.

Se utilizaron 3 grupos de 18 ratones cada uno, al grupo 1 se le inoculó albúmina sérica bovina (ASB) como antígeno (0.1 ml de solución al 1%), al grupo 2, una unidad de ELA en 0.1ml de SSF y al grupo 3 se le inoculó solamente 0.1 ml de SSF, todos los grupos por vía subcutánea.

Se sacrificaron 3 animales de cada grupo en periodos de: 3, 5, 7, 14, 21, 28 días postinoculación, a los cuales se les removió el bazo Para obtener en todos

los casos el peso relativo del bazo (peso relativo del bazo = peso del bazo/ peso del animal) (Romero-Rojas, 2001).

5.6 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE FAGOCITOSIS *IN VITRO*.

Se utilizaron 3 grupos de 15 ratones cada uno, dos de estos grupos fueron infectados por vía aerosol, con 10^9 UFC de *M. tuberculosis* (animales con 15 días post-infección), dichos animales, ya infectados, fueron proporcionados por otro grupo de trabajo.

Al grupo 1 le fue inoculado 0.1 ml de SSF, por vía subcutánea. Al grupo 2 se le inoculó una unidad de ELA en 0.1 ml de SSF por la misma vía. El grupo 3 consistía en ratones sanos inoculados con SSF.

Dos horas después de las inoculaciones se obtuvieron muestras de sangre de todos los animales y se determinó la capacidad fagocítica.

Para calcular el porcentaje de fagocitosis *in vitro* se utilizó la siguiente metodología:

- a. Preparación de granulocitos. Se obtuvo sangre completa fresca, la cual se dejó coagular sobre un portaobjetos limpio, se retiró el coágulo cuidadosamente y se lavaron los granulocitos adheridos utilizando una gota de SSF.
- b. Preparación de la suspensión de levadura. Levadura regular de pan suspendida en SSF, se colocó en autoclave a 120°C por 15 min, se filtró dos veces a través de una gasa estéril y se ajustó a una densidad de 3.7×10^7 cels/ml.

c. Prueba de fagocitosis: Los PMN adheridos al portaobjetos se cubrieron con 200 μ l de la suspensión de levadura. Se incubó la mezcla 30 min a temperatura ambiente y se contaron las células que ingerieron más de tres levaduras.

d. Cálculo de porcentaje de fagocitosis (%F). Número de células con más de tres partículas ingeridas / número total de granulocitos.

El porcentaje de fagocitosis *in vitro* indica el número de neutrófilos y macrófagos que ha ingerido las partículas extrañas (levadura) como parte de la inmunidad inespecífica, es decir como parte de las primeras líneas de defensa en contra de agentes extraños (Rose & Bigazzi, 1973).

5.7 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE FAGOCITOSIS *in vivo*. TÉCNICA DE LA ELIMINACIÓN DE CARBÓN COLOIDAL.

Dos horas antes de la realización de la prueba, a dos grupos de ratones de 15 animales cada uno, se les inoculó lo siguiente: al grupo 1 se le inyectó 0.1 ml SSF libre de pirógenos y al grupo 2 se le aplicó 1 unidad de ELA en 0.1 ml de SSF, ambos grupos por vía subcutánea.

Una vez transcurrido el tiempo, a cada uno de los ratones se les inyectó, por la vena caudal, una suspensión de 0.3 ml de tinta china en coloide (Indian ink, Rotring Art), precalentada a 37°C (1.6 ml. de tinta diluida en aprox. 8.4 ml de solución de gelatina en NaCl al 1%).

Posteriormente se tomaron muestras de sangre a intervalos de aproximadamente 0, 3, 7, 10 y 30 min a través plexo retroorbital (25 μ l de sangre

en 2 ml de agua destilada, para lisar los eritrocitos) y se midió la absorbancia de cada muestra a 650 nm.

Las lecturas del logaritmo de la absorbancia graficadas contra el tiempo dan aproximadamente una línea recta y son un indicador del grado de funcionamiento fagocítico del sistema retículo endotelial (Kaklamani y col., 1991).

5.8 EFECTO DEL ELA EN LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS EN CONTRA DE ERITROCITOS DE CARNERO.

Esta prueba se realizó utilizando dos grupos de ratones de 35 animales cada uno; los cuales fueron inoculados subcutáneamente con 0.1 ml de eritrocitos de carnero al 1% (inóculo único), dos horas después, se inoculó al grupo 1 una unidad de ELA en 0.1 ml y al grupo 2 se le aplicó 0.1 ml de SSF.

Los ratones fueron sacrificados en grupos de 5 animales cada uno a los días 0, 3, 5, 7, 14, 21 y 28, obteniéndose muestras de sangre para determinar los títulos de anticuerpos hemaglutinantes.

Se prepararon diluciones dobles de suero de la sangre de los ratones, colocando en cada pozo 0.1 ml de la muestra con 0.1 ml de eritrocitos de carnero al 2% en SSF. La mezcla fue incubada a 37°C por 15 min. La última dilución del suero que presentaba aglutinación fue designada como el título hemaglutinante.

El título de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero es un indicador de la inmunidad humoral, el cual nos muestra la cantidad de anticuerpos que se producen en contra del antígeno específico (eritrocitos de carnero).

El hecho de haber realizado una sola inoculación de antígeno nos indica que los anticuerpos evaluados en esta prueba pertenecen a la clase IgM, los cuales son los responsables de la respuesta primaria (Romero-Rojas, 2001).

5.9 EFECTO DEL ELA EN EL DESARROLLO DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA (DTH).

Se trabajaron dos grupos de ratones, de 5 animales cada uno. El grupo 1 fue inoculado subcutáneamente con SSF y el grupo 2 fue inoculado por la misma vía con una unidad de ELA específico para ASB en 0.1 ml SSF.

Dos horas después, los dos grupos de animales fueron inoculados en el cojinete plantar de una de sus patas, con 0.01 ml de ASB al 0.1% en SSF, y en la otra pata de igual manera se les inyectó 0.01 ml de SSF.

A las 24 hr se determinaron los grosores de los cojinetes con la ayuda de un micrómetro (Mitutoyo, Japón). El grado de reacción se calculó de la siguiente manera:

Grado de reacción (mm) = (grosor del cojinete después del desafío - grosor del cojinete antes del desafío) - grosor neto del cojinete contralateral inyectado con SSF estéril.

La inflamación que aparece 24 hr después de la introducción de un antígeno en un individuo presensibilizado, se debe a la acción de los linfocitos Th1 específicos contra el antígeno, con la participación de diversas Interleucinas, como IL-2 o el IFN γ , macrófagos y linfocitos T CD8 $^{+}$, responsables de la inflamación y de la activación celular (Cher & Mossman, 1987).

5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados de todos los experimentos fueron analizados para determinar su significancia estadística, utilizando una prueba t-student para muestras pequeñas con un 95% de confianza ($p = 0.05$), determinando con esto los intervalos de confianza para cada variable estudiada.

La estadística se realizó utilizando una técnica de comparación de medias por pruebas de hipótesis, con un nivel de confianza del 95% (Hurley y col. 1986).

6. RESULTADOS.

El siguiente capítulo presenta los resultados obtenidos siguiendo la metodología descrita en el capítulo anterior, los cuales se muestran siguiendo la misma secuencia en que fueron descritos.

6.1 EFECTO DEL ELA EN EL CONTEO DE POBLACIONES CELULARES SANGUÍNEAS.

La figura 3 muestra el efecto que tuvo la inoculación de ELA en las poblaciones sanguíneas, a los 7 días de su aplicación.

Observándose en primer lugar que los niveles de células rojas no presentaron variación significativa en los ratones tratados con ELA comparados con los ratones control inoculados con SSF.

Pero si observamos un incremento significativo en todas las poblaciones de células blancas evaluadas, así como en el conteo de plaquetas de los ratones inoculados con el ELA, comparando los resultados con los obtenidos de los ratones control inoculados con SSF, siendo más notables los referentes al conteo de polimorfonucleares y leucocitos.

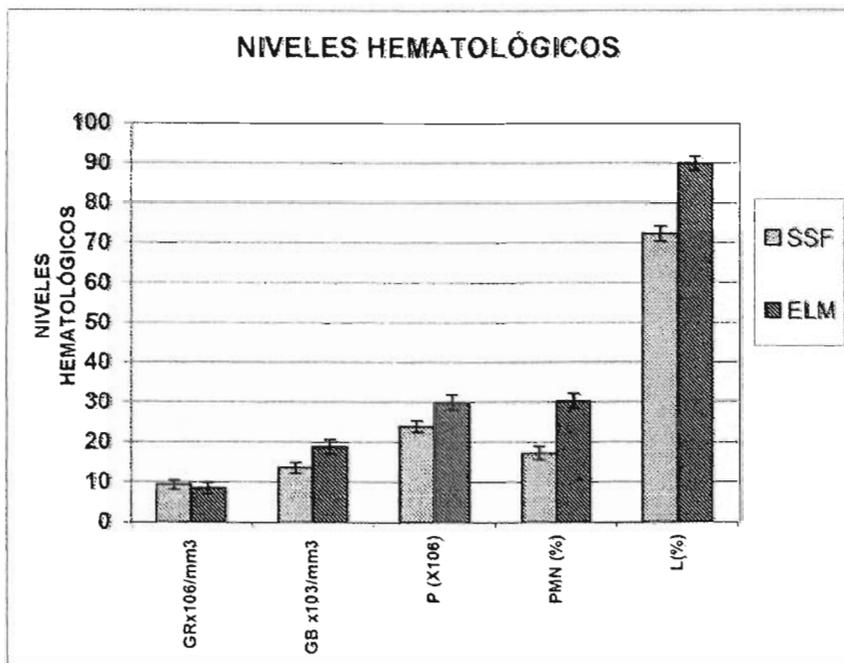


Fig. 3. Efecto del ELA en el conteo de poblaciones celulares sanguíneas obtenidos de 2 grupos de ratones de 15 animales c/u. El grupo control inoculado con 0.1 ml de SSF y el grupo 2 con 0.1 ml de ELA, las muestras fueron analizadas 7 días después de las inoculaciones.

GR= GLÓBULOS ROJOS, GB= GLÓBULOS BLANCOS, P= PLAQUETAS, PMN= POLIMORFONUCLEARES L= LEUCOCITOS. ELA= Extracto leucocitario mejorado. Las barras de error muestran los intervalos de confianza, p= 0.05. n= 15 animales para cada determinación.

6.2 EFECTO DEL ELA EN EL PESO RELATIVO DEL BAZO.

La figura 4 muestra los valores obtenidos del peso del bazo de los animales inoculados con ELA comparados contra los animales inoculados con un antígeno (ASB), así como, con los ratones control inoculados con SSF. En dicha figura podemos observar que la inoculación del ELA incrementa el peso relativo del bazo más rápido (día 3), aunque fue disminuyendo progresivamente a los días 5, 7, 14, 21 y observándose que incluso al día 28 presentaban un valor menor al obtenido en los ratones inoculados con SSF.

Con lo que respecta a los resultados obtenidos, cuando se inocular el antígeno; podemos notar que el peso del bazo aumento presentando su máximo al día 14 post-inoculación, aunque desde el día 5, ya se puede observar un incremento significativamente mayor, conservándose dicho incremento hasta el día 28.

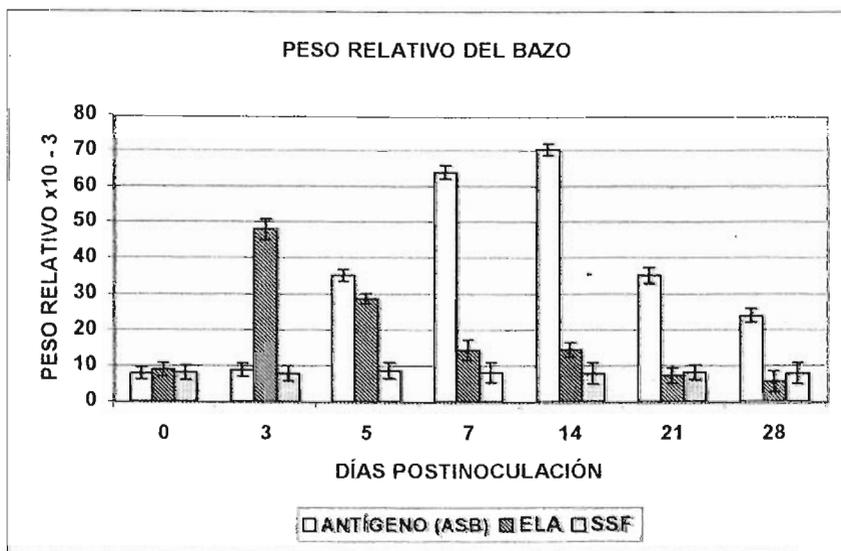


Fig. 4. Determinación del peso relativo del bazo de 3 grupos de ratones de 18 animales cada uno. Al grupo 1 se les inoculó 0.1 ml de ASB, al grupo 2 se le inocularon 0.1 ml de ELA y al grupo 3, se le aplicó 0.1 ml de SSF. Se sacrificaron 3 ratones de cada grupo a los días 3, 5, 7, 14, 21 y 28. Obteniéndose el peso relativo del bazo con la siguiente fórmula: peso relativo de bazo = peso del bazo / peso del animal.

ASB = Albúmina Sérica Bovina. SSF = Solución Salina Fisiológica. Las barras de error representan los intervalos de confianza $p=0.05$. N =3 grupos de 18 ratones c/u.

6.3 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE FAGOCITOSIS *IN VITRO*.

En la figura 5 se presentan los valores obtenidos del porcentaje fagocítico en ratones infectados con *M. tuberculosis* inoculados con ELA comparados con ratones infectados sin ELA y ratones no infectados como control, en donde se puede observar, que los tres grupos se comportaron de manera muy similar a excepción de los días 7 y 14 posteriores a la inoculación, lo que podemos notar es que se manifestó un decremento estadísticamente significativo en la fagocitosis de los ratones que no habían sido tratados con ELA.

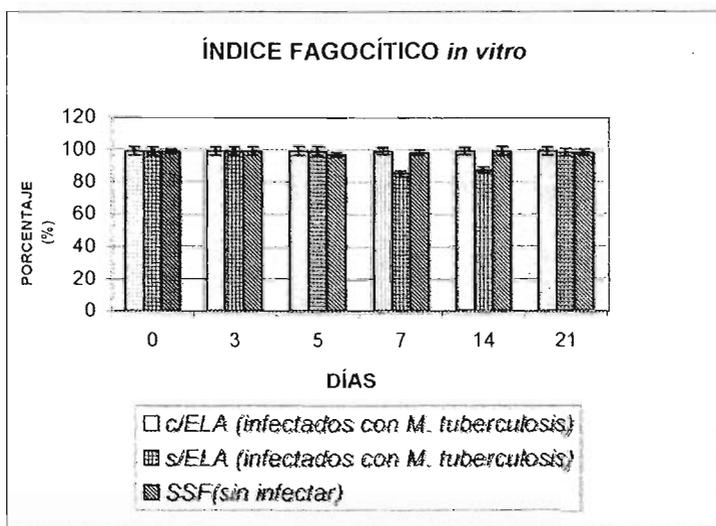


Fig. 5. Determinación del porcentaje de fagocitosis *in vitro*. El histograma muestra los resultados obtenidos. Se trabajaron tres grupos de ratones, de los cuales 2 de ellos fueron inoculados 10 días antes con *M. tuberculosis*, el tercer grupo consistía en ratones sin inocular. Al grupo 1 se le inoculó ELA, al grupo 2 SSF, 2 hrs después se obtuvieron muestras de sangre y se determinó el índice fagocítico utilizando como partículas digeribles levadura de cerveza. Por ciento de fagocitosis = No. de células con más de dos partículas ingeridas / No. Total de granulocitos.

ELA = Extracto Leucocitario Mejorado, SSF = Solución Salina Fisiológica. Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$. $n = 45$ ratones (15 ratones para cada grupo).

6.4 EFECTO DEL ELA EN LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA *in vivo*: (ELIMINACIÓN DE CARBÓN COLOIDAL).

Podemos observar en la figura 6 que la inoculación del ELA en los ratones aceleró el tiempo de eliminación del carbón coloidal a partir de día 3, disminuyendo progresivamente con respecto al tiempo de la prueba hasta desaparecer totalmente al los 30 min.

Comparado con el control inoculado solamente son SSF, notamos que la eliminación del coloide siempre fue más lenta ya que incluso a los 30 min se encontraba aún presente.

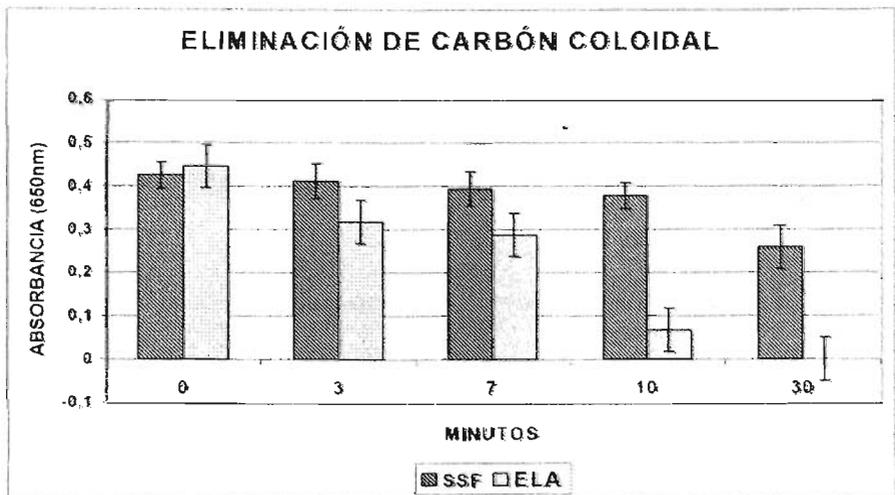


Fig. 6 Efecto del ELA en la actividad fagocítica *in vivo*: (eliminación de carbón coloidal). La gráfica muestra los valores de absorbancia a 650 nm obtenidos al inocular a un grupo de ratones el ELA y a otro grupo SSF (grupo control): Dos horas después de inocular tinta china en coloide, para posteriormente obtener muestras de sangre del plexo retroorbital a diferentes tiempos.

ELA = extracto leucocitario mejorado. SSF = solución salina fisiológica. N = 15, en cada grupo. Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p=0.05$

6.5 EFECTO DEL ELA EN LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS EN CONTRA DE ERITROCITOS DE CARNERO.

En la figura 7 podemos notar que al día 5 los ratones inoculados con el ELA presentaron un título mayor, al día 7 se mantuvieron igual y los días subsiguientes fueron menores los títulos de anticuerpos hemaglutinantes anti-eritrocitos de carnero, comparados con los títulos producidos por los ratones del grupo control inoculados con solución salina, ya que este último grupo presentó su máximo al día 14 y mantuvo resultados más altos que los ratones tratados con el ELA, los días 21 y 28.

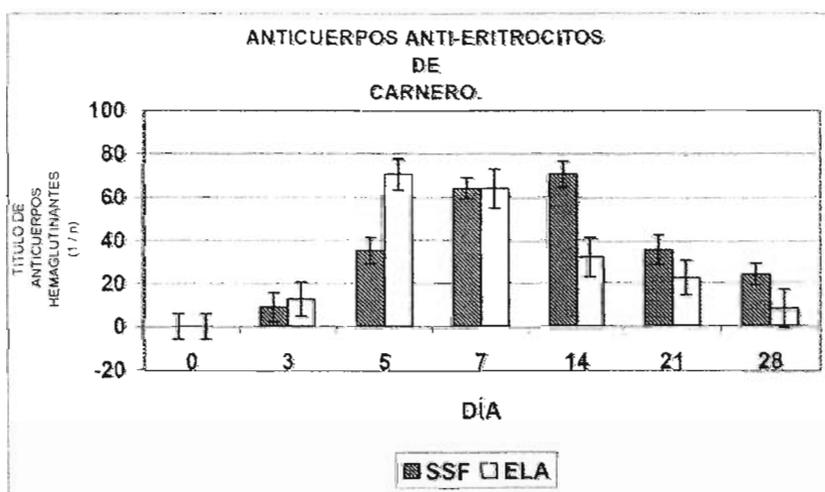


Fig. 7 Efecto del ELA en la producción de anticuerpos en contra de eritrocitos de carnero. A dos grupos de ratones se inocularon intradérmicamente eritrocitos de carnero, 2 hr después al grupo 1 se le inoculó el ELA y al segundo grupo SSF, se tomaron muestras de sangre a los días 3,5,7,15,21 y 28 y se determinó el título de anticuerpos hemaglutinantes producidos.

ELA= Extracto Leucocitario Mejorado. SSF= Solución Salina Fisiológica. Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p=0.05$. $N=35$ animales en ambos grupos.

6.6 EFECTO DEL ELA EN EL DESARROLLO DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA (DTH).

La figura 8 muestra los valores del grado de reacción (DTH) de ratones Balb/c tratados con ELA específico para ASB y con SSF respectivamente. Los valores se obtuvieron de acuerdo a los cálculos descritos en la sección de métodos. El histograma muestra un aumento estadísticamente significativo de la inflamación del cojinete plantar de los ratones inoculados con el ELA específico comparado con la inflamación presentada en los ratones tratados solamente con SSF.

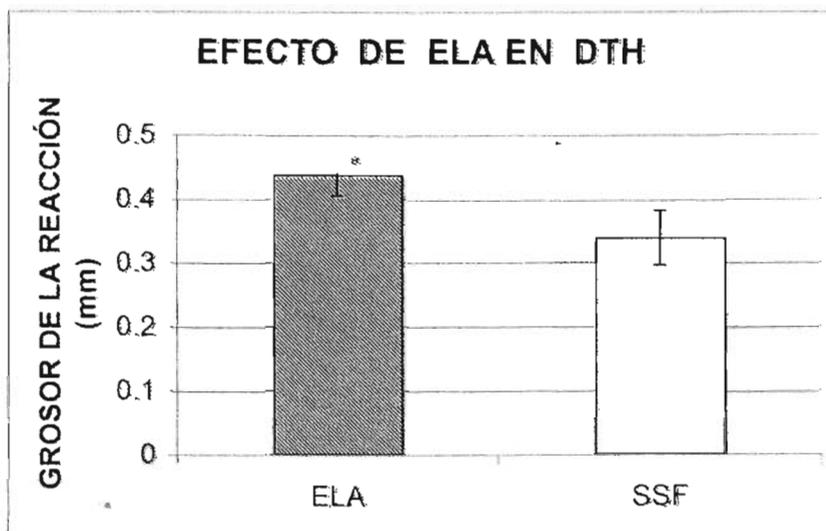


Fig. 8 Efecto del ELA en el desarrollo de hipersensibilidad retardada (DTH). El histograma muestra los resultados obtenidos del grado de induración a las 24 hr de haber sido inoculados dos grupos de ratones, uno control inoculado con SSF y el otro grupo inoculado con ELA específico para ASB. Se determinó el grado de induración utilizando la fórmula descrita en la técnica.

DTH = Hipersensibilidad Retardada. SSF = Solución Salina Fisiológica. ASB = Albúmina Sérica Bovina. ELA = Extracto Leucocitario Mejorado. Las barras de error representan el intervalo de confianza, $p=0.05$. N=5 animales por grupo.

7. DISCUSIÓN.

Es a principios de los años 40 cuando Landsteiner y Chase describieron por primera vez la transferencia de la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) de un donador inmune a uno no inmune utilizando para ello células de exudado peritoneal de cobayo sensibilizados con cloruro de picilo y un extracto de *Mycobacteria* conocido hasta la fecha como tuberculina. Las células de los animales sensibilizados fueron transferidas a los receptores no sensibilizados y éstos adquirirían la capacidad de expresar la respuesta inmune celular de los donadores; en estudios posteriores se demostró que esta transferencia de inmunidad era mejor cuando se realizaba entre donadores y receptores que tuvieran alguna relación y sólo cuando se usaban células intactas y vivas, porque las células muertas ya no servían para esta transferencia. Fue en 1949 cuando se probó este fenómeno en humanos, lo cual despertó un gran interés que llevó al desarrollo de diferentes terapias que se basan en la manipulación del sistema inmune (inmunomodulación) (Lawrence 1954). En 1955 se demostró que esta reacción llamada de hipersensibilidad retardada (DTH) podía ser transferida por extractos leucocitarios solubles y dializables, llamando al componente activo Factor de Transferencia. En los años siguientes a 1963, la investigación de este fenómeno de transferencia inmunitaria permaneció estancada, sin embargo en los años 70 se utilizó en el síndrome de Wiskott-Aldrich *in vivo* e *in vitro* confirmándose con esto que el factor puede ser utilizado en otros padecimientos (Fudenberg, 1993), además en 1973 se demostró que el factor tenía la capacidad de inducir la producción de citocinas en respuesta a antígenos específicos, así como la resistencia a la infección en pacientes con inmunodeficiencias primarias (Levin, 1973). Actualmente, está muy claro que la actividad del FT es antígeno específica (Rozzo y Kirkpatrick, 1993).

En el presente trabajo se muestran los efectos en el sistema inmune de un extracto mejorado de leucocitos (extracto leucocitario activado, ELA), que ha sido considerado de segunda generación el cual mantiene la capacidad de modulación de la respuesta inmune, con una reducción considerable de las etapas de

producción utilizando un proceso de sensibilización y activación *in vitro* por medio de técnicas ya patentadas (Hadden, 1992), dicho procesos ha sido utilizado originalmente para producir mezclas de citocinas en forma natural que ya han sido probadas para su uso en distintos tipos de cáncer, obteniéndose con estos un relativo éxito como tratamiento preoperatorio de los procesos neoplásicos.

Aún no se conocen completamente los mecanismos de acción del FT sin embargo se han observado muchos efectos, de todos ellos destacan dos: el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad retardada (*in vivo*) y secreción de citocinas *in vitro*. La posibilidad de transferir las reacciones de hipersensibilidad a un individuo receptor es hasta el momento la propiedad más importante del FT, en este trabajo se demostró que el extracto leucocitario mejorado también indujo reacciones de hipersensibilidad en los individuos receptores, así mismo indujo cambios notables en la celularidad de los animales inoculados, sobresaliendo el aumento que produjo en el número de linfocitos y polimorfonucleares, que tal vez refleje un efecto al nivel de médula ósea y hematopoyesis.

En cuanto a la funcionalidad de las células T de pacientes tratados con FT se ha encontrado que se incrementa la actividad citotóxica específica contra células tumorales (Kirkpatrick, 1993). Otros ejemplos de los efectos *in vitro* de la administración del FT, incluyen incremento en la activación de los macrófagos y en la producción de IL-1 que favorece la producción de MIF (factor de inhibición de la migración) y aumenta la citotoxicidad mediada por anticuerpos (CMA), incrementa la reactividad de los linfocitos en cultivos mixtos y la reacción de rechazo a transplantes, también promueve la quimiotaxis de leucocitos (Kirkpatrick, 1997).

El ELA incrementó de manera más acelerada el peso relativo del bazo. Al tercer día post-inoculación, se observó el pico más alto en la gráfica aunque posteriormente fue disminuyendo, en comparación con los resultados obtenidos del grupo inoculado con el antígeno (ABS), ya que éste presentó su resultado más alto al día 14, pero desde el día 5 fue mayor comparado con el grupo tratado solamente con el ELA, lo anterior reflejaría un efecto de tipo adyuvante impulsando el arresto y proliferación de clonas de linfocitos B y T así como la

activación de monocitos y células dendríticas presentes en este órgano con el consiguiente aumento de peso de este órgano inmunológicamente importante.

Otro hallazgo que se relaciona con los reportados por Kirkpatrick (1997) es mantener la capacidad fagocítica de los animales infectados con *M. tuberculosis*, ya que los animales infectados y tratados con el ELA presentaron una capacidad fagocítica igual a la de los ratones que no estaban infectados, ni tampoco inoculados con extracto, pero la actividad de los ratones infectados y que no recibieron el extracto, los días 7 y 14, disminuyeron sus niveles de fagocitosis, recuperándose posteriormente al día 21. Esto nos habla de una actividad directa en las células fagocíticas. En los experimentos futuros se deberá tratar de rastrear los marcadores celulares que expresan o son inducidos por la presencia del ELA para tener una idea del (os) mecanismo (s) de activación de estas importantes células.

Este efecto activador de la fagocitosis fue corroborado con otra prueba que mide la eliminación directa de carbón coloidal que se encuentra en circulación de ratones inoculados experimentalmente, y en donde se encontró una aceleración de esta eliminación en animales inyectados con el ELA, evaluado dicha eliminación en un tiempo de 30 min, donde observamos que los animales tratados con el ELA eliminaron más rápida y totalmente el coloide que los ratones control, ya que estos al tiempo 30 min, todavía no lo eliminaban completamente.

Un fenómeno que se encontró en este trabajo y que es novedoso en cuanto a los hallazgos de la actividad de otros extractos leucocitarios es el aumento de la inducción de anticuerpos anti-glóbulos rojos de camero en ratones al día 5, en comparación con el control que muestra su título más alto al día 14, lo cual habla de nuevo, junto con el aumento del tamaño del bazo, de un importante efecto que impulsa la proliferación quizá policlonal de linfocitos B (efecto adyuvante) provocando el aumento considerable y a corto plazo del tamaño de este órgano; es probable que este fenómeno se deba a la inducción de un grupo de citocinas que activen la producción de anticuerpos o quizá a la estimulación directa de las células por las moléculas presentes en el ELA.

En el contexto anterior, observando que el ELA es un inductor o estimulador de respuesta inmune celular se despiertan muchas expectativas en la terapia de diversas patologías incluyendo el cáncer. La respuesta celular es el principal medio para eliminar las células cancerosas, cuando se reportó que el FT era capaz de incrementar esta respuesta, se iniciaron muchos ensayos para utilizarlo en pacientes con cáncer en un intento de aumentar la respuesta inmune contra las células tumorales.

8. CONCLUSIONES.

1. Los valores de células rojas, no aumentaron al ser tratados los ratones con el ELA.
2. Las poblaciones de leucocitos si presentaron variaciones en cuanto a la cantidad de células al inocular ELA a los animales.
3. La inoculación del ELA a ratones hace que el peso relativo del bazo aumente a los tres días de la inoculación, aunque disminuye posteriormente, a valores más bajos que los obtenidos después de la inoculación con el antígeno (ASB), dicho aumento se presenta en un tiempo más corto.
4. La inoculación del ELA en ratones infectados con *M. tuberculosis* mejoró el funcionamiento de la fagocitosis *in vitro*, llevándola a niveles casi normales en los días 7 y 14.
5. La inoculación del ELA mejora el proceso de fagocitosis *in vivo* al eliminar más rápido el carbón coloidal.
6. La producción de anticuerpos específicos en este caso contra de eritrocitos de carnero se produce en un tiempo más corto en animales inoculados con ELA, que en animales sin el extracto leucocitario mejorado.
7. La inmunidad celular, representada por la reacción de DTH aumentó en animales inoculados con ELA específico para ASB.

9. APÉNDICES

9.1 TÉCNICAS DE CONTEO DE POBLACIONES CELULARES.

I) CONTEO DE CÉLULAS ROJA.

- a. Se llenó la pipeta de toma de eritrocitos hasta la marca de 0.5 con sangre conteniendo anticoagulante.
- b. La pipeta inclinada aproximadamente 45° se giró mientras se llenaba con el líquido de Hayen hasta la marca de 101.
- c. Tapando con el dedo el extremo inferior de la pipeta, se retiró con cuidado el tubo de aspersión.
- d. Tomándola entre los dedos índice y pulgar se sometió la pipeta a agitación durante 3 min.
- e. Se tiraron las primeras cinco gotas y se llenó la cámara hematocitométrica por capilaridad, sin que se derramara por los canales y a su vez quedara la superficie bien cubierta.
- f. Se dejó reposar 3 min y se observó al microscopio.
- g. Se realizó la cuenta de eritrocitos en 5 de los 25 cuadros pequeños del centro (los cuatro extremos y el del centro) de la cámara de Neubauer.
- h. Para conocer el valor eritrocitario, a la suma de eritrocitos contados se le agregaron cuatro ceros y el resultado se expresó en eritrocitos por mm^3 .
- i. La cuenta se hizo por triplicado, se calculó la media y la desviación estándar y se hizo la gráfica correspondiente en forma de histograma con los valores promedio de cada una de las sustancias evaluadas.

II) CONTEO DE LEUCOCITOS.

- a. Se llenó la pipeta de toma de eritrocitos hasta la marca de 0.5 con sangre con anticoagulante.

- b. La pipeta inclinada aproximadamente 45° se giró mientras se llenó con el líquido de Hayen hasta la marca de 11.
- c. Tapando con el dedo el extremo inferior de la pipeta, se retiró con cuidado el tubo de aspiración.
- d. Tomándola entre los dedos índice y pulgar se sometió la pipeta a agitación durante 3 min.
- e. Se tiraron las primeras cinco gotas y se llenó la cámara hematocitómetrica por capilaridad, sin que se derramara por los canales y a su vez quedara la superficie bien cubierta.
- f. Se dejó reposar tres min y se observó al microscopio.
- g. Se realizó la cuenta de leucocitos en 4 cuadrículas grandes de los extremos de la cámara de Neubauer.
- h. Para conocer el valor leucocitario, se obtiene el promedio de la suma de leucocitos contados y se multiplicó por 50 y el resultado se da en leucocitos por mm^3 .
- i. La cuenta se hizo por triplicado, se calculó la media y la desviación estándar y se hizo la gráfica correspondiente en forma de histograma con los valores promedio de cada una de las sustancias estudiadas.

III) CONTEO DE PLAQUETAS.

- a. Se cargó con sangre una pipeta para cuenta de glóbulos rojos hasta la marca de 0.5 y se llena con líquido de dilución (oxalato de amonio) hasta la marca de 101.
- b. Se agitó la mezcla por 15 min.
- c. Se cargó la cámara de Neubauer y se dejó reposar por 10 min en una cámara húmeda.
- d. Se contaron las plaquetas en toda la cuadrícula central con el microscopio de contraste de fases y a mayor aumento.

- e. La cifra obtenida se multiplica por 2000 dando el número de plaquetas por mm^3 .

IV) CUENTA DIFERENCIAL POLIMORFONUCLEARES.

- a. En el extremo de un portaobjetos, limpio y desengrasado se depositó una pequeña gota de sangre recién extraída y con anticoagulante.
- b. Otro portaobjetos con bordes esmerilados se colocó en un ángulo de 45° sobre la gota de sangre y se dejó difundir por capilaridad a lo largo de la arista del portaobjetos, con un movimiento suave se realizó la extensión de sangre lo más delgada posible.
- c. Se dejó secar la extensión al aire libre para evitar la ruptura de las células.
- d. En una cámara de tinción conteniendo colorante de Wright se colocó la extensión seca durante 3 min.
- e. Sin escurrir ni secar la extensión se coloca en otra cámara de tinción conteniendo agua destilada durante 5 min.
- f. Una vez transcurrido ese tiempo se saca de la cámara y se deja secar.
- g. Se observa al microscopio y se hace el conteo diferencial por triplicado.
- h. Se calcula la media y desviación estándar y se hace la gráfica correspondiente en forma de histograma con los valores promedio.

9.2 TABLAS

I) VALORES HEMATOLÓGICOS.

	GR x10 ⁶ /mm ³	GB x10 ³ /mm ³	P (X10)	PMN (%)	L (%)
SSF	9,2	13,6	24	17,2	72,3
ELA	8,5	18,9	29,98	30,4	90

TABLA 1. Muestra los valores hematológicos promedio obtenidos en los animales inoculados con el ELA y de animales inoculados con SSF.

ELA= Extracto Leucocitario Mejorado, SSF= Solución Salina Fisiológica, GR= Glóbulo Rojos, GB= Glóbulos Blancos, P= Plaquetas, PMN= Polimorfonucleares y L= Leucocitos

II) PESO RELATIVO DEL BAZO.

GRUPO	DÍAS	0	3	5	7	14	21	28
1	Antígeno (ABS)	7.9	8.8	35.2	64	70.4	35.2	24
2	ELA	8.9	48	28.8	14.4	14.4	7.2	5.6
3	SSF	8.1	7.9	8.7	8.2	7.9	8.1	7.9

TABLA 2. Valores promedio por día de los pesos relativos (g) de tres grupos de ratones. El grupo 1 consistía en animales tratados con antígeno ASB, el segundo grupo ratones inoculados con el ELA y el grupo 3 con SSF.

Pesos relativos (x 10⁻³). ELA= Extracto Leucocitario Mejorado, SSF= Solución Salina Fisiológica, ASB= Albúmina Sérica Bovina.

III) FAGOCITOSIS *IN VITRO*

GRUPO	DÍAS	0	3	5	7	14	21
1	C/ELA (infectados con <i>M. tuberculosis</i>)	99	99	99	99	99	99
2	2) S/ELA (infectados con <i>M. tuberculosis</i>)	99	99	99	85	87	98
3	3) SSF	99	99	97	98	99	98

TABLA 3. Muestra los valores promedio por día, del porcentaje de fagocitosis *in vitro*, de tres grupos de ratones. En donde los dos primeros grupos fueron previamente infectados con *M. tuberculosis*: el grupo 1 inoculado con ELA, el grupo 2 sin ELA y el grupo 3 son ratones inoculados solamente con SSF.

Los valores representan el porcentaje de fagocitosis que se conoce como índice fagocítico. ELA = Extracto Leucocitario Mejorado, SSF = Solución Salina Fisiológica.

IV) FAGOCITOSIS *IN VIVO* (carbón coloidal).

DÍAS	0	3	7	10	30
SSF	0.425	0.412	0.394	0.378	0.259
ELA	0.446	0.318	0.288	0.067	0

TABLA 4. Valores promedio obtenidos por día, de absorbancia a 650 nm en la determinación de fagocitosis *in vivo* por la técnica de eliminación de carbón coloidal a tiempo de 30 min.

ELA = Extracto Leucocitario Mejorado, SSF = Solución Salina Fisiológica.

V) PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS EN CONTRA DE ERITROCITOS DE CARNERO.

GRUPO	DÍAS	0	3	5	7	14	21	28
1	SSF	0	8,8	35,2	64	70,4	35,2	24
2	C/ ELA	0	12,8	70,4	64	32	22,4	8

TABLA 5. Título promedio por día, de anticuerpos hemaglutinantes obtenidos de dos grupos de ratones: El grupo 1 inoculado con SSF y el grupo 2 con ELA, los ratones fueron inoculados dos horas antes con eritrocitos de camero.

Los valores representan \log_2 del título de anticuerpos hemaglutinantes. ELA = Extracto Leucocitario Mejorado, SSF = Solución Salina Fisiológica.

VI) DESARROLLO DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA (DTH).

ratones	1	2	3	4	5	promedio
SSF	0.33	0.37	0.33	0.32	0.32	0.334
ELA (especifico para ASB)	0.44	0.43	0.45	0.43	0.43	0.436

TABLA 6. Valores promedio del grado de inflamación de cojinete plantar de ratones inoculados con ASB (grupo 1) y ratones inoculados con SSF (grupo 2), para determinar la respuesta de hipersensibilidad retardada

ELA= Extracto Leucocitario Mejorado, SSF = Solución Salina Fisiológica. ASB = Albúmina sérica bovina.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

10. REFERENCIAS.

1. Agarwal, R, Diwanay, S, Patki, PS, Patwardhan, BK, (1999). Studies on immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. (Ashwagandha) in experimental immune inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*. 67: 27-35.
2. Álvarez B, Ezquerro M, Gómez del Moral, Alonso F, Táres J, Marca J. y Domínguez J. (1988). Analysis of the *in vitro* effects of the compound immodulen on several parameters of the pig immune response. Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9 July 2:24.
3. Arala MP y Fundenberg HH. (1976). Specificity of transfer factor. *Nature* 262: 155-156.
4. Atkin KE, Cole BC, Sullivan GJ, Washburn LR, Wiley BB, (1986). Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen-derived from *M. arthritis*: V A small basic protein from culture supernatants is a potent T cell mitogen. *J. Immunol.* 137: 1581-1586.
5. Blencha F. (1988) Immunomodulation: A means of disease prevention in stressed livestock. *J. Anim. Sci.* 66: 2084-2090.
6. Blecha F, Reddy DN, Chitko-McKown CG, McVey DS, Chengappa MM, Goodband RD y Nelssen JL. (1995). Influence of recombinant bovine interleukin 1a and interleukin-2 in pigs vaccinated and challenged with *Streptococcus suis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44: 329-346.
7. Brunner CJ y Muscoplat CC. (1980). Immunodulatory effects of levamisol. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176: 1159-1162.
8. Bukowski RM, Deodhar S, Hewlitt JS and Greenstreet R. (1983). Randomized controlled Trial of transfer factor in stage II malignant melanoma. *Cancer* 51: 269-272.
9. Cabezas R y col., (1988). Efecto terapéutico e inmunorregulador del factor de Transferencia en el asma bronquial extrínseca. En prensa.

10. Cabezas-Quróga R, Estrada-Parra S, Padierna L, Fernández C y López P, (1990). Inmunoterapia con factor de transferencia en pacientes con Herpes zoster. *Biotecnología Aplicada*. 7: 52-57.
11. Calzada NG. (2000) Uso en lechones de factor de transferencia y parapoxvirus inactivado (Baypamun) en la vacunación contra la enfermedad d Aujezky. Tesis de Maestría. *ENCB-IPN*. México, D:F: pp.36.
12. Charles H. y Kikpatrick MD. (1989). Biological response modifiers. Interferons, interleukins and transfer factor. *Annals of allergy*: 62: 170-176.
13. Chase (1942)
14. Cher DJ and Mossman TM. (1987). Two types of murine helper T cell clone. II Delayed type hypersensitivity is mediated by Th₁ clones. *J. Immunol*. 138: 3688-3694.
15. Chung V, Florentin I y Renoux G. (1985). Effect of imuthiol administration to normal or immunodeficient mice on IL-1 and IL-2 production and immune responses regulated by these mediators. *Int. J. Immunopharmacol*. 7: 335-337
16. Coffey RG y Hadden JW. (1985). Neurotransmitters, hormones and cyclic nucleotides in lymphocyte regulation. *Trends in pharmacological sciences* 14: 169-174.
17. Corrado F, Pizza G, DE Vinci C and Corrado G. (1989). Immunotherapy with transfer factor hormone-resistan metastasized carcinoma of the prostate. *Arch. Esp Urol*. 42, suppl 2: 191-196.
18. Crusinberry R and Williams RD, (1991). Immunotherapy of renal cell cancer. *Semin. Surg Oncol* 7(4): 221-224.
19. Davidsohn Y, Henry JB. (1978). *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. 15th edn. Philadelphia. USA: Saunders 1978.
20. Dawer JM (1996). Transfer factor in the age of molecular biology; a review. *Biotherapy* 9(1-3):7-11.

21. Estrada-Parra S, Velazco CO, Reborá ML y Padierna J. (1983). Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con factor de transferencia específico. *Salud Pública, Méx.* 25: 589-600.
22. Estrada-Parra S, Nagaya A, Serrano E, Rodríguez O, Santamaría V, Ondarza R, Chávez R, Correa A, Monjes A, Cabezas R, y Estrada García I. (1998). Comparative study of transfer factor and aciclovir in the treatment of herpes zoster. *Int. J. Immunopharm.* 20: 521-523.
23. Estrada-Parra S, Cabezas Q, Velazco C., Ondarza AR, Chávez SR, Berrón PR, et al. (1999). El sistema inmune y el uso del factor de transferencia. *Ciencia UANLII (3):* 237-243.
24. Fabre RA, Pérez TM, Aguilar LD, Rangel. MJ, Estrada-García I, Hernández Pando R, Estrada-Parra S. (2004). Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol. Vol.136, no.2, pp.215-223.*
25. Fabre RA, Pérez TM, Aguilar LD, Rangel MJ, Estrada-García I, Hernández-Pando S, Estrada-Parra S (2004). Transfer Factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 136: 215-223.
26. Fernández RT: Evaluación del efecto del factor de transferencia mediante pruebas *in vitro* Tesis de licenciatura. (1985). *ENCB-IPN, México, D. F.*
27. Fudenberg HH: (1989). Transfer factor: Past, present and future. *Ann Rev Pharmacol Tóxic* 29: 475-516.
28. Fudenberg HH: 1993. Transfer factor. *New Frontiers. Progress in Drug Research.* 42:309-400.
29. Gallily R. (1989). Tumor necrosis factor as a mediator of *Mycoplasma orale* -induced tumor cell lysis by macrophages. *Cell Immunol* 121: 146-150.
30. García-Tamayo F. (1997). Fundamentos de Inmunobiología. *Edit. UNAM.México.*

31. Gautam M, Diwanay S, Gairola S, Shinde Y, Patki P, Patwardhan B. (2004). Immunoadjuvant potential of *Asparagus racemosus* aqueous extract in experimental system. *J. of Ethnopharmacology* 91: 251-255.
32. Gottlieb AA, Sizemore RC, Gottlieb MS y Kern CH. (1995). Rationale and clinical results of using leucocyte-derived immunosupportive therapies in HIV disease. *Biotherapy*. 9: 27-31.
33. Hadeen JA and Szentrivanyi A. (1996). Immunomodulators. *Immunopharmacology Reviews* 2: 361-362.
34. Hennessy K,J, Blecha F, Pollmann DS: y Kluber. EF: (1987). Isoprinosine y levamisol immunomodulation in artificially reared neonatal pigs. *Am J. Vet. Res.*48: 477-480.
35. Hueza IM, Fonseca ESM, Paulino CA, Haraguch M, Gómiak SL: (2003). Evaluation of immunomodulatory activity of *Ipomoea comea* on peritoneal cells of rats. *J. of Ethnopharmacology* 87: 181-186.
36. Kaklamani E, Korlis D, Kaklamanis Ph, Koumandakin Y, Katsougani K, Blackwell C and Weir DM. (1991). *Klebsiella pneumoniae* glycoprotein RU-41740 enhances resistance of mice against *M. arthritidis*-induced arthritis. *FEMS- Microbiology immunology* 76: 205-211.
37. Kaklamani E, Korlis D, Kaklamanis Ph, Koumandakin Y, Katsougani K, Blackwell C at al. (1991). *The effect of M. arthritidis* infection on the phagocytic activity of macrophages in rats and mice. *FEMS Microbiol. Immunol.* 76: 151-154.
38. Kirchner H, Bauer A, Moritz T, Herbst F, (1986). Lymphocyte activation and induction of interferon gamma in human leucocytes cultures by the mitogen in *M. arthritidis* supernatant (MAS). *Scand. J. Immunol.* 24: 609-13.
39. Kirkpatrick CH y Gallin JI. (1974). Treatment of infections an Neoplastic diseases with transfer factor. *Oncology* 29: 46-73.
40. Kirkpatrick CH. (1977). Transfer of cellular immunity with transfer factor. *Allergy and Clinical Immunology* 63: 71 – 73.

41. Kirkpatrick CH, Rozzo SJ y Mascali JJ. (1985). Murine transfer factor II. Transfer or delayed hypersensitivity to synthetic antigens. *J Immunol* 134: 1723-1727.
42. Kirkpatrick CH, Rozzo SJ. (1992). Purification of transfer factors. *Mol. Immunol* 29: 167-182.
43. Kirkpatrick CH, (1993). Structural nature and functions of transfer factors. *Ann NY Acad. Sci* 685: 362.
44. Lawrence HS. (1954). The transfer factor in humans of delayed skin sensitivity to the streptococcal M substance and tuberculin with disrupted leucocytes. *J. Clin. Invest.* 64: 219-230.
45. Lawrence HS. (1955). The transfer factor in humans of delayed skin sensitivity to the streptococcal M substance and tuberculin with disrupted leucocytes. *J. Clin. Invest.* 64: 219-230.
46. Levin AS. (1973). Transfer factor therapy in immune deficiency states. *Ann. Rev. med.* 24 : 174-208.
47. Mateos RA. (1992). Transfer factor immunotherapy in clinically sick lactating calves. *Vet. Mex. (Oct-Dic)* 23: 4-8.
48. Mühlradt PF, (1991). MDHM, a macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, lead to in vitro IL-1, IL-6, TNF and is pyrogenic in rabbits. *Infect Immunol.* 59: 3969-72.
49. Muñoz O, Alvarez y Muñoz, Bustamante ME, (1982). Inmunoprofilaxia en varicela. *Vacunas. Ciencia y salud.* Edit. A. Escobar, Valdespino y Sepúlveda. S.S.
50. Mulcahy G. y Quinn PJ. (1986). A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 9: 119-139.
51. Murtaugh MP. (1994) Porcine cytokines *Vet. Immunol. Immunopathol.*43: 37-44.
52. Nakajima K, Smith CV, Mixon A, Sykes M, Guzzeta PC, Spitzer TR y Sachs DH. (1992). *In vitro* and *in vivo* effects of recombinant human interleukin-2 in naïve miniature swine. *J. immunotherap.* 11: 169-175.

53. Nemirovsky MS, Homberg JC. (2003). Fundamentos de inmunología. *Ed, Trillas*. México. D: F:
54. Olsen RG y Krakiwa S. (1983). Inmunología e inmunopatología de animales domésticos. *El manual moderno*, México, D: F:
55. Padierna J, Velasco CO. y Estrada PS. (1967). Obtención de factor de transferencia específico para el tratamiento de pacientes con coccidioidomycosis. Memorias del primer congreso Nacional de Inmunología. Oaxtepec, Morelos, México. 101-104. *sociedad Mexicana de Inmunología*.
56. Padierna OL, Estrada-Parra S, Godínez MA, Argaez O, Velasco OC, Díaz JC, García E, Padierna J. Factor de Transferencia en pacientes con Herpes zoster. *Infectología año V, 11:293-298*.
57. Patwardhan BK, Kalbag D, Patki PS, Nagsampagi A. (1990). Search of immunomodulatory agents:a review. *Indian drugs 28: 56-63*.
58. Patwardhan BK. (2000). Ayurveda: the designer medicine: review of ethnopharmacology and bioprospecting research. *Indian drugs. 37: 213-227*.
59. Pilotti V, Mastroiilli M, Pizza G, De Vinci C, Bussuti L, Palareti A, Gozzeti G and Cavallari A, (1996) Transfer factor and adjuvant to non-samll cell lung cancer therapy. *Biotherapy 9 (1-3): 117-121*.
60. Poli G. (1984). Immunomodulators in Adjuvants, interferon and non-especific immunity. Ed. Cancellotti, F.M. and Galassi New York. Pp. 111-126.
61. Prassd U. (1996). Transfer factor with anti-EBV activity as an adjuvant therapy for nasopharyngeal carcinoma: a pilot study. *Biotherapy 9(1-3): 109-115*.
62. Renoux G y Renoux M. (1984). Diethylthiocarbamate (dtc) a biological augmenting agent specific for T cell In: R:L: Fenichel and M.A. Chiringos (Ed.) *Immune Modulation Agents and Their Mechanisms*. Pp. 7-20. Marcel Dekker, Inc NY.

63. Rojas B.S. (1987). Uso de suero hiperinmune y del factor de transferencia para la prevención y tratamiento de la colbacilosis neonatal en lechones. Tesis de Licenciatura. *FMVZ-UNAM*, México, D:F.
64. Romero-Rojas A, Ponce-Hernández C, Ciprián A, Estrada-Parra S and Hadden JW. (2001). Immunomodulatory properties of *Mycoplasma pulmonis*. I. Characterization of the immunomodulatory activity. *International immunopharmacology* 1: 1679- 1688.
65. Romero-Rojas A, (2001) Immunomodulatory properties of *Mycoplasma pulmonis*. II. Studies on the mechanisms of immunomodulation. *International immunopharmacology*. 1: 1689-97.
66. Romero-Rojas A, Reyes-Esparza J, Estrada-Parra S, Hadden JW. (2001) Immunomodulatory properties of *Mycoplasma pulmonis*. III. Lymphocyte stimulation and cytokine production by *Mycoplasma pulmonis* products. *International immunopharmacology*.1: 1699-1707.
67. Rose NR y Bigazzi PE. (edits) (1973). Methods in Immunodiagnosis. De. John Wiley y Sons.
68. Rozzo SJ.; Kirpatrick CH. (1992). Purification of transfer factor. *Mol. Immunology* 29: 167-182.
69. Rubistein AJ, Melamed J and Rodescu D. (1976). Transfer factor Treatment in a patient with progressive Tuberculosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 8:38-50.
70. Ruuth E, Praz F. (1989). Interactions between mycoplasmas and the immune system. *Immunol. Rev.* 112: 133-137.
71. Sauliner D, Martinod S. y Charley B. (1991). Immunomodulatory effects *in vivo* of recombinant porcine interferon- γ on leukocyte functions of immunosupressed pigs. *Annales de Recherches Veterinaries*. 22: 1-9.
72. Sher T. (1990). *In vitro* induction of TNF, tumor histolisis and blast transformation by *Spiroplasma* membranes. *J. Natl Cancer Inst.* 82: 1142-1147.

73. Spisek R, Brazova J, Rozkova D, Zapletalova K, Sediva Bartunkova J. (2004). Maturation of dendritic cells by bacterial immunomodulators. *Vaccine XXX*. 4349. 1-7.
74. Steel RW, Sieger BE, Mcnitt TR, Gentry LO and Moore WL. (1976). Theraphy for disseminated coccidiomycosis with Transfer factor from a related Donor. *Amer. J. Med.* 61: 283-286.
75. Steel RW, Myers MC and Vincent MM. (1980). Varicella infection in Chilhood Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 303: 305-359.
76. Stuart PM. (1990). Differential induction of bone marrow macrophages proliferation by mycoplasmas involves granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Infect Immunol.* 58: 3558-62.
77. Sugama K. (1990). *Mycoplasma* induce transcription and production of TNF in a monocytic cell line, THP-1, by a protein knase C-independent pathway. *Infect. Immun.* 58: 3564-9.
78. Torres MH. (1994). Efecto del factor de transferencia específico en contra de *A. Pleuropneumoniae* serotipo 5 y *P. Multocida* A en cerdos. Tesis de licenciatura. *FMVZ.UNAM*. México,D:F.
79. Vanderbark AA, Burger DR, y Veto RM. (1977). Human transfer factor activity in the guinea pig. Absence of antigen specific. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 8: 7-16.
80. Velasco OC, Estrada-Parra, García E, Martínez RM, y Castro ME. (1974). El factor de transferencia como único recurso terapéutico en un caso de Coccidiomycosis crónica anérgica. *Rev. Lat.Microbiol.* 16: 137-141.
81. Velasco OC, Ruiz R, Berrón R, Santana R, Tamayo L, Castro ME, Padierna J, Estrada-Parra S. (1976) Tratamiento con el factor de transferencia específico en Leishmaniasis tumentaria diseminada. *Libro del primer Congreso de Inmunología*. Oaxtepec, Mor., Ed. Soc. Mex de Inmunología. Pp.130.
82. Wilson GB. (1988). 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.* 32: 6-18.

83. Zapata JD, Saúl A, Roque J, Padiema J, Rojas EO, Jiménez L. y Estrada PS. (1981). Immunotherapy of two leprosy patients with specific transfer factor. National Congress of immunology: Abstrac IV. Oaxtepec. Morelos, México, D:F:
84. Ziauddin M, Phansalkar N, Patki PS, Diwanay S, Patwardthan B. (1996). Studies on immunomodulatory effects of *Ashwagandha*. *J. of Ethnopharmacology*. 50: 69-76.