

11674

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



MAESTRÍA EN CIENCIAS  
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL.

PRODUCCIÓN DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA  
CALOSTRAL BOVINO PARA USO EN EL MODELO DE GLIOMA C6

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ERIKA GEORGINA CASTILLO GUERRA

TUTOR:

DR. SERGIO ESTRADA PARRA

COMITÉ TUTORAL:

DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS

DR. JUAN ANTONIO MONTAÑO HIROSE

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO.

2005.

m345162





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico:

A aquel que es poderoso para hacer todas las cosas mucho más abundantemente de lo que pedimos o entendemos, según el poder que actúa en nosotros a él sea la gloria por los siglos de los siglos. Amén (Efesios 3:20).

A mi esposo, ya que sin su ayuda, amor y paciencia esta tesis no hubiera sido terminada.

A mi hija, por que a sido la motivación de mi vida.

A la Dr. Andrea Rodríguez Ropón, porque aun sin conocerme confío en mi y me enseñó a ver más allá de mis limitaciones.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a Dios por que sin él nada podría hacer y con el todo lo puedo en Cristo que me fortalece.

A la Dra Andrea Rodríguez Ropón por su confianza, cariño y apoyo incondicional por que no solo la considero mi maestra sino mi amiga.

Al M.C Benjamín Pineda por toda su ayuda, enseñanza y entusiasmo.

Al Medico Veterinario Alfredo Rutas por cuidar a las vacas, por el apoyo durante el tratamiento de estas, por abrimme las puertas del rancho Almaraz, y estar siempre pendiente de todo.

A mi tutor principal el Dr. Sergio Estrada Parra, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por abrimme las puertas de su laboratorio y por todo el apoyo que me brinda.

Dr Andrés Romero Rojas y a todos los muchachos del laboratorio 8 de Biología molecular de la FES-Cuautitlan campo uno, por hacerme sentir como parte de su equipo, por ayudarme de manera incondicional y prestarme de su tiempo.

Dr. Juan Antonio Montaña Hirose por su comprensión y apoyo, porque no solo encontramos en usted un maestro sino que mi esposo y yo encontramos un amigo.

A los muchachos del Laboratorio de Inmunología Molecular 1 del ENCB-IPN Azucena, Abraham, Laura y Ursino, por todos sus consejos, enseñanza, ayuda y brindarme su amistad.

A Mayra, a Ricardo y todos los miembros del laboratorio de Inmunología Molecular 2, por su aceptación, su apoyo y enseñarme a no conformarme con poco si no a perseverar para lograr un mejor trabajo.

Al Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por facilitarme las instalaciones del Bioterio y recibirme siempre con una sonrisa.

Por todos ustedes le doy gracias a Dios y recuerden que si das se te dará; Medida buena, apretada, remecida y rebosante y estoy segura que Dios les recompensara todo su apoyo. Muchas gracias.

## RESUMEN

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral más común SNC; los tratamientos utilizados han hecho poco para erradicar la enfermedad. El Factor de Transferencia (FT) es un extracto dializable de leucocitos y se considera una terapia alternativa para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer al aumentar la respuesta contra células tumorales. El calostro bovino ofrece una nueva alternativa para desarrollar un FT específico. La investigación tiene como objetivo estandarizar la metodología para la extracción del factor de transferencia calostroal (FT<sub>cal</sub>), comprobar la presencia de péptidos de bajo peso molecular en el producto y determinar su actividad *in vitro* e *in vivo*. Para realizarla se inmunizaron dos vacas con proteína de glioma C6, se colectó el calostro y se purificó el FT<sub>cal</sub> por medio de centrifugación, diálisis y liofilización. Se evaluó la presencia de péptidos por métodos cualitativos como Ninhidrina y Biuret y por el método cuantitativo de Bradford. Se confirmó la presencia de péptidos de bajo peso molecular en el producto por método de electroforesis en gel de poliacrilamida, se evaluó la producción del factor inhibidor de leucocitos (LIF) en células sin inmunidad celular hacia el glioma C6, Se realizó una prueba de DTH para evaluar la especificidad y transferencia de inmunidad, se evaluó la cinética de crecimiento del glioma C6 en función de la dilución del FT<sub>cal</sub> utilizada. Resultados: se obtuvo una concentración de 0.4550 mg/mL de proteína, se observaron bandas con un peso molecular de 4.9kDa. Se registraron resultados positivos en la producción de LIF en las células sin inmunidad celular hacia el glioma C6. La prueba de DTH presentó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los grupos tratados con FT<sub>cal</sub> ( $p < 0.001$ ) al igual que en la prueba de cinética de crecimiento de glioma C6 ( $p < 0.03$ ,  $p < 0.02$  y  $p < 0.01$ ). Los resultados permiten concluir que la metodología empleada para la obtención de FT calostroal es la adecuada y que el FT<sub>cal</sub> induce la reducción del crecimiento tumoral del Glioma C6 de rata y la producción de LIF además de ser específico y transmitir inmunidad. **Palabras claves: Glioblastoma Multiforme, Factor de Transferencia, Calostro, Péptido, Factor inhibidor de leucocitos.**

## ABSTRACT

The multiforme glioblastoma (GBM) is the most common nervous's central system tumor. The used treatments have done a few to diminish the disease. The transfer factor (TF) is a dialyzable leukocyte extract and an alternative therapy for the treatment of different types of cancer when increasing immune responses against tumoral cells. The bovine colostrum offers a new alternative to develop a specific TF. This investigation has the objective to standardize the methodology for the extraction of colostrum transfer factor (TF<sub>cal</sub>), verify the peptide presence of low molecular weight in the product and determine its activity *in vitro* and *in vivo*. In order to make the investigation post parturition colostrums samples were obtained from two dairy cows previously immunized with protein of glioma C6. The TF<sub>cal</sub> was purified by centrifugation, dialysis and lyophilization. The peptide presence was evaluated by qualitative methods like Ninhidrina and Biuret and by the quantitative method of Lowry. The peptide presence was confirmed of low molecular weight in the product by method of electrophoresis in polyacrylamide gels. The production of the leukocytes migration inhibition factor (LIF) in cells without cellular immunity to glioma C6, one DTH test was made, in order to evaluate, the specific and transference of the immunity the glioma C6 growth kinetic in function of the dilution of the TF<sub>cal</sub> used. Results: a concentration of 0,4550 mg/mL of protein in the TF<sub>cal</sub> with a molecular weight of 4.9kDa was obtained. In vitro positive results in the production of LIF in the cells without cellular immunity were registered towards glioma C6. The DTH test presented significant statistical difference between the group control and the groups dealt with TF<sub>cal</sub> ( $p < 0.001$ ) the same way of the glioma C6 growth kinetic ( $p < 0.03$ ,  $p < 0.02$  y  $p < 0.01$ ). The results allow to conclude that the methodology used for the colostrum transfer factor obtaining is adequate and that the TF<sub>cal</sub> induces the reduction of the tumoral growth of the glioma C6 in rats and the production of LIF.

**Key words: multiforme glioblastoma (GBM), Transfer Factor (TF), colostrum, peptide, leukocytes migration inhibition factor (LIF)**

## INDICE

Resumen.....	III
Abstract.....	IV
Abreviaturas.....	IX
Introducción.....	1
Capítulo 1. Glioma o Neoplasia Cerebral.....	2
1.1 Neoplasia del sistema nervioso central.....	2
1.2 El Glioblastoma multiforme.....	3
1.3 Morfología.....	4
1.4 Etiología.....	4
Capítulo 2. La respuesta inmunológica en gliomas.....	5
Capítulo 3. Tratamiento del glioblastoma.....	7
3.1 Inmunoterapia.....	8
Capítulo 4. Factor de Transferencia.....	9
4.1 Antecedentes históricos.....	9
4.2 Efectos inmunológicos.....	11
4.3 Estructura química.....	12
4.4 Toxicidad.....	12
4.5 Obtención del factor de transferencia.....	13
4.6 Origen del factor de transferencia.....	13
4.7 Vías de administración.....	14
Capítulo 5. Estudios clínicos realizados con FT.....	14
5.1 Factor de transferencia en cáncer.....	15
Capítulo 6. Línea celular C6.....	17
Justificación.....	18
Hipótesis.....	19
Objetivos.....	19
Capítulo 7. Materiales y Métodos.....	25
7.1 Elaboración del Factor de transferencia calostroal bovino.....	25
7.1.1 Ultracentrifugación.....	25
7.2 Determinación de proteínas.....	26
7.2.1 Método de Biuret.....	26
7.2.2 Método de ninhidrina.....	27
7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	28
7.3.2 Tinción con azul de Coomassie.....	29
7.3.3 Determinación del peso molecular.....	29
7.4 Inducción del tumor.....	30
7.4.1 Tratamiento con factor de transferencia calostroal.....	30
7.4.2 Evaluación del crecimiento neoplásico.....	31
7.5 Determinación de la actividad biológica del FTcal producción del factor inhibidor de leucocitos (LIF).....	31
7.6.1 Análisis Estadístico.....	34

Capitulo 8. RESULTADOS .....	34
8.1 Determinación de proteínas .....	34
8.2 Método Bradford .....	34
8.3 Determinación de la actividad biológica del FTcal ( <i>LIF</i> ) .....	35
8.4 Presencia de péptidos de bajo peso molecular en Electroforesis en gel de acrilamida 12% - SDS .....	35
8.4.1 Determinación del peso molecular del contenido del FTcal.....	35
8.5 Evaluación del volumen del Glioma C6.....	35
Capitulo 9 Discusión.....	44
9.1 Estandarización de la metodología para la obtención y purificación del Factor de Transferencia calostrál(FTcal).....	44
9.3 Presencia de péptidos de bajo peso molecular, por técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida. ....	46
9.4 Determinación de la actividad biológica <i>in vitro</i> del Factor de Transferencia calostrál .....	47
9.6 Determinación de la actividad biológica <i>in vivo</i> del Factor de transferencia calostrál evaluando la disminución del volumen del Glioma C6.....	50
Conclusiones.....	52
Referencias.....	53

## INDICE DE CUADROS

	PAGINA
Cuadro 1.1.1 Evolución que ha tenido la clasificación de gliomas .....	3
Cuadro 7.3.1.1 Cantidades para preparar el gel de poliacrilamida .....	28
Cuadro 8.1.1 Prueba de determinación cualitativa de proteínas por la prueba de Biuret y Ninhidrina .....	37
Cuadro 8.2.1. Prueba de determinación cuantitativa de proteínas por el método de Bradford .....	38
Cuadro 8.3.1 Prueba la determinación del factor de inhibición de la migración de leucocitos (LIF) .....	39
Cuadro 7.6.1.1 Prueba de DTH (delayed type hypersensitivity) para determinar la transferencia de inmunidad así como la especificidad del FTcal.....	33

## INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

	PAGINA
Figura 7.1.1 Metodología general para la producción del Factor de Transferencia calostrál bovino específico para Glioma C6 de rata.....	20
Figura 7.1.2 Metodología general para la evaluación del Factor de Transferencia calostrál bovino para el modelo de Glioma C6 de rata.....	21
Figura 7.4.1 Metodología general para la evaluación del efecto del FTcal sobre el volumen tumoral del Glioma C6.....	22
Figura 7.5.1 Metodología para la evaluación de la producción del factor inhibidor de leucocitos (LIF).....	23
Figura 7.6.1 Prueba de DTH (delayed type hypersensitivity) para determinar la transferencia de inmunidad así como la especificidad del FTcal.....	24
Figura 8.4.1 . Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	40
Gráfica 8.4.1.1 Curva obtenida para la determinación del peso molecular del factor de transferencia calostrál .....	41
Figura 8.6.1 Efecto del Factor de Transferencia sobre el volumen tumoral.....	42
Figura 8.5.1 Resultado de la prueba de DTH .....	43

## ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
APC	Célula presentadora de antígeno
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin.
Bis-acrilamida	N,N'-metil-bis-acrilamida
CD	Complejo de diferenciación
CDR	Regiones determinantes de complementariedad
cm	Centímetro
Cu <sup>++</sup>	Iones cobre
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
Da	Daltons
deg	degeneración
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTH	Hipersensibilidad retardada
EDL	Extracto dializable leucocitario
FT	Factor de transferencia
FTcal	Factor de transferencia calostrual
FTs	Factores de transferencia
GBM	Glioblastoma multiforme
IL	Interleucina
INF $\gamma$	Interferon gama
kDa	Kilodaltons
LIF	Factor inhibidor de leucocitos
mg	Miligramo
Mg/m <sup>2</sup>	Miligramo sobre metro cuadrado
MIF	Factor inhibidor de macrófagos
ml	Mililitro
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NK	Célula natural asesina
°C	Grados centígrados
PAGF	Proteína ácido fibrilar glial
RIC	Respuesta inmune celular
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
S-100	Antígeno neuroectodermal encontrado en la superficie celular
SNC	Sistema nervioso central
sTNF-Rs	Receptores de ,membrana del factor de necrosis tumoral
TEMED	Tetrametilen diamina
TGF	Factor de crecimiento transformante
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TIL	Linfocitos infiltrantes del tumor
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrometro

## **Introducción.**

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral del sistema nervioso central, con un pronóstico de vida grave de menos de 2 años a partir de su diagnóstico.

El presente proyecto de investigación es de vital trascendencia si consideramos la incidencia mundial del glioblastoma multiforme (GBM) que comprende entre el 12 y el 25% de todas las neoplasias intracraneales, entre el 30 y 50 % de los gliomas y más del 90% de los gliomas localizados en los hemisferios cerebrales en adultos, así como el tiempo de vida que estos pacientes tienen sin ser tratados (aproximadamente 14 semanas). Además si consideramos que los tratamientos utilizados hoy en día tales como la quimioterapia, radiaciones y resección quirúrgica con radiación han sido poco alentadores ya que la tasa de supervivencia posquirúrgica es relativamente corta pues el 41% de los pacientes sobreviven menos de un año, 39% entre 1 y 2 años, 12% entre 2 y 3 años y solo un 8% sobreviven más de tres años.

Hay antecedentes de que el Factor de Transferencia ha sido utilizado como inmunomodulador en enfermedades crónicas de origen bacteriano, viral y neoplásicos, demostrando una mejoría en la respuesta inmune sin la presencia de efectos colaterales. El factor tradicionalmente se obtiene de sangre periférica por lo que es necesario encontrar una fuente abundante de FT con alta especificidad, así como una adecuada metodología para su obtención. De esto surge el interés por profundizar sobre las características del tumor y los antecedentes históricos del factor de transferencia, para plantearlos como marco de referencia de la presente investigación.

# **Capítulo 1. Glioma o Neoplasia Cerebral.**

## **1.1 Neoplasia del sistema nervioso central.**

Los tumores de sistema nervioso están formados por células que exhiben una división incontrolada en una proporción que excede la muerte celular (Wise y col, 1984). Se conocen dos tipos principales de tumores cerebrales: 1) tumores primarios, compuestos de astrocitos, oligodendrocitos, ependimocitos, histiocitos, microgliocitos (todos ellos llamados en conjunto gliomas); fibroblastos aracnoideos especiales (meningiomas); neuroblastomas-meduloblastomas y pinealocitos; 2) tumores secundarios, es decir metástasis de carcinoma de pulmón, mama, melanomas, linfomas y de origen indeterminado (Fred y Pruitt, 1994). Esta clasificación depende del sitio exacto del tumor, del tipo de tejido involucrado, del comportamiento benigno o maligno del tumor y de otros factores. El término glioma ha tenido una amplia aplicación, sin embargo se reserva comúnmente para esos tumores con la evidencia histológica y biológica de malignidad (Apuzzo, 1991). Estas neoplasias incluyen los glioblastomas y tumores menos agresivos como oligodendrioma, astrocitoma y ependimoma (Apuzzo, 1991).

El cuadro 1.1 presenta el grado del tumor según su tiempo de recaída y su tiempo de duplicación.

Kernohan-1949	Ringertz-1950	OMS-1979	Burger-1985
Grado 1 Sobrevida de 5 años o más.	Astrocitoma	Astrocitoma Pilocítico	Astrocitoma con deg. Microquistica
Grado 2 Sobrevida de 3 a 5 años	Astrocitoma	Astrocitoma	Astrocitoma de bajo grado
Grado 3 Sobrevida de 1 a 3 años	Astrocitoma Anaplásico	Astrocitoma Anaplásico	Astrocitoma Anaplásico
Grado 4 Sobrevida de menos de 1 año	Glioblastoma Multiforme	Glioblastoma Multiforme	Glioblastoma Multiforme.

Cuadro 1.1.1 Evolución que ha tenido la clasificación de gliomas.

(Tomado de Dávila; 2001).

## 1.2 El Glioblastoma multiforme.

El glioblastoma multiforme (GBM), representa el grupo más común de las neoplasias del Sistema Nervioso Central. Comprende entre el 12 y el 25% de todas las neoplasias intracraneales, entre el 30 y 50% de los gliomas los gliomas frecuentemente son localizados en los hemisferios cerebrales, lóbulos frontales, el cuerpo calloso y estructuras centrocefálicas además puede presentarse en el cerebelo o en la medula espinal (Fred,1994).

Estudios recientes publicados por Sotelo y colaboradores (2000) referentes a la incidencia de neoplasias de este sistema, muestran que los gliomas ocupan un 33% del total de los casos registrados en un periodo de 7 años; y de este porcentaje el 28% fueron diagnosticadas como glioblastoma multiforme, representado a su vez un 9% del total de las neoplasias. Estos porcentajes son más bajos que los reportados por anglo americanos del 17% al 27% y de 33% al 55%, respectivamente. Un estudio en población española, reportó que el GBM ocurre en un 20% de todas las neoplasias intracraneales (De Angelis, 2001). El

pico de incidencia en la vida media adulta es entre 45 y 55 años de edad, pero ningún grupo de edad está exento. Para los menores de 15 años, los gliomas representan el 11.2% del total de los tumores incidentes. La relación de pacientes afectados entre hombres y mujeres es de 3:2 (López-González y Sotelo; 2000, De Angelis, 2001).

### **1.3 Morfología.**

En el plano macroscópico, el parénquima cerebral normal está distorsionado e infiltrado por una tumoración amarillenta que contiene áreas de necrosis, zonas quísticas y áreas hemorrágicas. El tumor tiene una apariencia variable, algunas zonas pueden ser blanquecinas y duras, mientras que otras son amarillentas y blandas, de color gris, rojo, naranja o café, dependiendo del grado de necrosis y presencia de hemorragia reciente o antigua (Mendelsohn, 1994).

Las características histológicas encontradas son: gran celularidad con pleomorfismo e hipercromatismo nuclear; astrocitos identificables con fibras en combinación con astroblastos, en algunos casos células tumorales gigantes y células en mitosis; hiperplasia de células endoteliales de pequeños vasos, necrosis, hemorragia y trombosis de vasos. Se distingue de los otros tipos de astrocitomas por su aspecto abigarrado, debido a ello recibe la denominación de multiforme (Burger, 1991, Cotran, 1989, Mendelsohn, 1994).

### **1.4 Etiología.**

La etiología del GBM sigue siendo desconocida; sin embargo, se han propuesto varias hipótesis. Se ha sugerido que la incidencia de gliomas se incrementa con la exposición a radiaciones ionizantes, dieta, campos magnéticos, el uso de pesticidas, herbicidas y fertilizantes. En ciertos ámbitos profesionales han aparecido pequeños incrementos en la incidencia de estos tumores, sobre todo en la industria de procesamiento de petróleo. (Fiebig y Schmahl, 1979; Cotran y col, 1989; Burger, 1991; Fred y Prutt, 1994).

## Capítulo 2. La respuesta inmunológica en gliomas.

Los pacientes con cáncer presentan reactividad inmunológica alterada (Dix y col, 1999), posiblemente derivada de alguna deficiencia en el proceso de activación necesario para la citotoxicidad mediada por células T (Tada y Tribolet, 1993). En pacientes con glioblastoma el número reducido de células T circulantes se debe a una eliminación selectiva de linfocitos T cooperadoras CD4+ (Bhondeley y col, 1988), aunque existen cantidades normales de linfocitos B y de inmunoglobulinas en el suero, su capacidad para producir anticuerpos contra tétanos, influenza y otros antígenos es deficiente, lo que puede deberse a la disminución funcional de las linfocitos Th2 (Bhondeley y col, 1988; Tada y Tribolet, 1993). Aunque un número pequeño de células B se encuentran entre la población de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), las células CD4 son insuficientes para activar apropiadamente a las linfocitos B para que produzcan anticuerpos (Tada, 1993). Se ha apreciado la presencia de infiltrado linfoide asociado con gliomas, el cual podría ser la manifestación de una posible respuesta inmune del huésped al tumor. Se observó predominio de linfocitos T citotóxicos CD8+ invadiendo el parénquima tumoral. (Iwasaki, 1993 (Turner, 1992).

Se han identificado dos grupos de antígenos con representación principal en células de glioma pero con menor representación en otros grupos celulares: el antígeno neuroectodermal encontrado en la superficie celular (S-100) y el antígeno citoplásmico glial o proteína ácido fibrilar glial (PAGF) (Apuzzo y Mitchell, 1981; Tada y Tribolet, 1993).

Los defectos en la inmunidad celular en sitios periféricos y en el tumor mismo se han atribuido, al menos en parte, a la producción de péptidos inmunosupresores por elementos neoplásicos. La familia del factor de crecimiento transformante (TGF), principalmente TGF $\beta$ , IL 10 y prostaglandina E<sub>2</sub>, son considerados como la causa más importante de inmunosupresión en gliomas (Fontana, 1984; Sawamura, 1990). Además se han identificado receptores

solubles para citocinas que actúan como inhibidores de citocinas en los pacientes con glioma. Estos inhibidores solubles incluyen el receptor antagonista de IL-1, el receptor soluble de IL-2 y el fragmento extracelular soluble de receptores de membrana del factor de necrosis tumoral (sTNF-R's) de 55kDa y 75 kDa. Este último forma complejos con el TNF  $\alpha$  y  $\beta$  inhibiendo la actividad biológica de estas citocinas por competencia del receptor de membrana específico en células y tejidos (Ammirati, 2001).

Aparentemente el gen p53 es responsable de la apoptosis inducida por daño al DNA (Pollack, 1997) La pérdida de la función del gen p53 fue la primera alteración descrita como elemento regulatorio de susceptibilidad a apoptosis, relacionada a la progresión de gliomas y posible resistencia a quimioterapia (Barker, 1995) Existe además en células del glioma el receptor CD95 (receptor de factor de crecimiento neural/factor de necrosis tumoral); este ligando es expresado en células T y es un mediador importante de muerte celular citotóxica de células. Los gliomas malignos expresan CD95 esto indica que tiene la cascada intracelular requerida para apoptosis mediada por CD95. En contraste a CD95, el gen bcl-2 codifica un inhibidor de apoptosis; bcl-2 es expresado en tumores gliales humanos *in vivo* y es más abundante en gliomas grado III y IV como es el caso del GBM (Patsouris, 1996).

### Capítulo 3. Tratamiento del glioblastoma.

La historia natural del glioblastoma es bien conocida, menos de la quinta parte de los pacientes sobreviven un año después de aparecer los primeros síntomas y sólo el 10 % llega a 2 años. El edema cerebral que incrementa la presión intracraneal es la causa inmediata de muerte (Mendelsohn, 1994). En este tipo de neoplasias el protocolo terapéutico incluye resección quirúrgica que conduce a una reducción inmediata de la presión intracraneal, facilita la obtención de tejido para el diagnóstico histológico y mejora la acción de otros tratamientos como la radioterapia y quimioterapia. (Ammirati, 1987). Estos procedimientos han sido poco alentadores, ya que la tasa de supervivencia posquirúrgica es relativamente corta pues el 41% de los pacientes sobreviven menos de un año, 39% entre 1 y 2 años, 12% entre 2 y 3 años y sólo un 8% sobreviven más de tres años. (Black, 1991).

Después de una resección, sin radiación ni quimioterapia, la vida media del paciente es de solamente 14 semanas, se obtienen mejores resultados al combinar la resección quirúrgica con radiación y/o quimioterapia (Fine y col, 1993; Smith y col, 1980; Mendelsohn, 1994), pero existe un problema que limita el avance de la radioterapia de los gliomas malignos que es el pobre cociente terapéutico entre la radiosensibilidad del tejido cerebral normal y la elevada radioresistencia de los gliomas (Leibel, 1991). La utilización de sustancias inmunorreguladoras e inmunoestimuladoras así como radiosensibilizantes, y la fotoirradiación son métodos en fase de estudio para aumentar la eficacia de la radioterapia (Schuster, 1991).

En el tratamiento de los gliomas malignos la quimioterapia se ha mostrado discretamente eficaz. Por esta razón su utilización en determinados tumores es objeto de controversia (Walker, 1980). En general, no ha habido ningún fármaco o combinación de fármacos que se hayan mostrado mejor que otros y la respuesta a

la quimioterapia es variada (Rosenfeld, 2001). Para el tratamiento de los gliomas malignos se utilizan agentes quimioterapéuticos como **carmustina** (N,N-bis-(2-cloroetil)-N-nitrosourea BCNU), que es el agente anticancerígeno de elección (Kimatura y col, 1996), se utiliza una dosis máxima de seguridad menor o igual a 1200 mg/m<sup>2</sup> de área tumoral (Colvin, 1982; McDonald y col, 1981). En humanos, la toxicidad con altas dosis de carmustina es marcada, produciendo un daño tóxico en pulmón asociado con nitrosoureas, y presentándose en forma de alveolitis fibrosante y neumonía intersticial, la cual puede producir fibrosis pulmonar, falla pulmonar restrictiva y muerte, además, se observa mielosupresión retardada, trombocitopenia y leucopenia que pueden contribuir al sangrado y a una grave infección en un paciente previamente comprometido. Otros fármacos utilizados son la procarbazona, lomustina y vincristina, los cuales incrementan la supervivencia (Kornblith y Walker, 1988, Black, 1991), estos agentes pueden ser administrados por vía intravenosa, intraarterial, intratecal, intraventricular o intraparenquimatosa; la ruta intravenosa es una de las más usadas. (Mahaley y col, 1989).

Nuevas propuestas, particularmente las modernas estrategias moleculares, son la esperanza para ayudar en el futuro a la terapia de los tumores cerebrales. Los intentos por ejemplo el uso de vectores retrovirales y adenovirales, virus Herpes simplex, vectores antisentido y oligonucleótidos antisentido. Estos estudios aún se encuentran en etapa preclínica y algunas cuestiones importantes quedan aún por resolver (Yung, 1994).

### **3.1 Inmunoterapia.**

Existen nuevas estrategias para atacar este tipo neoplasias. Muchos de estos métodos se dirigen a aumentar la débil respuesta inmunitaria del huésped contra antígenos tumorales (Couldwell y col, 1991). La inmunoterapia es inherentemente más específica por su ataque selectivo a células tumorales. Recientemente se han introducido, **inmunopotenciadores** e **inmunomoduladores** como el interferón, factores estimuladores de colonias, muramildipéptidos y el **Factor de Transferencia** (Candanosa, 1997).

## Capítulo 4. Factor de Transferencia.

### 4.1 Antecedentes históricos.

A principios de los años 40's Landstainer y Chase describieron por primera vez la transferencia de hipersensibilidad retardada (DTH) de un donador inmune a uno no inmune utilizando para ello células de exudado peritoneal de cobayos sensibilizados con cloruro de picrilo y tuberculina (Chase, 1942). Las células de los animales sensibilizados eran transferidas a los receptores no sensibilizados y éstos adquirían la capacidad de expresar la RIC de los donadores. Estudios posteriores en animales indicaron que la transferencia era mejor cuando se realizaba entre donadores y receptores que tuvieran alguna relación y sólo cuando se usaban células intactas y vivas. Las transferencias con células muertas o suero, no dieron resultado (Chase, 1942)

La transferencia de DTH (*delayed type hypersensitivity*) fue observada por primera vez en humanos hasta 1949 por Lawrence, abriendo una nueva línea de investigación que ha desembocado tanto en un mayor entendimiento de los mecanismos inmunitarios como en el desarrollo de diferentes terapias inmunomoduladoras. Lawrence originalmente demostró que la transferencia de linfocitos de un donador positivo a la tuberculina a un receptor sano negativo daba como resultado, la conversión del receptor en positivo. En 1955 Lawrence y col. demostraron que la hipersensibilidad tardía ó DTH podía ser transferida utilizando extractos solubles dializables de leucocitos provenientes de 20mL de sangre total. Al componente activo de estos extractos celulares se le llamó **Factor de Transferencia (FT)**. En estos experimentos Lawrence utilizó lisados de leucocitos de donadores que presentaban DTH positivas a antígenos tales como la coccidiodina, el toxoide diftérico y la proteína M del estreptococo.

En todos los casos los receptores eran individuos con DTH negativas a estos antígenos; pocas horas después de haber recibido el FT, los receptores eran

capaces de presentar reacciones de DTH positivas a los antígenos que eran reconocidos por los donadores y el efecto parecía ser antígeno específico. De aquí en adelante llamaremos a la preparación elaborada por el método de Lawrence *extracto dializable leucocitario* (EDL) (Levin, 1970).

En los años que le siguieron a 1963, la investigación sobre el FT no avanzó tanto y no fue hasta la década de los 70's cuando fue utilizado en el síndrome Wiskott-Aldrich, tanto en ensayo *in vivo* como *in vitro* y se confirmó que el FT podía ser utilizado en otro tipo de padecimientos (Fudenberg y Pizza, 1993). En 1973 Levin demostró que el FT además de transferir la RIC, confería la capacidad de inducir la producción de citocinas en respuesta a antígenos específicos, así como la resistencia a la infección en padecimientos con una inmunidad deficiente de carácter genético.

Desde esta época se propuso al FT específico como una cadena de polipéptidos unidas probablemente por un puente disulfuro. En la década de los 80's se realizaron numerosos estudios clínicos del efecto del FT en diversos padecimientos, observándose en la mayoría de ellos efectos benéficos (Fudenberg y Pizza, 1993). En los siguientes años, la investigación sobre el FT se enfocó al estudio de su estructura química, utilizando para ello diversas metodologías enzimáticas, químicas y fisicoquímicas donde obtuvieron polipéptidos específicos con un peso Molecular de 5KDa (Rozzo y Kirkpatrick, 1992).

En el año 2000 Kirkpatrick logró identificar una secuencia de aminoácidos de un total de 7 preparaciones de FT diferentes. Estos péptidos no tienen la capacidad de transferir inmunidad, aunque sí se administran conjuntamente con el FT se inhibe la expresión de la DTH. Estos hallazgos sugieren que estos péptidos caracterizados conformados por la secuencia de los aminoácidos LLYAQDLVEDN, corresponden a la región conservada del FT que se une a las células blanco (Kirkpatrick, 2000)

En la actualidad esta muy claro que la actividad del FT de 5KDa es antígeno específica, esta afirmación se apoya en los experimentos realizados por Rapaport en 1960 quién preparó lisados de leucocitos de donadores coccidioidina positivos de California y los probó en residentes de Nueva York, de 35 receptores de los cuales 28 mostraron DTH positiva para la coccidioidina. Más tarde estas observaciones se han confirmado cuando se prepara FT a partir de bazos de ratones inmunizados contra diferentes antígenos. Los receptores reaccionan exclusivamente con el antígeno hacía el cual los receptores fueron inmunizados (Rozzo y Kirkpatrick, 1992).

#### **4.2 Efectos inmunológicos.**

Aunque todavía no se conocen totalmente los mecanismos de acción del FT y de EDL, se han observado múltiples efectos *in vitro*, consistentemente se presentan dos efectos en los receptores: expresión de DTH y secreción *in vitro* de ciertas citocinas por linfocitos T activados. La propiedad de transferir la hipersensibilidad a un receptor no sensibilizado, aún constituye la principal definición funcional del FT. Una observación constante ha sido la capacidad de los linfocitos de producir MIF (Factor inhibidor de la migración de macrófagos) y LIF (Factor inhibidor de leucocitos) en respuesta a un antígeno, tanto en pacientes con enfermedades infecciosas como en aquellas de origen autoinmune; casi siempre la respuesta *in vitro* corresponde con la aparición de DTH. (Kirkpatrick, 1993)

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 de FT ó EDL incluyen: incremento en la activación de los macrófagos y en la producción de IL-1, favorece la producción de MIF y LIF aumenta la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC), incrementa la

reactividad de los linfocitos en cultivos mixtos y la reacción de rechazo a transplantes, también promueve la quimiotaxis de leucocitos. (Kirkpatrick,1977).

#### **4.3 Estructura química.**

Como ya se había mencionado la preparación cruda obtenida después de romper los leucocitos totales en una solución acuosa seguida de una diálisis para obtener la fracción de bajo peso molecular, se denomina extracto dializable leucocitario (EDL), Algunos componentes del EDL, tienen efecto adyuvante, por otro lado la fracción que corresponde a FT es responsable de la transferencia específica de respuesta inmune celular y es la suma de las experiencias inmunológicas del donador (Estrada-Parra,1999).

Independientemente de su origen, los FTs estudiados, son pequeñas moléculas de 3.5-6KD, lábiles al calor, pero estables a bajas temperaturas, de modo que la actividad biológica permanece después de almacenar el producto de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-70^{\circ}\text{C}$  aún después de varios años (Estrada-Parra,1999). Algunos de los estudios indican que los FT contienen bases RNA unidas a pequeños péptidos, (Rozzo y Kirkpatrick,1992). Aunque más tarde se encontraron moléculas del FT funcionales sin ribonucleótidos (Kirkpatrick, 1993). En vista del peso molecular del FT es muy probable que contenga 40 aminoácidos, por lo tanto si consideramos las posibles combinaciones de los 20 aminoácidos que existen, tenemos mil millones de variaciones en la estructura primaria.

#### **4.4 Toxicidad.**

Debido a su bajo peso molecular no contiene sustancias que podrían causar efectos colaterales. Se sabe que la aplicación del FT carece de efectos colaterales indeseables o efectos secundarios y no es tóxico (Estrada, 1999; Fudenberg, 1993).

#### **4.5 Obtención del factor de transferencia.**

Actualmente se obtienen de leucocitos totales de un donador sano. Estas células son rotas por ciclos de congelación-descongelación. El lisado leucocitario es posteriormente dializado a través de una membrana con un punto de corte de 10 KD, posteriormente es liofilizado (Estrada-Parra,1999). Muestras de este EDL son sometidas a pruebas de inocuidad y seguridad para garantizar que sean estériles y libres de pirógenos. Se ha determinado arbitrariamente que una unidad internacional (UI) corresponde al EDL que proviene de  $5 \times 10^8$  leucocitos y usualmente es envasada en un vial. (Estrada-Parra,1999)

#### **4.6 Origen del factor de transferencia.**

Tanto el EDL como el FT pueden obtenerse también de linfocitos de sangre periférica, de linfonodos de bovino, bazo y placenta de diferentes especies (Funderberg,1993). No existe aparentemente una barrera interespecies, se puede utilizar FT obtenido en una especie y aplicarse en otra sin ninguna complicación y con excelentes resultados. (Wilson y col, 1988) Lo que significa que el FT esta formado por moléculas muy pequeñas no inmunógenas y altamente conservadas a través de la evolución. Una molécula dada de FT con cierta especificidad, puede ser muy parecida en estructura ó por lo menos igual en los sitios activos ya sea que provenga de humano, cerdo, caballo ó cualquier otra especie. (Wilson y col, 1988).

Originalmente el FT proviene de sangre humana pero el calostro, es una rica fuente de FT (Kirkpatrick, 1996)..El calostro tiene un gran potencial, ya que puede obtenerse mucho más FT a bajo costo. Adicionalmente el FT se encuentra soluble en el calostro en más alta concentración que dentro de las células. El FT obtenido de calostro esta 1,000 veces más concentrado que el obtenido a partir de sangre (Wilson, 1989).

Existe evidencia de que si se inyecta tejido canceroso en vacas, el EDL-FT obtenido de sangre de estos animales, promueve cierta mejora clínica (Wilson, 1989). También se ha obtenido FT de bazo de cerdo para cáncer de colón, lo que resultó en un incremento de IL-2 e IFN $\gamma$  en los pacientes así como de linfocitos T y B (Karhumaki y col, 1988)

#### **4.7 Vías de administración.**

EL EDL-FT generalmente es administrado por vía intramuscular ó subcutánea, aunque se ha demostrado que la vía oral es igualmente eficiente, e incluso puede darse como supositorio vía rectal e incorporado en liposomas. Para una acción más rápida puede ser administrado por vía intravenosa. Este producto es notable por que su administración esta prácticamente libre de efectos adversos. ( Estrada-Parra, 1999)

### **Capítulo 5. Estudios clínicos realizados con FT.**

Los EDL contienen muchas sustancias que ejercen entre el 10-15% del efecto inmunológico. A continuación se citan las múltiples experiencias de la gran cantidad de investigadores que han administrado EDL-FT en diversos padecimientos (Estrada-Parra,1999) El ejemplo clásico de inmunodeficiencia que responde exitosamente con el FT es la candidiasis mucocutánea, reportada desde 1972. Otro desorden inmunológico que se caracteriza por la deficiencia de respuesta celular es la lepra lepromatosa, después del tratamiento los pacientes son positivos a la lepromina ( Levin, 1970; Levin, 1973; Estrada-Parra y col, 1983). Desde el principio fue evidente la utilidad del FT en el tratamiento de la tuberculosis, en la actualidad se han determinado por biología molecular algunos de los mecanismos involucrados en la remisión de las lesiones en el modelo murino. En la leishmaniasis cutánea observaron una dramática mejoría de las

lesiones que habían permanecido por años. Para el tratamiento del Herpes los resultados han sido excelentes ya que erradica las lesiones, disminuye el dolor y previene la recurrencia, en pacientes de diferentes edades incluyendo geriátricos. (Estrada-Parra y col, 1998) El tratamiento con FT ha sido de gran utilidad en padecimientos de etiología autoinmune ó incierta como síndrome de Behcet, alopecia totalis, síndrome de fatiga crónica, lupus eritematoso, esclerosis múltiple y en otros de carácter alérgico como asma, hipersensibilidad alimentaria y dermatitis atópica con gran éxito principalmente en niños. (Lawrence, 1954; Levin, 1970; Levin, 1973; Estrada-Parra y col, 1983)

### **5.1 Factor de transferencia en 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. En 1976 Byers logro establecer evidencia *in vitro* de los beneficios de FT, pues logró transferir la capacidad citotóxica específica. Fudenberg y Pizza en 1993 también lograron comprobar que la transferencia del LIF en contra de antígenos tumorales.

El grupo de Fudenberg en 1993 ha producido evidencia muy sólida de que el EDL es capaz de incrementar la respuesta inmune celular en pacientes con osteosarcoma o sarcoma osteogénico. Levin en 1970 al administrar EDL evitó la presentación de metástasis después de la cirugía y a lo largo de la vida de los pacientes tratados. El mismo efecto se ha observado utilizando el modelo animal. En el caso de los melanomas en estadio I, los resultados no son concluyentes; en un grupo de 100 pacientes, a los 5 años sobrevivía el 99%. En ensayos con pacientes en estadio II no se observó mejora en la supervivencia. Tampoco hay

mejora cuando se añade EDL a la quimioterapia ó inmunoterapia con BCG, en melanoma maligno diseminado (Kirkpatrick y Gallin, 1974; Gottlieb y col, 1995)

Aunque existen resultados optimistas, es necesario experimentar con protocolos donde se use FT específico para llegar a una conclusión justa. Utilizando EDL de los convivientes de mujeres con cáncer cervicouterino se han logrado muy buenos resultados (Pizza,1993) Usando este mismo sistema se han atacado otros tumores como, melanoma, sarcoma osteogénico, rhabdomyosarcoma, carcinoma epidermoide, linfosarcoma y adenocarcinoma de colon; el objetivo fue reestablecer la respuesta inmune celular específica (Kirkpatrick y Gallin, 1974; Gottlieb y col, 1995)

La terapia con EDL produjo regresión de 13 tumores, disminución de la metástasis y alivio del dolor en otros 14 pacientes, pero la mejora clínica no fue duradera.(Kirkpatrick y Gallin, 1974; Gottlieb y.col, 1995).

Se han logrado incrementar los niveles de linfocitos circulantes CD4+ y de la DTH en pacientes con linfoma de Hodgkin . En pacientes con carcinoma renal metastásico se han observado notables mejorías ya sea el EDL solo o en combinación con quimioterapia o con BCG. Para el caso de cáncer de vejiga, incrementaron los linfocitos T totales, la respuesta proliferativa en presencia de mitógenos, actividad citotóxica y un aumento de anticuerpos, así como reducción significativa del tumor (Kirkpatrick y Gallin, 1974; Gottlieb y col, 1995)

En la metástasis de cáncer de próstata se observó regresión del tumor primario y de la metástasis en pacientes tratados con FT. En un modelo de ratas que se les administró FT, sólo se observó infiltración linfocitaria y necrosis (Kirkpatrick y Gallin, 1974; Gottlieb y col, 1995)

## Capítulo 6. Línea celular C6.

Por diferencias entre las neoplasias, se han establecido modelos estándares para cada tipo de tumor, para unificarlos en el terreno internacional de los tumores, las condiciones de trasplante y las técnicas de investigación (Farrell y col, 1987). La clona C6 es la línea celular glial más frecuentemente usada en neurobiología. Ha sido estudiada en su composición lipídica, la presencia de antígenos de superficie, su respuesta a antimetabolitos, la producción de carbohidratos y la presencia de varias enzimas (Bissel, 1974, Lantos, 1980).

El clon C6 ha sido aislada de un glioma de rata Wistar inducido por la inyección del carcinógeno N-nitrosometilurea, después de una serie de cultivos alternados y pasaje por animales (Benda, 1968). Las células fueron cultivadas en medio Han's F10 (82.5%) con suero de caballo (15%) y suero fetal bovino (2.5%). El origen glial de la clona C6, fue confirmado por la producción de altos niveles de la proteína S-100, el fenotipo molecular más característico del cerebro de los vertebrados y que ha sido encontrado en numerosos tumores cerebrales, tanto de humanos como en otros animales (Gysin, 1980; Benda, 1968). Se ha sugerido que la S-100 puede tener un papel importante en el desarrollo y fisiología del cerebro, quizás en el control de la actividad de la trombina localizada en el cerebro con propósitos, tales como mitogénesis y diferenciación o en la modulación de la acción de la endotelina-1 sobre las arterias cerebrales (Ehrenreich, 1993).

En 1981 Auer y cols describieron el implante intracraneal de células C6 como modelo simple y reproducible de glioma. Posteriormente Farrell y cols (1987) reportaron algunas características del modelo. Actualmente el glioma C6 es de los modelos más ampliamente utilizados para el estudio, prevención y tratamiento de glioma maligno (Cravioto y col, 1976; Farrell y col, 1987; Peterson y col, 1994).

## **Justificación.**

Con lo anterior descrito y aunado a los conocimientos previos de la eficacia del Factor de Transferencia en diferentes neoplasias (tales como melanoma, sarcoma osteogénico, rabdomiosarcoma, carcinoma epidermoide, linfosarcoma, adenocarcinoma de colón, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, cancer cervicouterino, cancer de próstata entre otros), surge nuestro interés en realizar investigaciones sobre el efecto inmunoterapéutico del Factor de Transferencia de origen calostroal bovino sobre el GBM. Esto con el propósito de desarrollar una terapia que disminuya el volumen tumoral, que limite su expansión y la posibilidad de reincidencia, que no se desmerite la calidad de vida de los pacientes como sucede con la radio y quimioterapia y por ende ofrecer un periodo de sobrevida más amplio.

Es importante mencionar que en nuestro país no existen antecedentes del origen de Factor de transferencia específico de GMB de origen calostroal bovino, ya que el realizado actualmente se obtiene de sangre humana y animales como el cerdo.

Por todo lo expuesto nos abocamos a estandarizar una adecuada metodología de la obtención y purificación del Factor de transferencia calostroal específico como agente inmunoterapéutico en glioma C6 de rata.

## **Hipótesis.**

Si la metodología empleada para la purificación del FTcal es la adecuada entonces se puede determinar la actividad *in vitro* e *in vivo* del FTcal

## **Objetivos.**

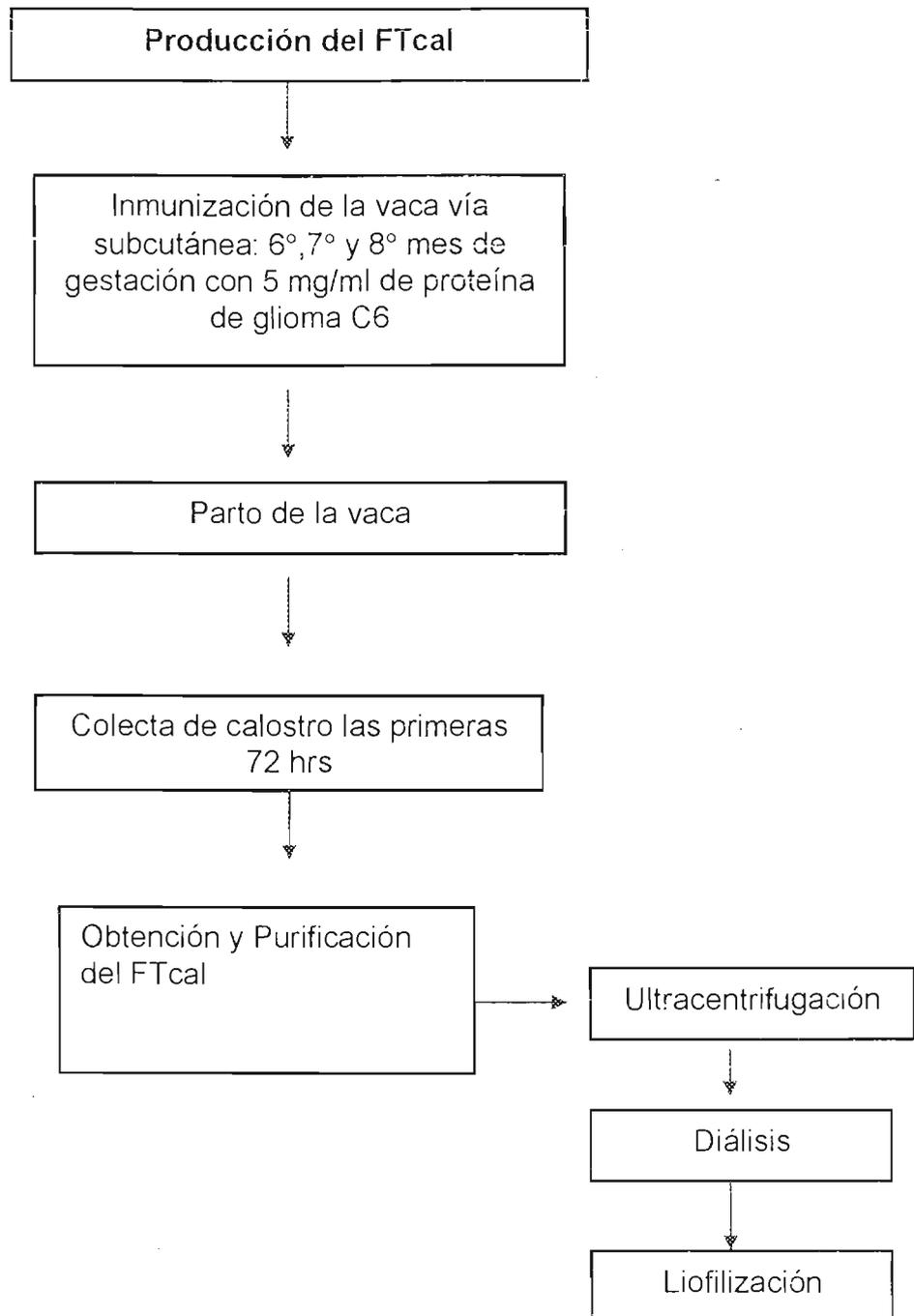
### **General:**

Estandarización de la metodología para la obtención del Factor de Transferencia calostrál bovino.

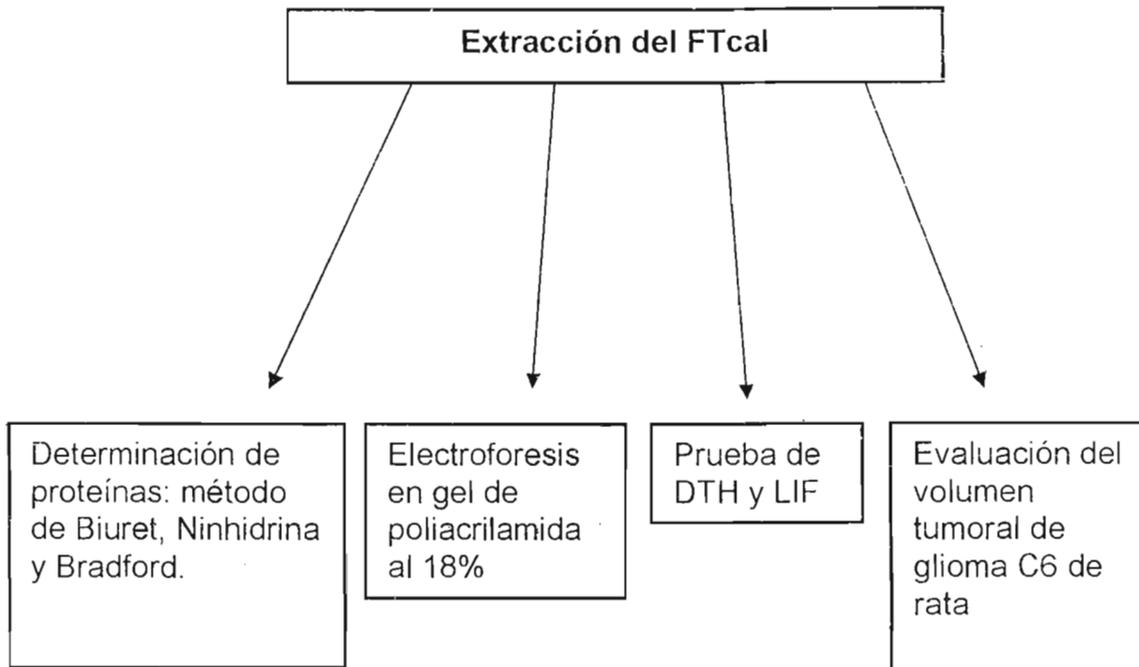
### **Particulares:**

1. Comprobar la presencia de péptidos de bajo peso molecular en el producto obtenido.
2. Determinar la capacidad de transferencia de DTH del producto obtenido y su especificidad.
3. Determinar la actividad biológica del FTcal obtenido en el modelo del glioma C6 en rata.
4. Determinar la actividad *in vitro* del FTcal .

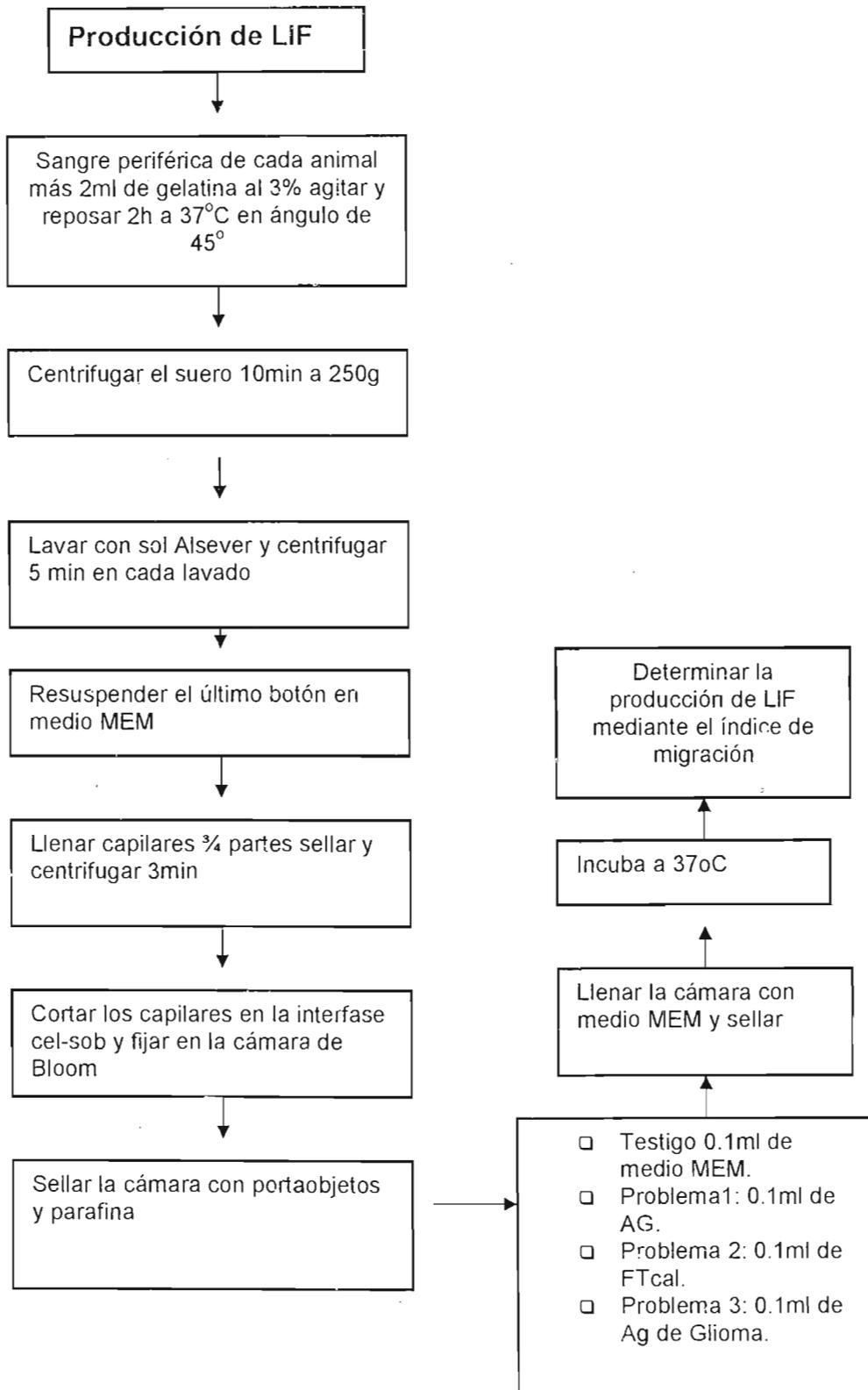
**Figura 7.1.1.** Metodología general para la producción del Factor de Transferencia calostroal bovino específico para Glioma C6 de rata.



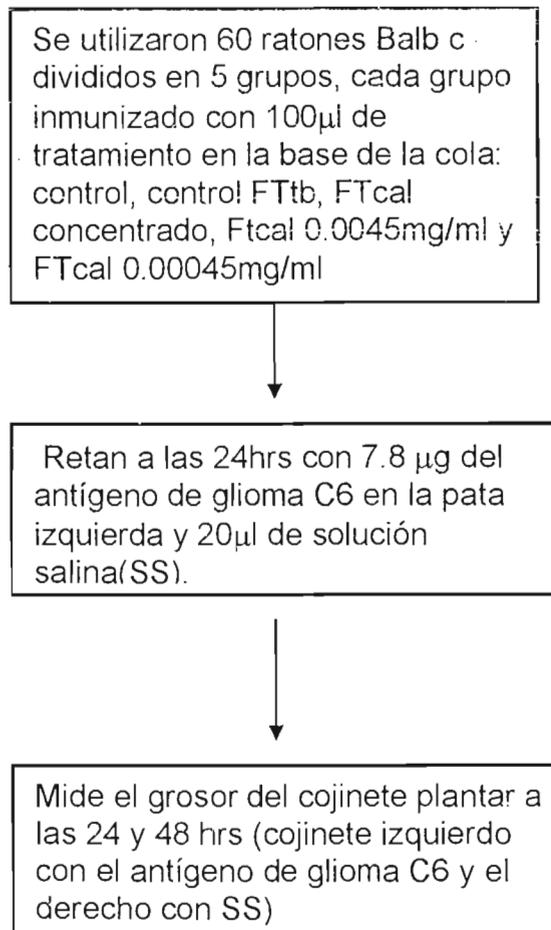
**Figura 7.1.2** Metodología general para la evaluación del Factor de Transferencia calostrual bovino para el modelo de Glioma C6 de rata.



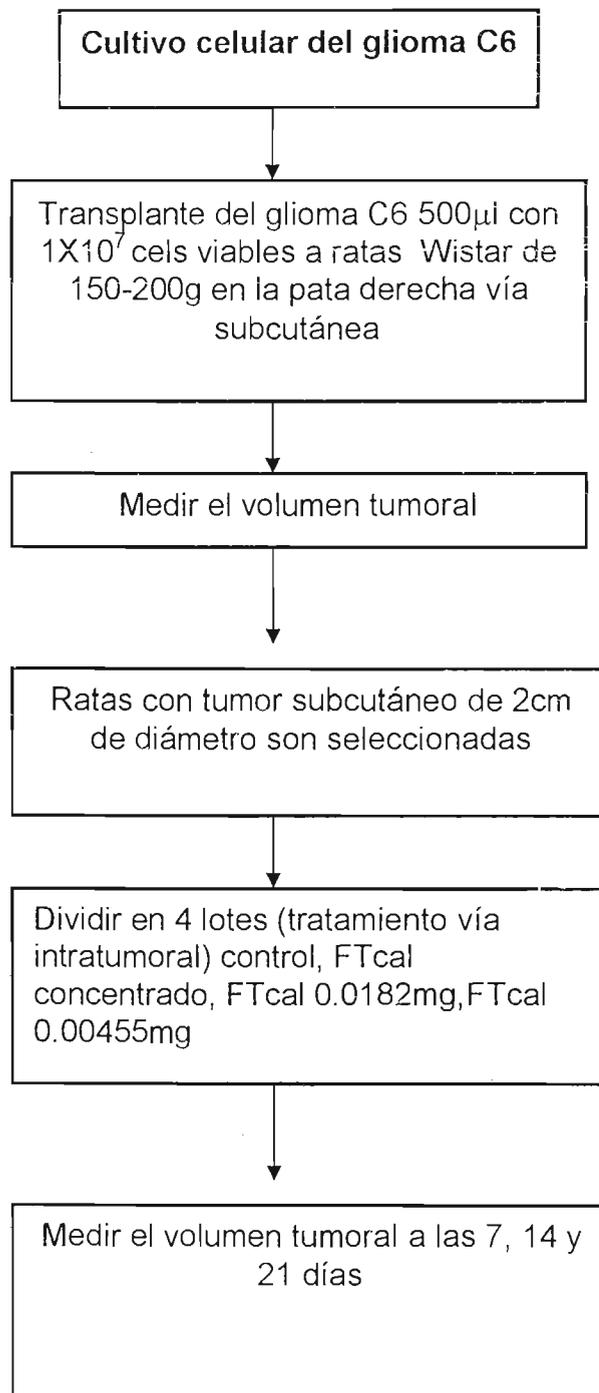
**Figura 7.5.1** Metodología para la evaluación de la producción del factor inhibidor de leucocitos (LIF)



**Figura 7.6.1** Prueba de DTH (delayed type hypersensitivity) para determinar la transferencia de inmunidad así como la especificidad del FTcal.



**Figura 7.4.1** Metodología general para la evaluación del efecto del FTcal sobre el volumen tumoral del Glioma C6.



## **Capítulo 7. Materiales y Métodos.**

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias biológicas, en el Laboratorio 8 de Biología Molecular de la unidad de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, en el laboratorio de Neuroinmunología del Instituto de Neurología y Neurocirugía y en el Rancho Almaraz de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan campo 4.

### **7.1 Elaboración del Factor de transferencia calostroal bovino.**

Como fuente de FTcal se utilizaron 15 litros de calostro bovino, para ello se preparo el inmunógeno a partir de células C6 para inocular 2 vacas gestantes

La vaca se inmunizo con 5mg / ml de proteína de glioma C6 resuspendido en solución salina amortiguada y mezclado con adyuvante incompleto de Freund. La vía de inoculación fue intradérmica. Estas vacas fueron inmunizadas durante el quinto, séptimo y octavo mes de gestación.

Después del parto se colecto el calostro de las primeras 72hr después del parto se mantuvo en congelación hasta su procesamiento (ver figura 7.1)

#### **7.1.1 Ultracentrifugación.**

Con el objetivo de remover las células, grasa y la caseína se estandarizaron velocidades y tiempos de centrifugado, así como la temperatura. Sé centrífugo en 4 diferentes ciclos a una temperatura de 4°C:

- Primer ciclo fue de 3500rpm durante 15min.
- Segundo ciclo 7000rpm durante 30 min.
- Tercer ciclo 10,000rpm durante 1 hora.
- Cuarto ciclo 12,000rpm durante 1 hora.

Una vez centrifugado se congeló, para su posterior tratamiento y se almacenaron muestra para realizar la determinación de proteínas.

### **7.1.2 Diálisis.**

El calostro centrifugado por dializado se paso a través de una membrana de diálisis, con un punto de corte de 10,000Da de peso molecular, permitiendo el paso por la membrana de moléculas con un peso molecular menor a 10Kda, el sistema se dejo reposar por 48horas en refrigeración y finalmente el agua de diálisis 7.5 litros fue colectada en condiciones asépticas, filtradas con un filtro de 0.45 y 0.22 $\mu$ m, posteriormente se congelo y recolectaron muestras para la determinación de proteína y la prueba de actividad biológica. Finalmente se liofilizo con el objetivo de concentrar y eliminar el agua.

### **7.2 Determinación de proteínas.**

Se determino la cantidad de proteína de cada una de nuestras muestras obtenidas en cada paso de obtención y purificación del FTcal (Factor de transferencia calostril) por métodos cualitativos como Biuret, ninhidrina y cuantitativos como el método de Bradford.

#### **7.2.1 Método de Biuret.**

Para esta prueba se colocó 1 mL de cada una de las muestras almacenadas (calostro sin tratamiento, calostro centrifugado, dializado y liofilizado) en un tubo de ensaye de 5 mL, posteriormente a cada tubo se le adicionó 2 mL de NaOH al 10% y 1 mL de reactivo de Biuret. Sin agitación, se dejó reposar durante 5 min para observar la formación de un anillo violeta en la parte superior de la solución, lo que nos indicó una prueba positiva.

### 7.2.2 Método de ninhidrina.

Para esta prueba se colocó 1 mL de cada una de las muestras almacenadas (calostro sin tratamiento, calostro centrifugado, dializado y liofilizado) en un tubo de ensaye de 5 mL, posteriormente a cada tubo se le agregaron 3 gotas de ninhidrina al 1%, se agitó y se dejó reposar durante 5 min para observar la formación de un complejo colorido color violeta; lo cual indica prueba positiva. Cuando la formación del complejo no se observó, los tubos se colocaron en baño de agua a ebullición durante 2 minutos.

### 7.2.3 Método de Bradford

se realizo una dilución 1:10 de una solución de 1mg/ml de albúmina sérica bovina, fracción V, para obtener la siguiente curva:

Concentración	BSA(1 $\mu$ g/ $\mu$ l	H2O	REAGENTE
0 $\mu$ g/ml	0 $\mu$ l	100 $\mu$ l	1ml
20 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ l	80 $\mu$ l	1ml
40 $\mu$ g/ml	40 $\mu$ l	60 $\mu$ l	1ml
60 $\mu$ g/ml	60 $\mu$ l	40 $\mu$ l	1ml
80 $\mu$ g/ml	80 $\mu$ l	20 $\mu$ l	1ml
100 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ l	0 $\mu$ l	1ml

De cada muestra se hicieron por duplicado diluciones 1:5 y 1:15 se dejaron incubar por 10 minutos y se determinó la absorbancia en el espectrofotometro a 595nm. Y se interpolo la absorbancia de las muestras para conocer su concentración

### 7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Los reactivos empleados para la formación del gel de poliacrilamida son acrilamida, N,N'-metilen-bis-acrilamida (bis-acrilamida), tetrametilen diamina (TEMED) y persulfato de amonio.

Se preparó un gel de poliacrilamida duodecil sulfato de sodio como se indica a continuación (ver cuadro No. 7.3.1.1)

1. Se preparó un gel separador a 18% ( la mezcla se vierte rápidamente a la cámara de electroforesis guardando una pequeña cantidad para observar el momento de la polimerización), se le agrego alcohol isopropilico sobre el gel y se retiro al momento de la polimerización, se enjuaga con agua desionizada para quitar el exceso de alcohol y se seco con papel filtro.
2. Se preparo el gel concentrador al 5% el cual se adicionó sobre el gel de separación con cuidado y rapidez, guardando una pequeña cantidad para observar el momento de la polimerización, se coloco el peine el cual se retiro cuando el gel polimeriza.

	Gel de separación	Gel de condensación 5%
Volume 10ml	18%	
Agua destilada	2.5ml	3.4ml
Tris-HCL,pH8.8	1.25ml	-
Tris-HCL,pH6.8	-	0.63ml
SDS 10%	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
BIS/Acrilamida 30%	6ml	0.83ml
Persulfato de amonio	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

Cuadro 7.3.1.1 Cantidades para preparar el gel de poliacrilamida

Se montaron las placas en la unidad de electroforesis teniendo cuidado de que no existieran fugas, se llenó con regulador de corrimiento. Se colocaron 20  $\mu$ l de las muestras de FTcal concentrado, FTcal dializado y el marcador de bajo peso molecular SIGMA ultra low range con un rango de peso molecular de 1,060-26,600 daltons cada muestra se preparó con 10 $\mu$ l de regulador de muestra 2X. Se conectó la cámara a la fuente de poder. Se aplicaron 30 mA de corriente constante, se mantuvo el corrimiento hasta que el azul de bromofenol llegó a unos 0.5 cm del final de la placa. Se desconectó el aparato y se sacó el gel.

### **7.3.2 Tinción con azul de Coomassie.**

Se colocó el gel en un envase con 50 mL de colorante de trabajo para tinción de proteínas y se dejó reposar hora y media. Se eliminó el colorante con la solución decolorante haciendo los cambios necesarios hasta que se logró nitidez adecuada de las bandas.

### **7.3.3 Determinación del peso molecular.**

Para determinar el peso molecular del contenido del FTcal se determinó el Rf de cada uno de los marcadores de peso molecular mediante la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia de la parte superior del gel a la banda}}{\text{Distancia de la parte superior al frente del azul de bromofenol}}$$

Se realizó a partir de los valores obtenidos en una gráfica, colocando el valor de Rf de cada proteína conocida en el eje de las abscisas y el log de su peso molecular en el eje de las ordenadas. Se calculó el peso molecular del contenido del FTcal interpolando en la gráfica el valor de Rf correspondiente a la muestra problema.

## 7.4 Inducción del tumor.

Las células de glioma C6 de rata (American Tissue Culture Collection, Manassas, MD), cultivadas bajo condiciones de esterilidad en medio mínimo esencial suplementado con suero fetal bovino (10%) a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de dióxido de carbono. Cuando el cultivo estuvo confluyente, las células fueron lavadas, dos veces, en solución salina estéril, cosechado y contado en un hematocitómetro. El glioma fue inducido en ratas Wistar de 40 días de edad por vía subcutánea en el muslo izquierdo con un inóculo de  $10^7$  células C6 de cultivo. A los 20 días después de la inoculación, los animales desarrollaron un tumor. Las ratas fueron sacrificadas, el tumor se disecó y disoció mecánicamente a 4°C; una suspensión de  $10^7$  células en 500µl de solución salina se inóculo subcutáneamente en el muslo izquierdo de ratas Wistar hembras. Después de 19-21 días de la implantación se desarrollo un tumor subcutáneo de 2 cm de diámetro aproximadamente (Estos fueron los animales utilizados en este estudio.)

### 7.4.1 Tratamiento con factor de transferencia calostrual.

Las ratas fueron aleatoriamente divididas en 4 grupos según el tratamiento que recibieron: *testigo o control* (n=9) que recibió una sola dosis por vía intratumoral 1 mL de solución salina, en los tres grupos restantes se inocularon diferentes 1 sola vez dosis de FTcal por vía intratumoral como sigue: grupo A: 1ml de FTcal concentrado, 0.455mg (n=10), en el grupo B se trato con 1ml de FTcal diluido 0.0182mg (n=10) y en el grupo C se inoculo 1ml de FTcal 0.00455mg (n=8). grupo A 1 mL del FTcal concentrado (n=10), en el grupo B se utilizó 1 ml FTcal diluido 0.455mg (n=10), en el grupo C se inoculó 1 mL FTcal 0.0182mg (n=8). (ver figura 7.4.1 )

#### **7.4.2 Evaluación del crecimiento neoplásico**

Al iniciar el tratamiento se determinó el volumen ( $\text{cm}^3$ ) del tumor y después semanalmente hasta la tercera semana, mediante la fórmula  $6/\pi \times L \times W \times H$  descrita por Tamayko y Reynolds en 1989 donde L= largo; H= alto y W= ancho. Las mediciones fueron realizadas por la misma persona.

#### **7.4.3 Análisis estadístico.**

Los resultados de volumen tumoral fueron analizados con el método de ANOVA para medidas repetidas con la ayuda del programa de computación SPSS (ver 10.0 para Windows).

#### **7.5 Determinación de la actividad biológica del FTcal producción del factor inhibidor de leucocitos (LIF).**

Cuando ocurre el contacto entre el antígeno y el linfocito sensibilizado éste se activa iniciándose una serie de cambios metabólicos.

Uno de los resultados de dicha activación es la producción y liberación de citocinas, responsables de varias actividades biológicas que se pueden determinar *in vitro*. (Murillo, 1986)

Los linfocitos T provenientes de sangre periférica son capaces de producir el factor de inhibición de la migración de macrófagos o leucocitos polimorfonucleares, estos factores impiden que los leucocitos y macrófagos continúen migrando y además los mantienen en el área cercana al linfocito T que reconoció al antígeno. El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es diferente al inhibidor de la migración de leucocitos (LIF). (Rojas-Espinosa 2001)

La determinación *in vitro* de estos factores se considera como correlación de hipersensibilidad retardada. Ósea que cuando un antígeno se pone en contacto con los linfocitos de un animal y estos sintetizan LIF, se da por hecho que el animal ha tenido contacto previo con el antígeno usado y desarrolló una respuesta inmune

celular. De esta manera la prueba de LIF es una alternativa a la prueba de intradermorreacción. (Rojas-Espinosa,2001)

Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Se extrajo sangre periférica de cada uno de los animales de experimentación (ratas y vacas), a la sangre se le agregaron 2 mL de gelatina al 3%, se agitó y se dejó reposar una hora a 37° C, en un ángulo de 45°. Se transfirió el plasma a un tubo estéril de 15 x 100 mm con tapón de rosca; se centrifugó a 250g durante 10 min, se lavó dos veces con solución de Alsever, centrifugando en cada lavada. Se resuspendió el último sedimento en 1 mL de medio de cultivo MEM. Se llenaron los capilares con la solución anterior hasta  $\frac{3}{4}$  partes, se sellaron a la flama del mechero por el extremo vacío. Se centrifugaron a 250g durante 3 min, para obtener el paquete celular. Se cortó cada capilar en la interfase células-sobrenadante y se colocaron dos capilares por cámara de Bloom en posición V, fijándolos con silicón, de forma tal que las áreas de migración no se mezclaron. Se cubrió cada cámara con cubreobjetos y se selló con parafina. Posteriormente se llenaron las cámaras por los orificios superiores, una solo con medio MEM (testigo), otra se llenó con 0.1 mL de antígeno PPD (testigo positivo), otra se llenó con 0.1 mL de FTcal (problema 1) y otra con 0.1 mL de antígeno de glioma (problema 2). Finalmente se llenaron completamente con medio MEM, se sellaron los orificios superiores con parafina y se incubaron en posición horizontal, a 37° C por 24 horas. Para determinar el resultado, se midió el área de migración a las 24 horas, esto proyectando las sombras de las migraciones sobre papel usando un proyector; se recortaron, se pesaron en balanza analítica y se calculó el índice de migración; si este fue menor de 0.8 nos indicó que hubo producción de LIF, y si fue mayor de 0.8 nos indicó que no hubo producción de LIF. (ver figura 7.5.1)

$$\text{Índice de migración} = \frac{\text{Peso promedio de las áreas de migración con Ag}}{\text{Peso promedio de las áreas de migración sin Ag}}$$

**7.6 Prueba de DTH (delayed type hypersensitivity) para determinar la transferencia de inmunidad así como la especificidad del Factor de transferencia calostrual.**

Se utilizaron 60 ratones Balb C machos los cuales fueron divididos en 5 grupos, cada grupo fue inmunizado con 100µl del tratamiento correspondiente a cada grupo y estos fueron retados con 7.8 µg del antígeno de glioma C6 en la pata izquierda y 20µl de solución salina. Y las patas se midieron a las 24 y 48 horas como lo indica el siguiente cuadro:

<b>Grupo 100µl</b>	<b>Dia de inmunizaciór</b>	<b>RETO</b>	<b>24 Y 48 horas</b>
<b>1) Control SS.</b> <b>2) Control FT tb</b> <b>3) FTcal concentrado</b> <b>4) FTcal 0.0045mg/ml</b> <b>5) FTcal 0.00045mg/ml</b>	Miden las patas derecha e izquierda	Pata izquierda con 20µl del ag de glioma C6 (7.8µg) y 20µl de SS en la pata derecha	Lectura del grosor del cojinete plantar izquierdo con ag de glioma C6 y de la pata derecha con SS

Cuadro 7.6.1.1 Prueba de DTH (delayed type hypersensitivity) para determinar la transferencia de inmunidad así como la especificidad del FTcal.

### **7.6.1 Análisis Estadístico.**

Los resultados fueron analizados con la prueba una prueba de t de student, con la ayuda del programa sigma stat software versión 2.0.

## **Capitulo 8. RESULTADOS**

### **8.1 Determinación de proteínas.**

La tabla 8.1.1, muestra que todas las pruebas fueron positivas para las diferentes muestras analizadas, lo que confirma la existencia de proteínas y de que existen estructuras con enlaces peptídicos, este enlace es propio de la molécula del FTcal, lo que confirma su presencia en las diferentes muestras analizadas.

### **8.2 Método Bradford**



En la determinación cuantitativa los resultados de la tabla 8.2.1 muestran que el mayor contenido de proteínas fue cuando el calostro aún no se sometía a ningún tratamiento, esto se explica basándose en que el producto como tal tiene gran cantidad de caseína y otras proteínas, la cantidad de proteínas disminuyó posteriormente cuando fue tratado a través de los ciclos de centrifugación ya que el objetivo de estos ciclos fue eliminar la caseína, así como otros componentes que no fueron de interés. La fracción dializada disminuyó en gran cantidad en el contenido de proteínas, pero aquí aseguramos que tenemos el FTcal, en el agua de diálisis tiene un peso de menos de 6 kDa. El objetivo principal de la liofilización fue el de concentrar el FTcal, objetivo que se observa fue cumplido.

### **8.3 Determinación de la actividad biológica del FTcal (LIF)**

Respecto a la determinación de la actividad biológica, los resultados de la tabla 8.3.1 muestran que las células leucocitarias de un individuo sin inmunidad celular al glioma C6, no producen LIF, aún en presencia del antígeno, ocurriendo así la libre migración de las células; pero en presencia del antígeno, las células de un individuo que ya ha tenido contacto con el antígeno producen LIF, y este inhibe la migración de los leucocitos; en este caso el FTcal fue capaz de inducir la producción de LIF en las células de vaca y de rata que no habían estado en contacto con el glioma C6, favoreciendo así una respuesta inmune celular.

### **8.4 Presencia de péptidos de bajo peso molecular en Electroforesis en gel de acrilamida 12% - SDS.**

Se sometieron dos muestras de FTcal a electroforesis en gel de acrilamida, una muestra concentrada y otra dializada solamente. En la figura 8.4.1 se muestran fotografías del gel obtenido; se observa una banda provenientes de ambas muestras corresponden a un peso molecular de alrededor de 5 kDa.

#### **8.4.1 Determinación del peso molecular del contenido del FTcal**

Para poder determinar el peso molecular del contenido del FTcal se realizó una curva tipo de log del peso molecular contra el valor de Rf de cada banda del marcador de peso molecular; esta curva tipo se muestra en la grafica 8.4.1.1. Se observa adecuada linealidad de la curva tipo obtenida. Extrapolando el Rf de la banda de cada una de las muestras del FTcal se obtuvo como valor de peso molecular 4.9148 kDa.

### **8.5 Evaluación del volumen del Glioma C6.**

Se formaron aleatoriamente 4 grupos de ratas con un tumor subcutáneo de 2 cm de diámetro, fueron divididas según el tratamiento que recibieron: *testigo* o

*control* (n=9), *grupo A*: FTcal 0.455mg (n=10), en el *grupo B*: FTcal diluido 0.0182mg (n=10) y *grupo C*: FTcal 0.00455mg (n=8).

En la gráfica 8.5.1 se observa diferencia estadísticamente significativa en la cinética de crecimiento del glioma C6 entre los grupos tratados con las diferentes concentraciones de FTcal (0.455mg, 0.0182mg y 0.00455mg) cuando se comparan con el grupo control ( $p < 0.03$ ,  $p < 0.02$  y  $p < 0.01$  respectivamente). Entre tratamientos de FTcal no se observa diferencia estadísticamente significativa.

### **8.6 Evaluación de la DTH para medir la Transferencia de inmunidad así como la especificidad.**

En la graficas 8.5.2 se puede observar las diferencia estadísticamente significativas en la transferencia de inmunidad de una especie a otra con el grupo tratado con FTcal concentrado ( $p < 0.001$ ), FTcal 0.00455mg/ml ( $p < 0.001$ ), y FTcal 0.00045mg/ml ( $p < 0.001$ ). Si lo comparamos con el grupo control tratado con solución salina fisiológica podemos determinar que los ratones no habían estado en contacto con el antígeno de Glioma C6 ya que los resultados de este grupo no fueron significativos como tampoco lo fue el grupo tratado con Factor de Transferencia específico para tuberculosis lo cual marca la especificidad del FTcal para Glioma C6.

Muestra	Prueba	
	Biuret	Ninhidrina
Calostro sin tratamiento	+	+
Calostro centrifugado	+	+
Dializado	+	+
Dializado liofilizado (FTcai)	+	+

**Tabla 8.1.1** Muestra los resultados de las pruebas de determinación cualitativa de proteínas por la prueba de Biuret y Ninhidrina, para las diferentes muestras tratadas.

+ = prueba positiva. - = prueba negativa.

Muestra	mg/mL de proteína
Calostro sin tratamiento	5.7
Calostro centrifugado	5
Dializado	0.36
Dializado liofilizado (FTcal)	<b>0.4550</b>

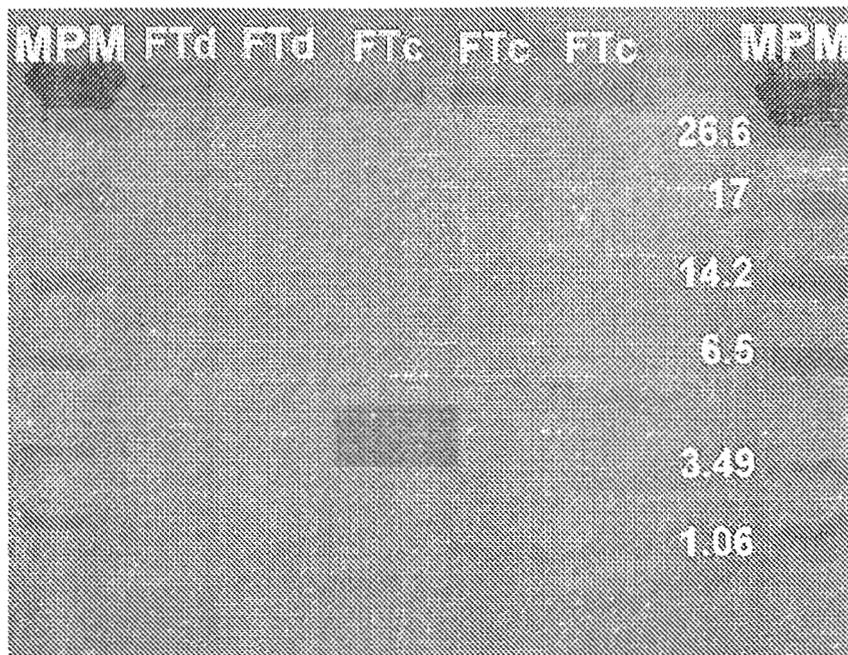
**Tabla 8.2.1.** Muestra los resultados de las pruebas de determinación cuantitativa de proteínas por el método de Bradford, para las diferentes muestras tratadas. La concentración se representa en mg/mL de proteína.

Muestra	Resultado	
	Glioma C6	Dializado liofilizado (FTcal)
Rata sin tumor	0.94	<b>0.63</b>
Rata con tumor	<b>0.40</b>	<b>0.54</b>
Vaca sin inmunizada	0.90	<b>0.57</b>
Vaca inmunizada	<b>0.47</b>	<b>0.27</b>

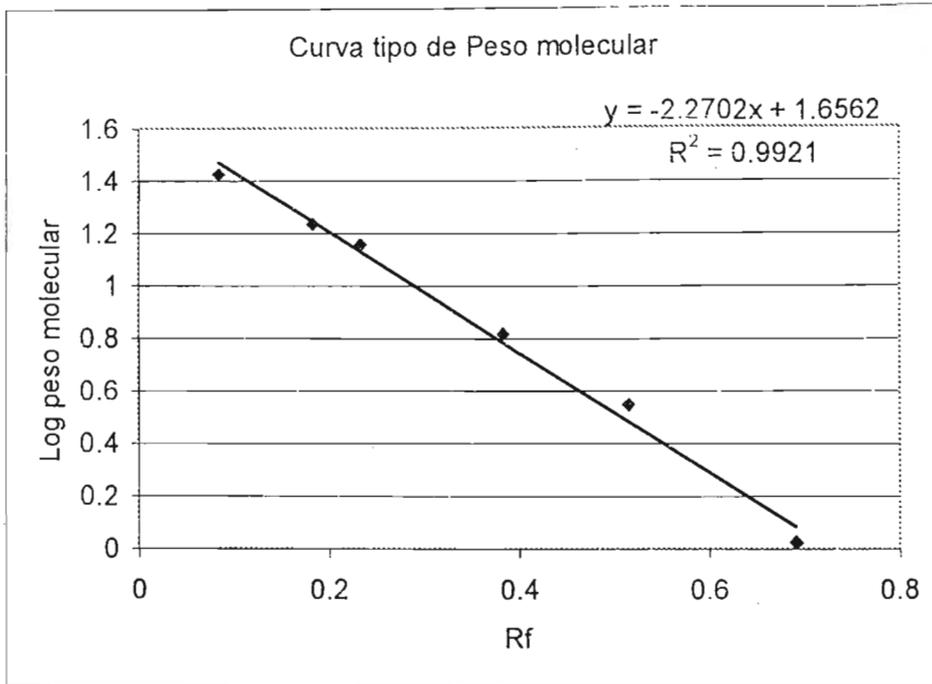
Tabla 8.3.1 Muestra los resultados de la prueba la determinación del factor de inhibición de la migración de leucocitos (LIF), para las diferentes muestras tratadas, los resultados fueron analizados con t de student obteniendo resultados estadísticamente significativos en las ratas ( $p < 0.017$ ) y en las vacas ( $p < 0.012$ )

Nota: Los números en negro representan los valores positivos a la prueba de LIF lo que indica que los leucocitos han sido activados para producir LIF y favorecer una respuesta inmune celular

Se considera positivo si el índice de migración es menor a 0.8gr por lo tanto los valores menores a esto son negativos, los leucocitos no producen LIF



**Figura 8.4.1** Muestra los resultados de la prueba de determinación de péptidos de bajo peso molecular. Se puede observar una banda del FTcal que corresponde a un peso molecular de alrededor de 5kDa



Gráfica 8.4.1.1 Curva obtenida para la determinación del peso molecular del factor de transferencia calostrala .

Peso molecular del contenido del FTcal	4.91148 kDa
--	-------------

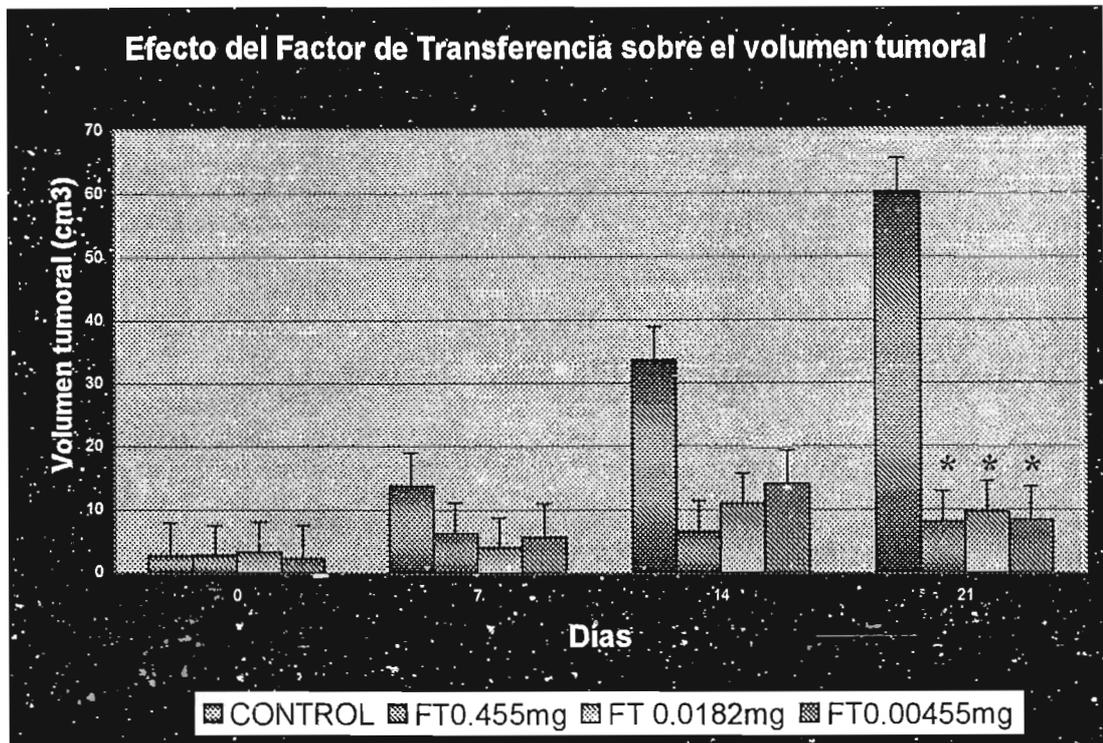


Figura 8.5.1 Se muestra la comparación del volumen medio del tumor +EE en ratas Wistar con diferentes tratamientos de FTcal. Se puede apreciar la reducción en el volumen tumoral después del tratamiento con FTcal con respecto al grupo testigo. La cinética de crecimiento muestra diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los grupos tratados con FTcal ( $p < 0.03$ ,  $p < 0.02$  y  $p < 0.01$  respectivamente). Entre tratamientos de FTcal no hay diferencia estadísticamente significativa.

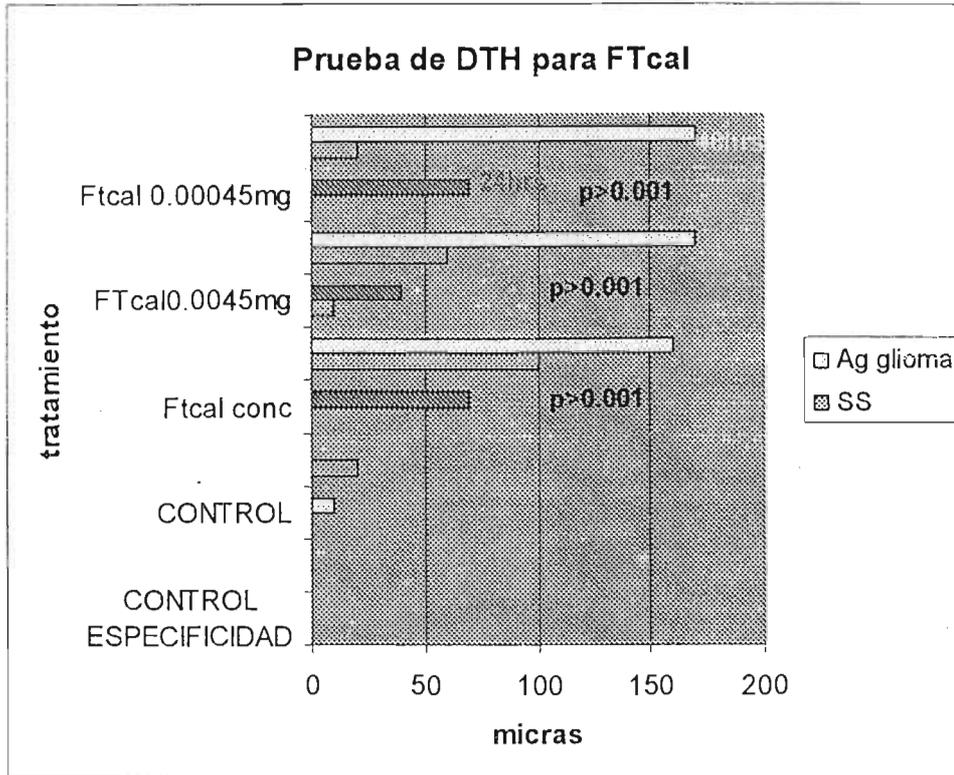


Figura 8.5.1 Se muestra el aumento del grosor del cojinete plantar en donde se puede observar el aumento en el grosor del cojinete después del tratamiento con FTcal con respecto al grupo control. La transferencia de inmunidad de una especie a otra muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados con FTcal concentrado ( $p < 0.001$ ), FTcal 0.00455mg/ml ( $p < 0.001$ ) y FTcal 0.000455mg/ml ( $p < 0.001$ ) y el grupo control. Así como la especificidad del FTcal ya que el grupo control tratado con FTtb no muestra diferencia estadísticamente significativa.

## Capítulo 9 Discusión.

### 9.1 Estandarización de la metodología para la obtención y purificación del Factor de Transferencia calostroal (FTcal).

El calostro es la secreción presente en la glándula mamaria durante las primeras horas después del parto; es rico en inmunoglobulinas y células como linfocitos T, linfocitos B y macrófagos (Wilson,1988). Contiene 3.6% de grasa 14.2% de proteínas entre las que se encuentra la caseína que es la principal proteína que ocupa el 5.2%, vitaminas y minerales proporcionándole al becerro los nutrientes que requiere (Quiroz,1998). Además la madre le transfiere al becerro una inmunidad tanto humoral por medio de los anticuerpos y un inmunidad de tipo celular por medio de las células y otros factores solubles como el **Factor de transferencia** el cual se encuentra en gran cantidad en el calostro y se cree que puede ayudar o inducir a las células T favoreciendo la respuesta inmune.

Conociendo esto podemos considerar que el calostro es una fuente para la obtención de Factor de transferencia el cual se encuentra 1000 veces más concentrado comparado con el FT obtenido a partir de sangre periférica y órganos linfoides (Wilson 1988) sin descartar la gran cantidad de mililitros de FTcal obtenidos por vaca. Además de obtener un FTcal específico por medio de la exposición o inmunización del antígeno a la vaca durante el tiempo de gestación.

En este trabajo se estandarizo la metodología para la obtención y purificación del FTcal, utilizando la ultra centrifugación con el objetivo de separar células, grasas, proteínas, componentes principales del calostro sin afectar el FT. Las ultra centrifugaciones iban desde 3500-12000rpm en un periodo de tiempo de 15min a 1 hora a una temperatura de 4oC por litro de calostro señalando que por vaca obtuvimos 15 litros de calostro durante las primeras 72hr después del parto.

Fue posible su purificación y por medio de diálisis utilizando una membrana con un punto de corte de 10 kDa; posteriormente se liofilizo, para lograrlo se

estandarizo la temperatura y el tiempo de liofilizado para una adecuada concentración del Factor de Transferencia así como la eliminación de agua.

## **9.2 Determinación de proteínas.**

El FT es de origen polipeptídico (Kirkpatrick, 1993) por esto se evaluó la existencia de estos péptidos por pruebas de Ninhidrina y Biuret con el fin de corroborar la presencia del FTcal en cada uno de los pasos de purificación así como en el producto final. En la tabla 8.1.1 se pudo observar que cada una de las muestras se obtuvieron resultados positivos por lo tanto hasta este momento se supuso que en las muestras estaba el Factor de Transferencia ya que existía el temor de perder nuestro producto al ser tratado por los diferentes métodos.

Para obtener resultados más precisos se realizó una prueba cuantitativa por el método de Bradford para corroborar la presencia de los péptidos además de conocer la cantidad de proteína. Kirkpatrick en el año 2000 pudo secuenciar una región conservada del Factor de transferencia en la cual se observaban algunos aminoácidos entre los cuales estaba la tirosina conociendo ya de antemano que la tirosina posee un anillo fenolico esta prueba es capaz de indicar la presencia de compuestos fenolicos y enlaces peptídicos esto nos ayuda a creer que estaba presente el Factor de Transferencia en cada muestra. (Murilla,1986) en la Tabla 8.2.1 se observó que la cantidad de proteína variaba en cada muestra según el tratamiento, en el calostro la cantidad de proteína es mayor ya que la principal proteína del calostro era la caseína cuya estructura globular y su peso molecular facilitaba su separación, si la comparamos con el calostro que ya fue ultracentrifugado nos hace pensar que posiblemente esta proteína y otras de alto peso molecular son eliminadas por la ultracentrifugación, conforme avanza en el proceso la muestra la cantidad de proteína total es menor, en la muestra dializada la proteína disminuyó aun más por el punto de corte de la membrana que solo permitió el paso de moléculas menores a 10,000daltons lo que significaba que en el

producto final se podría encontrar, algunas hormonas o moléculas cuyo peso molecular era menor a 10,00daltons, además es probable que se encontraran diferentes factores de transferencia dependiendo de la experiencia inmunológica de la vaca, entre ellos contra las células del glioma C6. Finalmente cuando se le retiró agua al producto por medio de la liofilización, se incremento la cantidad de proteína, debido a que el producto se concentro.

### **9.3 Presencia de péptidos de bajo peso molecular, por técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida.**

La electroforesis en gel de poliacrilamida SDS es una técnica de separación de proteínas y polipéptidos de alta resolución. En los geles se utilizo un gel al 18% ya que en el gel de poliacrilamida el tamaño molecular es determinante para sus separación y está determinado por la concentración total de monomeros (acrilamida, bis-acrilamida) y el porcentaje que representa la bis-acrilamida del total de monómeros. Considerando lo anterior puede entenderse que la movilidad de la molécula a través del gel depende tanto del tamaño de la molécula como de los poros a través de los cuales debe pasar. Esto se conoce como efecto de filtración y permite que se incremente la resolución del método. Si el tamaño de los poros del gel tiene un diámetro menor que el de la molécula, no importa la carga eléctrica de la misma o la fuerza eléctrica del campo, sencillamente la molécula no se mueve (Anthony & Andrews, 1981). Además en este tipo de geles el número de bandas observadas sobre el gel representa el número mínimo de moléculas que pueden estar presentes en la muestra y la detección de una banda significa que la muestra esta en altas concentraciones (Anthony & Andrews, 1981). Debido a la alta sensibilidad de la prueba; Utilizando tinción de azul de Coomasie es posible identificar concentraciones de proteínas del orden de  $\mu\text{g}$  (Towbins y cols,1979). En las figura 8.4.1 se observa la determinación de péptidos de bajo peso molecular donde se observo una banda de bajo peso molecular alrededor de 5kDa tanto el FTcal concentrado como el dializado lo que indico que posiblemente tenemos moléculas de FTcal similar a lo ya publicado de que el peso molecular del Factor de

Transferencia es de 5kDa (Kirkpatrick 1993) Estos resultados indican que la metodología empleada para su obtención y purificación del FTcal posiblemente fue la adecuada, considerando que en nuestro país no se ha producido Factor de Transferencia a partir del calostro, además que hasta el día de hoy no se han publicado ensayos de electroforesis convencional de Factor de Transferencia obtenido de sangre periférica el cual es activo a concentraciones del orden de femtomoles ( $10^{-15}$  moles). (Rojas-Espinosa,2001). Se pudo obtener un gel con bandas de FTcal ya que se cree que esta 1000 veces más concentrado en el calostro, lo que facilita su detección por métodos convencionales(Wilson, 1998)

#### **9.4 Determinación de la actividad biológica *in vitro* del Factor de Transferencia calostrual .**

Durante algún tiempo se utilizó la prueba de LIF como una prueba rutinaria para medir la inmunidad celular de un individuo. Se descubrió que los esplenocitos de los cobayos con tuberculosis estimulados *in vitro* con antígeno (tuberculina o PPD) producía un factor capaz de inhibir la migración de los macrófagos , también de cobayo (Rojas-Espinosa, 2001). A este factor se le llamo MIF (macrophage inhibitory factor) y se diseñaron pruebas para medirlo, incluyendo una para trabajar con leucocitos de sangre periférica que es la llamada prueba de LIF. Las células en esta prueba que no reciben estímulo antigénico migran fuera del capilar ocupando un área circular más extensa (Rojas-Espinosa,2001). En presencia del antígeno se activan un conjunto de citocinas tales como IL-1,IL-6,IL-8,IL-12,TNF $\alpha$ ,IL-2, INF $\gamma$  y al resultado de esta actividad en la actualidad se le denomina MIF y LIF cuyo propósito es impedir que tanto los macrófagos como los leucocitos migren y en estas circunstancias las células permanecen dentro del capilar o exhiben una pequeña migración marginal ( Rojas-Espinosa,2001). Sin embargo, estas pruebas han dejado de usarse en la actualidad como técnicas de evaluación de la respuesta celular del individuo, excepto cuando se trata de medir la capacidad de respuesta celular contra antígenos virales potencialmente peligrosos y tumorales, en este trabajo se utilizó y se puede observar en la tabla 8.3.1 que el FTcal fue capaz de

inducir la producción de LIF(citocinas que inhiben la migración leucocitaria favoreciendo la respuesta inmune contra el antígeno) en células de vacas y de ratas que no habían tenido contacto previo con glioma C6 favoreciendo la respuesta celular, ya que posiblemente el Factor actué como un antígeno que activa a las células para iniciar una respuesta inmune celular por lo tanto podemos quizá comprobar que el FTcal actúa como inmunoestimulante.(Pizza,1999; Estrada y cols,1999).

### **9.5 Prueba de DTH (delayed type hypersensitivity) para determinar la transferencia de inmunidad así como la especificidad del FTcal.**

La hipersensibilidad de tipo tardía es una forma de reacción inmunitaria mediada por células en la que la célula efectora final es el macrófago, la erradicación de algunos microorganismos como micobacterias, requiere de la estimulación de la función microbicida de los fagocitos por la citocinas producidas por las células T. La misma secuencia de activación de la célula T y el macrófago puede ser desencadenada por antígenos proteicos solubles o haptenos químicamente reactivos. En esta situación, como en la defensa del huésped, la activación del macrófago puede causar la lesión tisular. Si el antígeno no es un microorganismo, las reacciones de DTH producen lesión tisular sin que proporcionen una función protectora de ahí el término de "hipersensibilidad" (Abbas,1995)

En este trabajo realizamos la prueba de DTH ya que es una prueba usada comúnmente para medir la transferencia de inmunidad del Factor de Transferencia así como la especificidad varios investigadores del Factor de Transferencia como en 1940 Landsteiner y Chanse, 1950 Lawrence, Papaport en 1960, Levin en 1970, Levin en 1973, Fudenberg y Pizza en 1993 y Kirkpatrick en 1993,1997 y el año 2000. Utilizan la prueba de DTH como una prueba básica para medir la propiedad principal del FT que es la transferencia de Inmunidad. Al realizar esta prueba pudimos ver que el FTcal es biológicamente activo en la transferencia de una

respuesta inmune celular. Lo anterior queda demostrado en la grafica 8.6.1 donde se observa que el grupo transferido con FTcal concentrado, diluido 0.0045mg/ml y 0.00045mg/ml muestran un incremento en el grosor de su cojinete plantar en comparación con la basal. Para los tres grupos la diferencia fue estadísticamente significativa por lo que deducimos que dentro de los componentes del FTcal se encuentran moléculas que transfieren DTH, la respuesta de DTH característica en esta prueba posiblemente se desarrolla en 24 a 48 horas, creyendo que en las primeras horas después de la inyección del antígeno, los neutrofilos se acumulan alrededor de las vénulas postcapilares en el lugar de la inyección. El infiltrado de neutrófilos rápidamente desaparecen y a las 12 horas aproximadamente el lugar de la inyección aparece infiltrado por células T y monocitos sanguíneos, las células endoteliales que revisten estas vénulas se hinchan , aumentan la biosíntesis de organelos y se vuelven permeables a las macromoléculas plasmáticas. El fibrinogeno sale de los vasos sanguíneos hacia los tejidos vecinos, donde se transforman en fibrina. El deposito de fibrina y, en menor medida, la acumulación de células T y monocitos dentro del espacio extravascular alrededor del punto de inyección, hace que el tejido se hinche y se vuelva duro, la induración típica de DTH (Abbas,1995)

Por medio de esta prueba deducimos también que el FTcal es específico ya que al comparar el grupo tratado con Factor de transferencia específico para tuberculosis y el grupo tratado con el FTcal específico para glioma C6 de rata los resultados del primer grupo no fueron estadísticamente significativo lo cual da la posibilidad de que el FTcal que obtuvimos en la metodología es específico para el antígeno de glioma C6 de rata, por nos hace pensar que en un futuro puede el extracto ser utilizado en el tratamiento para pacientes con glioblastoma multiforme

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## **9.6 Determinación de la actividad biológica *in vivo* del Factor de transferencia calostrala evaluando la disminución del volumen del Glioma C6.**

Ensayos anteriores a este se encontró que la vía de administración más adecuada del Factor de Transferencia es la intratumoral, comparada con la oral y la subcutánea (Pineda, 2002), por esta vía se optimiza la distribución y biodisponibilidad mediante la reducción de la exposición sistémica alargando la duración de la exposición del FTcal además que se obtiene una mayor concentración del FTcal en las células blanco (Walter y col,1995). En el caso de las neoplasias cerebrales los factores a considerar son más complejos; además de la heterogeneidad de las células tumorales, el acceso al tumor es limitado. La administración intratumoral puede ir acompañada de sustancias de liberación prolongada o tecnología de infusión constante para mantener las concentraciones elevadas del fármaco durante periodos prolongados, así como el uso de braquiterapia esterreotaxica involucrando la colocación exacta del fármaco dentro del tumor sin riesgos sobre el tejido normal (Grossman y col,1987; Waltery col, 1995). En cuanto a la dosis es difícil compararla con otros ensayos ya que no se han reportado el uso de Factor de transferencia calostrala en neoplasias del SNC donde se hayan realizado estudios de efecto dosis-respuesta; además el Factor de transferencia obtenido de otras fuentes como la sangre se determina por el número de células  $4 \times 10^8$  células y se conoce como unidad Internacional (UI) . en este caso no es posible utilizarla debido a que en el calostro el Factor se encuentra soluble, por lo tanto se utilizaron diluciones de manera arbitraria para determinar su actividad aunque se ha observado que la dosificación es importante para evitar bloquear el efecto. En la gráfica 8.5.1 podemos observar que entre las diferentes diluciones utilizadas del Factor de transferencia calostrala (concentrado y diluido 0.0182mg y 0.00455mg), el volumen del tumor se redujo de una manera significativa comparada con el grupo control. Si se considera que el volumen inicial del tumor era de 2cm en cada grupo fue impresionante observar como en el grupo control cada 7 días el tumor fue capaz de triplicar o más el tamaño del tumor

por lo cual no indicó que las células tumorales se multiplican rápidamente, al grado de rebasar el tamaño del animal esto no ocurrió con los grupos tratados posiblemente es debido a que el FTcal modula la respuesta inmune activando a las células mediadoras de la respuesta inmune celular, (células Th1 CD4+ y células CD8+ citotóxicas) y humoral (Th2 CD4, y linfocitos B) además de favorecer la secreción de citocinas proinflamatorias y la expresión normal de moléculas coestimuladoras tanto en las células presentadoras de antígeno APC o en células citotóxicas CD4, CD8 y NK, la inmunidad mediada por células juega un papel importante en el control de la proliferación de células tumorales (Pizza y col, 1993). incrementa la apoptosis, favorece la actividad lítica del complemento ( en presencia de anticuerpos) por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) ejercida por células NK, macrófagos y neutrófilos ; por la citotoxicidad ejercida por linfocitos T y células NK y macrófagos activados con  $INF\gamma$  y por efecto de factores tumorales alfa y beta ( $TNF\alpha$  y  $TNF\beta$ ). (Abbas, 1995) Es por esto la importancia del Factor de Transferencia como inmunomodulador.

En un ensayo previo utilizando Factor de transferencia de sangre de cerdo contra glioma C6 se confirmó lo anteriormente mencionado ya que se observó un incremento de apoptosis, así como el aumento en las subpoblaciones de células CD2+, CD4+ y CD8 y NK así como la expresión de citocinas como IL-2,  $INF\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  en ratones tratados con Factor de transferencia (Pineda 2001)

Debemos considerar que la inmunoterapia del Factor de Transferencia no es la única opción sino que la combinación del FTcal con otros agentes antineoplásicos posiblemente logre ayudar a mejorar el pronóstico de vida de los pacientes con GBM así como la calidad de vida de los mismos (Kito y Yokota 2002) .

## Conclusiones.

- La metodología empleada para la obtención de FTcal fue la adecuada.
- El FTcal tiene una concentración de proteína de 0.3513 a 0.455mg/ml.
- El FTcal induce la producción de LIF.
- El FTcal transfiere inmunidad de una especie a otra
- El FTcal es específico para glioma C6 de rata.
- Por método de electroforesis en gel de acrilamida al 18% se encuentran péptidos de bajo peso molecular alrededor de 5kDa.
- El FTcal induce la reducción del crecimiento tumoral del Glioma C6 de rata.

## Referencias.

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1995). *Inmunología Celular y Molecular*. Interamericana Mc.Graw Hill, Madrid, pp 416-422.
2. Ammirati, M., Rao, S. y Granger, G. (2001). Detection of TNF inhibitors (Soluble Receptors) in the sera and tumor cyst fluid of patients with malignant astrocytomas of the brain. *Frontiers in Bioscience* 6, pp17-24.
3. Ammirati, M., Vick, N., Liao, Y. y Ciric, I. (1987). Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytomas. *Neurosurgery* **21**:201-201.
4. Apuzzo (1991). Malignant Cerebral Glioma. American Association of Neurological Surgeons, Illinois, pp 3-15.
5. Apuzzo (1991). Malignant Cerebral Glioma: American Association of Neurological Surgeons, Illinois, pp 3-15.
6. Barker, F.G.N. e Israel, M.A. (1995) The molecular biology of brain tumors. *Neurol Clin* **13**: 701-702
7. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. (1968). Differentiated Rat Glial Cell Strain in tissue culture, *Science* **161**: 370-371.
8. Bhondeley MK, Mehra RD, Mehra NK, Mohapatra AK, Tandon PN, Roy S, Bijlani V. (1988). Imbalancens in T cell subpopulation in human gliomas. *J. Neurosurg* **68**: 589-593.
9. Bissel MG, Rubistein LJ, Bigham A, Herman MM. (1974). Characteristics of the rat C6 glioma mainteining in organ culture systems. Production of glial fibrillary acidic protein in the absence of gliofibrogenesis. *Brain Researc.* **82**: 77-89.

10. Black PM.(1991). Brain Tumors. *New Engl J Med.* **23**: 1471-1476.
11. Burger PC. (1991). Classification, Grading and Patterns of Spread of Malignant Gliomas. In *Malignant Cerebral Glioma*. American Association of neurological Surgery, Illinois. pp 41-57.
12. Byes A.S. Levin , A.J. Hackett, and H.H: Fudenberg.(1976) Tumor specific cell-mediated immunity in household contacts of cancer patients. *J.Clin. Invest.***55**:500.
13. Candanosa E, Estrada Parra, Trigo T, Velásquez E, Gracia M, Reynaga M (1997). Empleo del factor de transferencia (FT) de origen bovino en el modelo tumoral murino melanoma B<sub>16</sub>. *Vet. Mex.* **28**: 93-99.
14. ColvinM. (1982). The alkylating agents. En *Pharmacologic Principles of Cancer Treatment*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp 276-308.
15. Cotran RS, Kumor V, Robbins S. (1989). Soft Tissue tumors and tumor like conditions, in *Robbins Pathologic basis of Disease*. W.B. Saunder Co. Philadelphia. pp 1371-1382.
16. Couldwell H, wt, Mitchell MS, Mazumber A, Apuzzo M. (1991). Immunology and immunotherapy of intrinsic glial tumors in malignant cerebral glioma . En Apuzzo MJ (ed), *American Associatio of Neurological Surgery Illinois*. pp:41-56
17. Cravioto H, Hirt P, Bloom A and Dunousky F. (1976). Immunology of experimental brain tumors in inbred rats, *J Neuropath exp Neurol.* **35**: 356.
18. Chase, M.W. (1942). *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **49**:688
19. De Angelis. Brain Tumors. (2001). *N Eng J Med.* **344**:114-123.

20. Dix AR, Brooks W, Rozzman TL, Morford MA. (1999). Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J. Neuroimmunolog Dec* **100**:216-232.
21. Ehrenreich, H., Rieckman, P., Sinowatz, F., Weih, K.A., Arthur, L.O., Goebel, F.D., Burd, P.R., Coligan, J.E., y Clouse KA (1993). Potent stimulation of monocytic endothelin -1 production by HIV-1 glycoprotein 120. *J Immunol* **150**(10):4601-4609
22. Estrada-Parra S, Cabezas R, Velasco O, Ondarza R, Chávez R, Berron R, Pedroza A, Serrano E, Calva C, Pérez C, Correa B, Ramírez R, Estrada I, Rojas O, Sánchez J, Badillo A, García MT, Santos L, Flores L, Flores G, Orea M, Guido R, Reyes S, Tamez R, Rodríguez R, Salinas MC, Welsh O, Montes JL, Parilla V, Jiménez. G (1999). El sistema inmune y el uso del factor de transferencia *ciencia UANL* **2**:237-243.
23. Estrada-Parra S, Cabezas R, Ondarza R, Chávez R, Berron R, Pedroza A, Serrano E, Calva C, Correa B, Nagaya A, Estrada I, Rodríguez O (1998) Comparative study of transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster. *International Journal of Immunopharmacology*. **20**:521-535
24. Estrada-Parra S, Castrejón OV, Reborá F, Díaz ML, Padierna J. (1983). Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con factor de transferencia específico. *Salud Pública*. **25**:589-600.
25. Farrell CL, Stewart PA, Del Maestro RF. (1987). A new glioma model in rat: the C6 astrocytoma implantation technique permeability and vascular characterization. *J. Neuro-oncol* **4**: 403-415.

26. Fiebig HH, Schmahl P. (1979). Development of models for brain tumors in rats and their responsiveness to chemotherapy with nitrosoureas. *Proc Am Assoc Cancer Res.* **20**:276.
27. Fine HA, Dear KG, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP (1993) Meta-Analysis of Radiation Therapy with and without Adjuvant Chemotherapy for Malignant Gliomas in Adults. *Cancer.* **71**:2585-2597.
28. Fred H, Pruitt A. (1994). Neoplasm of the central nervous system. In Harrison principles of internal medicine; Isserbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL (eds), pp: 2597-2603.
29. Fontana, A., Hengartner, H., Chemotherapy for brain tumors. (1995). In: Brain tumors, Ed Kaye, H.A., Laws E.R. Edinburgh; Churchill Livingstone, pp 349-360.
30. Fudenberg HH, Pizza G. (1993). Transfer factor *New Frontiers. Progress in Drug Research.* **42**:309-400.
31. Gottlieb AA, Sizemore RC, Gottlieb MS, Kern CH. (1995) Rationale and clinical results of using leucocyte-derived immunosupportive therapies in HIV disease. *Biotherapy* **9**: 27-31.
32. Gynsin, R., Moore, B.W., Proffitt, R.T., Deuel, T.F., Caldwell, K. y Glaser, L. (1980). Regulation of the synthesis of S-100 protein in rat glial cells. *J Biol Chem* **255(4)**: 1515-1520
33. Iwasaki Y, Sako K, Tsunoda I, Ohara Y (1993) Phenotypes of mononuclear cell infiltrates in human central nervous system. *Acta Neuropathol* **85**: 653-657.

34. Kirkpatrick CH, Gallin JI. (1974). Treatment of infections and neoplastic diseases with transfer factor. *Oncology* **29**: 46-73.
35. Kirkpatrick CH. (1977). Transfer of cellular immunity with transfer factor. *Allergy and Clinical Immunology* **63**:71-73.
36. Kirkpatrick CH; Greenberg LE; Petersen EA. (1983). Transfer factor lymphokines **8**:1-39.
37. Kirkpatrick CH, Rozzo SJ. (1992). Purification of transfer factors. *Mol. Immunol* **29**: 167-182.
38. Kirkpatrick CH. (1993). Structural Nature and Functions of Transfer Factor *Annals New York Academy of Sciences* **685**: 362-368.
39. Kirkpatrick CH. (2000). Transfer Factors: Identification of conserved Sequences in Transfer Factor Molecules. *Molecular Medicine* **6(4)**: 332-341.
40. Kornblith PL, Walker MD. (1988). Chemotherapy for malignant gliomas. *J Neurosurg.* **68**: 1-17.
41. Lantos PL: Tumors of the nervous system (1992) In Oxford Textbook of Pathology; Mc Gee JO, Isaacson PG and Wright NA. Oxford University Press, pp 1883-1896
42. Lawrence HS, Borkowsky W. (1983). A new basis for the immunoregulatory activities of transfer factor an arcane dialect in the language of cells. *Cell. Immunol.* **32**:102-116.
43. Lawrence HS. (1954) The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leukocytes. *J Clin Invest.* **34**: 219-210

44. Leibel, S.A., Scott, C.B. y Pajak, T.F. (1991). The management of malignant gliomas with radiation therapy: Therapeutic results and research strategies. *Semin Radiat Oncol* 1:32-49.
45. Levin AS. (1970) Wiskott-Aldrich syndrome, a genetically determined cellular immunology deficiency: clinical and laboratory responses to therapy with transfer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **67**: 821-828.
46. Levin AS. (1973). Transfer factor therapy in immune deficiency states. *Ann. Rev. Med.* **24**:175-208.
47. López Gonzales MA, Sotelo J. (2000) Brain tumors in México: characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surgical Neurology.* **53**:157-162.
48. Lown JW, Chauhan SMS. (1981). Mechanim of action of (2-haloethy) nitrosoureas on DNA. *J med Chem* **24**: 270-9.
49. Magyesi F, Farrell L, Del Maestro RF. (1990). Investigation of an inhibitor of lipid peroxidation U74006F on tumor growth and protein extravasation in the C6 astrocytoma spheroid implantation glioma model. *J Neuro Oncology* **8**:133-137.
50. Mahaley MS, Brooks WH, Roszman TL, Binger DD, Duka L, Richardson S. (1977). Immunobiology of primary intracranial tumors. *J. Neurosurg.* **46**:463-469
51. Mahaley MS, Hipp SW, Dropcho EJ. (1989). Intracarotid cisplatin therapy for recurrent gliomas. *J. Neurosurg.* **70**:371-8.
52. Mcdonald JS, Weiss RB, Poster D, Hammershaimb L. (1981). Subacute and chronic toxicities associated with nitrosourea therapy. En: Prestakyo AW, Baker LH, Croode ST, Carter SK, Schein P,

Nitrosoureas, current status a new development Academic Press, New York, pp:145-53.

53. Mendelsohn J. (1994) Basic principles of the neoplasm. In Harrison principles of internal medicine; Isserbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL pp: 2090-2107.
54. Patsouris, E., Davaki, P., Kapranos, N., Davaris, y Papageorgiou, K.A. (1996). A study of apoptosis in brain tumors by *in situ* end-labeling method. *Clin Neuropathol* 15:337-341.
55. Peterson DL, Sheridan PJ, Brown WE. (1994). Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions. *J. Neurosurg.* **80**:865-876.
56. Pizza G, DeVinci C; Fudenberg HH. (1993). Transfer factor in malignancy. *Progress in Drug Research* **42**: 401-420.
57. Pollack, I.F., Hamilton, R.L., Finkelstein, S.D., Campbell, J.W. Mañínez, A.J., Serwin, R.N. (1997). The relationship between Tp53 mutation and overexpression of p53 and prognosis in malignant gliomas of childhood. *Cancer Res* **57**:304-309
58. Rapaport, F.T.; J.W. Millar, D. Pappagianis & C.E. Smith. 1960. Transfer of delayed hypersensitivity to coccidioidin in man. *J. Immunol.* **84**:358-367.
59. Rozzo SJ; Kirpatrick CH. (1992). Purification of transfer factor. *Mol Immunol.* **29**:167-182.
60. Sawamura, Y. y Tribolet, N. (1990). Immunobiology, of brain tumors. *Adv. Tech. Stand. Neurosurg.* **17**:3-64.

61. Schuster, J.M., Garg, P.K., Binger, D.D. y Zalutsky, M. (1991). Improved therapeutic efficacy of a monoclonal antibody radioiodinated using N-succinimidyl-3-(tri-n-butylstannyl)benzoate. *Cancer Res* **51**:4164-4169.
62. Smith KR, Jr, Wilson CB, Strike TA. (1980). Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N. Eng. J. Med* **303**: 1323-1329
63. Tada M, Tribolet N. (1993). Recent advances in immunobiology of brain tumors. *J Neuro-oncology* **17**: 261-271.
64. Tomayko MM, Reynolds PC. (1989). Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice *Cancer Chemother Pharmacol* **24**: 148-154.
65. Trojan J, Johnson RT, Rudin DS, Llan J, Tykocinski ML, Llan J. (1993). Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cell expressing antisense insulin-like growth factor RNA. *Science*. **259**:94-97.
66. Turner NC. (1992) Acute Inflammation, the response to injury in Oxford textbook of Pathology. Mc Gee JO, Isaacson PG and Wright NA. Oxford University Press, **225**:351-386.
67. Walter DA, Tamargo RJ, Olivi A, Burger PC, Brem H. (1995). Intratumoral chemotherapy. *Neurosurgery*. **37**:1129-1145.
68. Wilson CB, Boldrey EB, Enot KJ. (1970). 1,3 bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea (NSC 409962) in the treatment of brain tumors. *Cancer Chemother Rep*, **50**:273-81.
69. Wilson GB; Poindexter C, Fort JD, Ludden KD. (1988). De novo initiation of specific cell-mediated immune responsiveness in chickens

by transfer factor (specific immunity inducer) obtain from bovine colostrums and milk. *Acta Virol Jan.* **32**:6-18.

70. Wise R J, Thomas D.J, Lammertsma AA, Rhodes CG. (1984) PET Scanning of Human Brain Tumors. *Prog. exp. Tumor Res.* **27**:154-169.

71. Young RC, De Vita VT, Serpick AA, Canellos GP. (1971). Treatment of advanced Hodgking's disease with (1,3 bis(2-cloroethyl)-1 nitrosourea BCNU. *N. Eng. J. Med.* **285**:475-479.

72. Yung a. New Approaches to molecular therapy of brain tumors. (1994). *Current Opinion in Neurology.* **7**:501-505