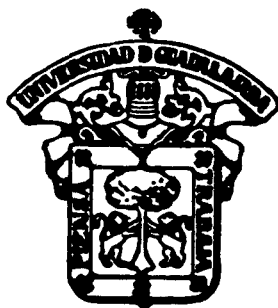


1 9 8 6

079612928

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN RATONES
CON LINFOMA MURINO L-5178-Y

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
ALICIA DEL TORO ARREOLA
GUADALAJARA, JALISCO. 1988

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE
HUMORAL EN RATONES CON LINFOMA
MURINO L-5178-Y

AUTOR DE TESIS:
Alicia del Toro Arreola

DIRECTOR DE TESIS:
DR. Adrian Daneri Navarro

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mis Padres, gracias por tantos años de sacrificio y trabajo. Y porque siempre unidos han guiado mis pasos y hecho de mi lo que ahora soy.

De manera muy especial a tí J. Pablo por la forma en que supiste ayudarme.

Por su valiosa asesoría, mi gratitud al Dr. Adrián - Daneri por su ayuda y consejos durante una gran parte de mi formación profesional.

I N D I C E

	PAG.
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
4. HIPOTESIS.....	8
5. OBJETIVOS.....	9
6. MATERIAL Y METODOS.....	10
7. RESULTADOS.....	17
8. DISCUSION.....	27
9. BIBLIOGRAFIA.....	30

1.- INTRODUCCION.

La Inmunología del cáncer se basa en la expresión de antígenos tumorales, que permiten al sistema inmune distinguir las células malignas de las normales (1,2).

En modelos experimentales, se ha demostrado la capacidad del Sistema Inmune para destruir a las células cancerosas. Los sistemas efectores contra los tumores, se dividen en específicos como el mediado por linfocitos (3,4,5,6,7,8), anticuerpos a través de la activación del sistema del complemento o células citotóxicas dependientes de anticuerpos (9,10,11,12) y los inespecíficos, representados por los linfocitos asesinos-naturales (13,14,15,16,17,18,19) y macrófagos (20,21,22,23,24, 25,26).

Sin embargo, se ha descrito que las células tumorales utilizan diversos mecanismos de evasión inmunológica, como la selección de variantes menos inmunogénicas, modulación antigénica, factores bloqueadores y linfocitos supresores entre otros (27,28,29,30,31,32).

En un trabajo previo realizado en el Instituto de Patología Infecciosa y Experimental de nuestra Universidad, se identificó un factor soluble con actividad supresora de la Respuesta Inmune Celular en el sobrenadante del líquido de ascitis de ratones inoculados con células de linfoma murino L-5178-Y.

El propósito de este trabajo fue demostrar la presencia de -- factores solubles supresores de la Respuesta Inmune Humoral - Primaria en el mismo modelo de ratones con Linfoma Murino - - L-5178-Y, determinar su peso molecular y su efecto en el número y distribución de las poblaciones celulares del bazo.

2. ANTECEDENTES.

El Sistema Inmune se divide en dos compartimentos funcionales, el primero es el Sistema Inmune Innato y el segundo el Sistema Inmune Adaptativo.

El primero actúa como una primera línea de defensa contra diferentes agentes principalmente infecciosos, y está compuesto por las barreras físicas y defensas bioquímicas del organismo, fagocitos, células asesinas naturales, sus mediadoras y el resto de células y moléculas que participan en la Respuesta Inflamatoria. El segundo está mediado por los linfocitos T a través de la producción de linfocinas que ejercen su actividad afectando a otras células del Sistema Inmune (Respuesta Inmune Celular) y por los linfocitos B que son los mediadores de la Respuesta Inmune Humoral por medio de la producción de anticuerpos específicos (33).

Cuando entra en contacto un individuo por primera vez con un antígeno se observa un período de latencia que dura varios días durante los cuales no se detectan anticuerpos en el suero ni células que los produzcan en los tejidos linfoides, y el tipo de anticuerpo que enseguida se produce es predominantemente de la clase IgM (Respuesta Inmune Humoral Primaria). En el siguiente contacto con el mismo antígeno la respuesta es más rápida e intensa y predominan anticuerpos de la clase IgG (Respuesta Inmune Humoral Secundaria).

2.1 CONCEPTO DE INMUNOLOGIA TUMORAL.

La Inmunología del Cáncer estudia las propiedades antigénicas de las células malignas, la respuesta inmune del huésped contra estas células, los efectos inmunológicos causados por el crecimiento tumoral y las estrategias de modulación del Sistema Inmune para el reconocimiento y erradicación de las células tumorales (34).

2.2 HISTORIA DE LA INMUNOLOGIA TUMORAL.

El concepto de que las células tumorales exhiben antígenos que no expresan las normales, condujo desde 1880 al uso de inmunoterapia pasiva mediante sueros preparados contra los tumores y a finales del mismo siglo a los primeros intentos de vacunación con células del tumor autólogo. En 1900 Ehrlich propuso que el huésped tiene la capacidad de reconocer y destruir a las células malignas (35). En 1959, Lewis Thomas sugirió que el fenómeno de rechazo de los alotransplantes, es un prototipo del mecanismo de defensa natural contra los tumores (36). En base a las ideas de Ehrlich y Thomas, Burnet propuso la Teoría de la Vigilancia Inmunológica que establece la existencia de un mecanismo de homeostasis en los mamíferos, que previene la transformación o proliferación de las células malignas (37,38).

El desarrollo de la Inmunología Experimental de los tumores, se retrasó durante la primera mitad de este siglo, -

principalmente por el desconocimiento de la naturaleza de los antígenos tumorales, de las bases del rechazo de los alotransplantes y de la inexistencia de cepas de animales singénicos.

En 1957 Prehn y Main, demostraron el desarrollo de una -- Respuesta Inmune Específica antitumoral, en un modelo de ratones con sarcoma inducido con metilcolantreno (39,40)- y a partir de entonces se inicia la era moderna de la Inmunología del Cáncer.

2.3 MECANISMOS EFECTORES DEL SISTEMA INMUNE CONTRA LOS TUMORES.

Se han descrito diferentes componentes del Sistema Inmune que han mostrado una mayor o menor capacidad de contri--- buir a la erradicación de las células tumorales. Los sistemas efectores específicos son más importantes contra -- los tumores inmunogénicos, mientras que los inespecíficos son relevantes y los menos inmunogénicos (41,42).

Dentro de los específicos el mediado por los linfocitos - derivados del timo (Linfocitos T) es el más importante y - se efectúa a través de las subpoblaciones de inductores--- cooperadores y citotóxicos-supresores (43,44,45,46,47), - así mismo se han descrito otros mecanismos específicos co mo Citotoxicidad mediada por anticuerpos y Citotoxicidad- por activación del Sistema del Complemento (48,26,9,10,11, 12).

De los Sistemas Inespecíficos de defensa, los linfocitos-

asesinos naturales (49,50) y los macrófagos son los más importantes (51).

2.4 MECANISMOS DE EVASION INMUNOLOGICA.

Se han reportado diversos mecanismos que utilizan las células tumorales para evadir al Sistema Inmune como la selección de las variantes menos inmunogénicas, modulación antigénica, factores bloqueadores y aumento de células supresoras.

En el plasma de pacientes con diferentes neoplasias, se han detectado factores con actividad inmunosupresora (52). En modelos de ratones con tumor se ha informado la presencia de factores solubles que deprimen la Respuesta Inmune Humoral (53,54,55,56,57,58) ó Célular (53,55,59,60). El estudio de estos factores ha conducido a la identificación de prostaglandinas (61), complejos inmunes (62) y otros factores todavía no caracterizados adecuadamente (60,63,64,65,66,67,68,69,70).

En un trabajo previo realizado en este Laboratorio, se identificó un factor soluble con actividad supresora de la Respuesta Inmune Célular en el sobrenadante del líquido de ascitis de ratones inoculados con células de linfoma murino L-5178-Y.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los mecanismos mediante los cuales los tumores evaden la destrucción inmunológica permanecen sin comprenderse en su totalidad. En ratones Balb-c inoculados con células de Linfoma - Murino L-5178-Y, encontramos una proteína con actividad supresora de la Respuesta Inmune Celular, pero se desconoce si esta proteína u otros factores solubles deprimen la Respuesta Inmune Humoral en ratones con Linfoma Murino L-5178-Y.

4. HIPOTESIS.

Los ratones Balb-c portadores de Linfoma Murino L-5178-Y, --
contienen factores solubles con actividad supresora de la --
Respuesta Inmune Humoral.

5. OBJETIVOS.

- 5.1 Demostrar la presencia de factores solubles con actividad supresora de la Respuesta Inmune Humoral.
- 5.2 Determinar su Peso Molecular.
- 5.3 Investigar si son producidos por el tumor o por células - del huésped.
- 5.4 Estudiar su efecto en el número y distribución de las poblaciones celulares del bazo.

6. MATERIAL Y METODOS.

RATONES. Se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb-c y machos atímicos homocigotos del gen nu/nu, de 23 a 25 grs y - 3 meses de edad, alojados en grupos de 10 y 4 respectivamente, en jaulas de polipropileno con camas de aserrín estéril en -- habitaciones con ciclos de luz-obscuridad de 12 horas y area- de esterilidad (ratones nu/nu). Se les proporcionó alimento - comercial para roedores (Purina, México) y agua purificada pa- ra consumo voluntario.

LINEA TUMORAL. Linfoma Murino L-5178-Y, de origen tímico, - mantenido por trasplante semanal en ratones Balb-c inocula- dos por vía intraperitoneal con 5×10^6 células de este tumor.

MEDIO DE CULTIVO. Se empleó el medio RPMI-1640 (Gibco La- boratories, Grand Island Biological Co.), suplementado con -- 10 mM de hepes, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-Glutamina, 5×10^{-5} M de 2-mercapto- etanol y albúmina sérica bovina al 0.3%.

ANTIGENO. Eritrocitos de carnero preservados en solución de Alsever por no más de un mes y lavados 3 veces con NaCl 0.15M antes de usarlos.

ANTICUERPOS. Anticuerpos Monoclonales Anti-Thy-1.2, Anti- Lyt-1.2, Anti-Lyt-2.2 (Cederlane Laboratories Limited), Anti-

cuerpo de cabra Anti inmunoglobulina de ratón (IgG₁, IgG_{2a}, IgG₃, IgM) marcados con isotiocianato de fluoresceína (Gamm-Fitc) a una proporción molar p/p=3.0-4.5 (Coulter Clone).

PROTEINAS MARCADORAS DE PESO MOLECULAR. Albúmina bovina sérica (PM 66,000 d), Pepsina (PM 34,000 d), Fosforilasa B (PM 97,000 d) y Citocromo C (PM 12,400 d), (Sigma Chemical Company, St. Louis).

6.1 DEMOSTRACION DE FACTORES SOLUBLES SUPRESORES DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN EL LIQUIDO DE ASCITIS DE RATONES CON LINFOMA.

6.1.1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA EN RATONES CON LINFOMA MURINO L-5178-Y.

Se emplearon 10 ratones Balb-c inoculados por vía intraperitoneal con 5×10^6 células de linfoma murino L-5178-Y, y al quinto día se inmunizaron con 0.5 ml de eritrocitos de carnero al 10% por vía intraperitoneal, misma dosis que recibieron los ratones testigos. Ambos grupos de ratones fueron sacrificados 5 días después de la inmunización para obtener su bazo y cuantificar en este órgano el número de células formadoras de anticuerpos (CFA) contra eritrocitos de carnero, de acuerdo al método de Cunningham (71) para lo cual se homogenizaron cada uno de los bazos en 5 ml de buffer Hepes adicionado de suero fetal de ternera 0.3 ml de ésta suspensión celular más un volumen igual de eritrocitos de carnero al 2.5% y suero fresco de cobayo (como fuente de complemento) al 12% en la misma solución de Hepes. Las células formadoras de anticuerpos se revelaron por el número de placas de hemólisis en cámaras de vidrio (previamente preparadas con dos portaobjetos y cinta de doble pegamento) llenadas con 0.8 ml de la mezcla anterior y selladas con cera-vaselina al 50%. La lectura de las placas de hemólisis se realizaron después de incubar --

las cámaras a 37°C durante 60 minutos, y se correlacionaron con el número total de esplenocitos (contados previamente en una cámara cuenta glóbulos).

(Cada placa de hemólisis representa a un linfocito B -- que libera anticuerpos antieritrocitos que se difunden y combinan con los eritrocitos, produciéndose lisis mediante la fijación del sistema de complemento.)

6.1.2 DEMOSTRACION DE FACTORES SOLUBLES SUPRESORES DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA, EN EL LIQUIDO DE ASCITIS DE RATONES CON LINFOMA.

El líquido de ascitis se obtuvo de la cavidad peritoneal de ratones Balb-c inoculados diez días antes con 5×10^6 células L-5178-Y, y se eliminaron sus células mediante tres centrifugaciones a 8000XG durante 20 minutos a 4°C. Un grupo de diez ratones Balb-c, fueron tratados con 0.5 ml de este sobrenadante (19 mgs de proteína) por vía intraperitoneal, cada 24 horas desde un día antes de la inmunización con eritrocitos de carnero -- (mismo esquema de inmunización). Otro grupo de diez ratones recibió el mismo volumen de NaCl 0.15M por la misma vía y cada 24 horas, también desde un día antes de la inmunización con eritrocitos de carnero. Ambos grupos de ratones se sacrificaron al quinto día de la inmunización para cuantificar sus C.F.A.

6.2 DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LOS FACTORES SOLUBLES SUPRESORES DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA.

El sobrenadante del líquido de ascitis de ratones con linfoma se fraccionó en columnas con diámetro interior de 2.5 cm y 75 cm de altura (farmacia fine chemicals-Upsala Sweeden), empaquetadas con sephadex G-100.

En cada separación se aplicaron 2.5 ml del líquido y se eluyeron en buffer de fosfatos pH=7.2 a 4°C (a una presión y flujo constante de 6 ml por hora) y se colectaron en tubos de 3 ml (colector de fracciones Ultrorac 7000) que se monitorearon con un espectrofotómetro (Carl Zeiss-PMQIII) a 280 nm. Inmediatamente después de la muestra se estimó el peso molecular de las fracciones obtenidas mediante la calibración con las siguientes proteínas marcadoras de peso molecular: Albúmina Bovina Sérica con un PM de 66,000 daltons, Pepsina con un PM de 34,000 daltons, Fosforilasa B con un PM de 97,000 daltons y Citocromo-C con un PM de 12,400 daltons. De acuerdo al cromatograma se formaron tres fracciones (cada una constituida por la unión del volumen de diez tubos aproximadamente), que se dializaron en membranas de diálisis y posteriormente fueron liofilizadas.

Grupos de 4 ratones Balb-c fueron tratados desde un día antes de la inmunización (con eritrocitos de carnero) con un volumen de 0.5 ml de las diferentes fracciones reconstituidas con solución salina y aplicadas por vía intraperitoneal cada 24 horas. El quinto día de la inmunización se sacrificaron para cuantificar en el bazo el número de

C.F.A.

6.3 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN RATONES BALB-C-
TRASFERIDOS PASIVAMENTE CON EL SOBRENADANTE DE LIQUIDO -
DE ASCITIS DE RATONES ATIMICOS INOCULADOS CON CELULAS DE
LINFOMA MURINO L-5178-Y.

Se inocularon cinco ratones de la cepa nu/nu del mismo --
haplotipo de los Balb-c (H-2/^{dd}) con 5×10^6 células de lin-
foma murino L-5178-Y y a los diez días se sacrificaron pa-
ra obtener el sobrenadante del líquido de ascitis median-
te el método descrito anteriormente. A un grupo de 4 rato-
nes de la cepa Balb-c se les aplicó 0.5 ml de este sobre-
nadante por vía intraperitoneal cada 24 horas (estos rato-
nes se inmunizaron al siguiente día de iniciar el trata-
miento) y al quinto día de la inmunización se sacrifica-
ron para cuantificar en el bazo el número de C.F.A.

6.4 MARCADORES FENOTIPICOS DE LAS POBLACIONES CELULARES DEL -
BAZO DE RATONES TRANSFERIDOS CON EL SOBRENADANTE DEL LI--
QUIDO DE ASCITIS DE RATONES CON LINFOMA.

6.4.1. SEPARACION CELULAR.

A partir de los bazos de los grupos de ratones con lin-
foma murino L-5178-Y, tratados con el sobrenadante de -
líquido de ascitis y testigos, se separaron las células
mononucleares en una solución de ficoll-angioconray a -
una densidad de 1.087 mediante centrifugación a 800XG -
durante 25 minutos a 4°C, (la capa de células mononu---

cleares se localiza en la interfase entre el plasma y - la solución de ficoll).

6.4.2 INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA.

Una vez separadas las células se lavaron tres veces en solución balanceada de fosfatos (PBS) a pH=7.2 se ajustaron las células mononucleares a 1×10^6 y se incubaron con uno de los siguientes anticuerpos: Anti-Thy-1.2, - Anti-Lyt-1.2, Anti-Lyt-2.2 y Gamm - Fitc (que reconocen respectivamente a linfocitos T, subpoblaciones de inductores-cooperadores, citotóxicos-supresores y linfocitos B) durante 30 minutos a 4°C. Después de lavadas se incubaron con un segundo anticuerpos Gamm - Fitc, (excepto la pruebas para linfocitos B) durante 30 minutos a 4°C y posteriormente se lavaron nuevamente en tres ocasiones y se observaron en el microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss D-7082 Ober Kochen) donde se contaron 200 - células para determinar el porcentaje de células fluorescentes y de éste se restó el porcentaje de células - Gamm-Fitc positivas (de linfocitos B) y finalmente se calculó el número total por bazo.

6.4.3 TINCION DE ESTERASA INESPECIFICA.

Se tiñeron la capa de células mononucleares con el método de Koski (72) que consistió en preparar frotis delgados fijados en una solución de formaldehído acetona e incubados con alfa-naftil acetato en Buffer de Sorenson durante 45 minutos a 37°C y contrastados con verde de metilo al 0.5%.

7. RESULTADOS.

7.1 DEMOSTRACION DE FACTORES SOLUBLES SUPRESORES DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA, EN EL LIQUIDO DE ASCITIS DE RATONES CON LINFOMA.

7.1.1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA EN RATONES CON LINFOMA MURINO L-5178-Y.

Los ratones Balb-c inoculados con 5×10^6 células de Linfoma Murino L-5178-Y mostraron una profunda supresión de la Respuesta Inmune Humoral primaria, indicada por la disminución del número de células formadoras de anticuerpos por bazo comparada con la respuesta de los ratones testigos (Cuadro 1).

7.1.2 DEMOSTRACION DE FACTORES SOLUBLES SUPRESORES DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA, EN EL SOBRENADANTE DEL LIQUIDO DE ASCITIS DE RATONES CON ESTE LINFOMA.

En el grupo de ratones que fueron transferidos pasivamente con el sobrenadante del líquido de ascitis se observó una disminución del número de células formadoras de anticuerpos por bazo altamente significativa en comparación al grupo de ratones tratados con NaCl 0.15M (Testigos) (Cuadro 1).

7.2 DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LOS FACTORES SOLUBLES SUPRESORES DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA.

Al separar el sobrenadante del líquido de ascitis en Sephadex G-100 se obtuvieron 3 fracciones (de acuerdo al moni-

toreo espectrofotométrico) que se transfirieron por vía intraperitoneal de acuerdo al esquema que describimos en material y métodos, y el grupo de ratones que fueron tratados con la Fracción III mostró una disminución significativa en el número de células formadoras de anticuerpos por bazo en comparación a los grupos de ratones que recibieron la Fracción I, la Fracción II ó NaCl 0.15M (Cuadro 2).

Con la finalidad de determinar de manera más precisa el factor soluble inmunosupresor contenido en la Fracción III se dividió ésta en 4 Subfracciones (de acuerdo al monitoreo espectrofotométrico) que se transfirieron a ratones Balb-c normales. Se encontró que los ratones que recibieron la Subfracción IV mostraron una supresión significativa del número de células formadoras de anticuerpos por bazo en comparación a los ratones tratados con las demás subfracciones que se comportaron de manera similar al grupo testigo (Cuadro 3). El Peso Molecular del factor soluble inmunosupresor contenido en la subfracción IV se estimó de 30,000 a 60,000 daltons de acuerdo a la curva obtenida con las proteínas marcadoras que se filtraron inmediatamente después de elusión completa de la muestra del Líquido de Ascitis.

7.3 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA EN RATONES BALB-C TRASFERIDOS PASIVAMENTE CON EL SOBRENADANTE DEL LIQUIDO DE ASCITIS DE RATONES ATIMICOS INOCULADOS CON

CELULAS DE LINFOMA MURINO L-5178-Y (HOMOCIGOTOS PARA EL - GEN nu/nu).

El grupo de ratones Balb-c transferidos pasivamente con - el sobrenadante del líquido de ascitis de ratones atími--cos nu/nu, previamente inoculados con células de Linfoma-Murino L-5178-Y no mostró ninguna diferencia significati--va en el número de células formadoras de anticuerpos por-bazo en relación al grupo de ratones testigos (Cuadro 4).

7.4 MARCADORES FENOTIPICOS DE LAS POBLACIONES CELULARES DEL - BAZO DE RATONES TRASFERIDOS CON EL SOBRENADANTE DEL LIQUIDO DE ASCITIS DE RATONES CON LINFOMA.

En los bazo del grupo de ratones inoculados con células--de Linfoma Murino L-5178-Y se encontró una disminución -- significativa de la población de linfocitos Lyt 1.2 posi--tivos (inductores-cooperadores) y un aumento importante - de los macrófagos en comparación a los ratones normales. En los ratones tratados con líquido de ascitis también -- se observó una disminución similar en los Lyt 1.2 y un au--mento en el número de macrófagos esplénicos (fig.2) |.

CUADRO No. 1

SUPRESION DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA EN RATONES BALB-C INOCULADOS CON CELULAS DE LINFOMA MURINO L-5178-Y O TRATADOS CON EL SOBRENADANTE DEL LIQUIDO DE ASCITIS DE RATONES CON ESTE TUMOR.

GRUPO	INOCULACION O TRATAMIENTO	\bar{X} C.F.A./BAZO (+ s)
1	Solución de Hanks 0.5 ml	51,403 \pm 12,575
2	Células de Linfoma Murino L-5178-Y *	8,344 \pm 6,528
3	Sobrenadante de Líquido - de Ascitis. **	23,081 \pm 14,103

Comparación mediante la Prueba T de Student

1 vs 2 y 3 $p < 0.001$

2 vs 3 $p < 0.05$

Grupo 1,2,3 comprende 10, 6 y 8 ratones respectivamente.

Todos los ratones se inmunizaron con 0.5 ml de Eritrocitos de Carnero al 10% - (el día 0), al día número 5 se obtuvieron los bazo para cuantificar el número de C.F.A. por bazo.

* Se inocularon con 5×10^6 células de Linfoma por vía intraperitoneal 5 días antes de la inmunización.

** Se obtuvo mediante la centrifugación (8,000XG), del líquido de Ascitis de ratones con este -- Linfoma. El tratamiento consistió en inyectar 0.5 ml (19 mg de Proteínas), de este sobrenadante, por vía intraperitoneal, cada 24 horas, desde un día antes hasta el final del experimento.

CUADRO No. 2

RESULTADOS DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA DE RATONES BALB-C TRATADOS-
CON LAS DIFERENTES FRACCIONES CROMATOGRÁFICAS OBTENIDAS DEL LIQUIDO DE ASCITIS
DE RATONES CON LINFOMA MURINO L-5178-Y.

GRUPO	TRATAMIENTO	\bar{X} C.F.A./BAZO (+ S)
1	NaCl 0.15 M	80,638 ± 20,097
2	Fracción I *	84,120 ± 12,642
3	Fracción II *	70,222 ± 7,533
4	Fracción III*	33,955 ± 8,969

Comparación mediante la Prueba T de Student.

1 vs 2 N.S.

1 vs 3 N.S.

1 vs 4 $p < 0.01$.

Los grupos 1,2,3 y 4 comprenden 5,3,6 y 5 ratones respectivamente.

Todos los ratones se inmunizaron con 0.5 ml de Eritrocitos de Carnero al 10% - (el día 0), y al quinto día se obtuvieron los bazo para cuantificar el número de C.F.A. por bazo.

* Cada ratón fué inoculado con 0.25 ml de la fracción indicada en el cuadro, cada 24 horas, -- por vía intraperitoneal, desde un día antes de la inmunización. Las fracciones se obtuvieron mediante Cromatografía en Sephadex G-100, a partir de 2.5 ml de Sobrenadante de Líquido de Ascitis (95 mg de Proteína).

CUADRO No. 3

RESULTADOS DE LA RESPUESTA INMUNE HOMORAL PRIMARIA DE RATONES BALB-C TRATADOS-
CON LAS SUBFRACCIONES CROMATOGRÁFICAS (DE LA FRACCIÓN III) DEL LIQUIDO DE - --
ASCITIS DE RATONES CON LINFOMA MURINO L-5178-Y.

GRUPO	TRATAMIENTO	\bar{X} C.F.A./BAZO (+ S)
1	NaCl 0.15 M	55,228 + 13,580
2	Subfracción I *	56,419 + 2,688
3	Subfracción II *	81,546 + 20,333
4	Subfracción III *	71,209 + 14,199
5	Subfracción IV *	15,586 + 5,219

Comparación mediante la Prueba T de Student:

1 vs 2 N.S.

1 vs 3 N.S.

1 vs 4 N.S.

1 vs 5 $p < 0.02$

Los Grupos 1 y 4 comprenden 2 ratones.

Los Grupos 2, 3 y 5 comprenden 3 ratones.

Todos los ratones se inmunizaron con 0.5 ml de Eritrocitos de Carnero al 10% -
(el día 0), y al quinto día se obtuvieron los bazos para cuantificar el número
de C.F.A. por bazo.

*El tratamiento consistió en aplicar 0.25 ml de las Subfracciones indicadas, por vía intrape-
ritoneal, cada 24 horas, desde un día antes de la inmunización.

CUADRO No. 4

RESULTADOS DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA DE RATONES BALB-C TRATADOS-
CON SOBRENADANTE DE LIQUIDO DE ASCITIS DE RATONES ATIMICOS (NU/NU) CON LINFOMA
MURINO L-5178-Y.

GRUPO	TRATAMIENTO	\bar{X} C.F.A./BAZO (+ S)
1	Na Cl 0.15 M	54,995 \pm 1,590
2	Sobrenadante de Lf * quido de Ascitis - de Ratones nu/nu.	66,933 \pm 8,322

Comparación mediante la Prueba T de Student:

1 vs 2 N.S.

Los grupos 1 y 2 comprenden 3 y 4 ratones respectivamente.

Los ratones fueron inmunizados con 0.5 ml de Eritrocitos de Carnero al 10% --
(el día 0) y al quinto día se obtuvieron los bazos para cuantificar el número
de C.F.A. por bazo.

*Se obtuvo mediante la centrifugación (8,000XG), del líquido de Ascitis de ratones atimicos -
inoculados con este linfoma. El tratamiento consistió en inyectar 0.5 ml (19 mg de Proteínas),
de este sobrenadante, por vía intraperitoneal, cada 24 horas, desde un día antes hasta el fi-
nal del experimento.

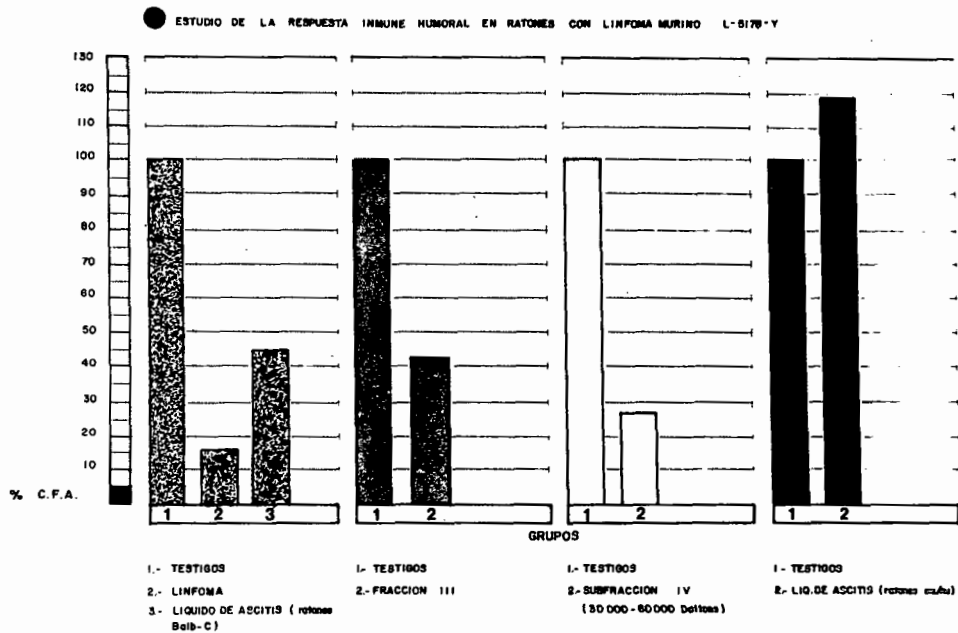
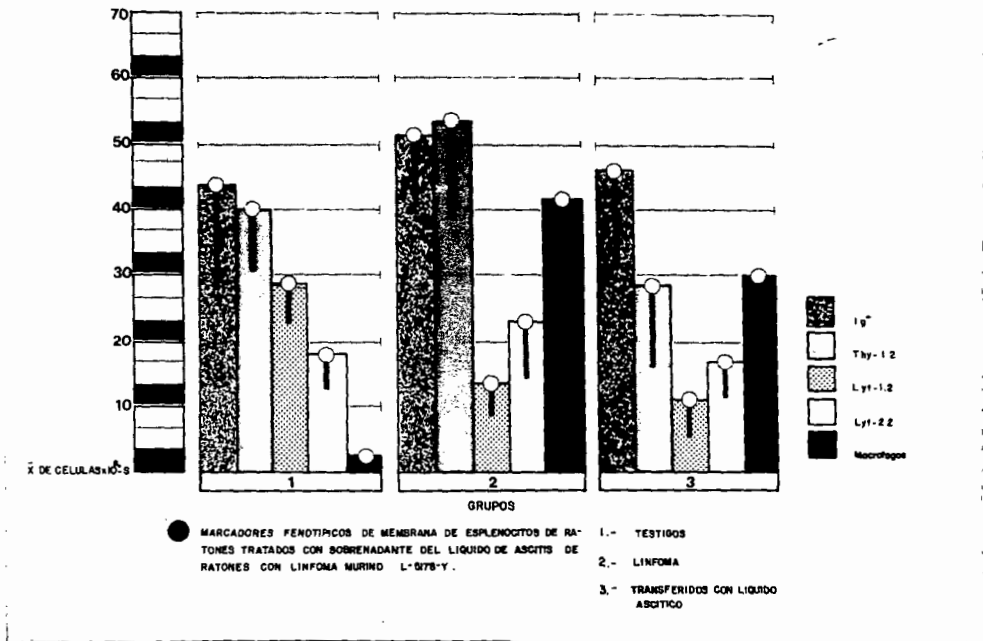


FIG. 2.

- Grupo 1 Comprende 3 ratones Balb-c normales.
- Grupo 2 Comprende 4 ratones Balb-c tratados con sobrenadante del líquido de ascitis de ratones con linfoma, 0.5 ml (19 mg de proteínas) cada 24 horas por vía intraperitoneal durante 6 días.
- Grupo 3 Comprende 3 ratones Balb-c con Linfoma murino L-5178-Y



8. DISCUSION

La prevención y erradicación de las neoplasias malignas que afectan a los humanos, son el objetivo final de los estudios básicos y aplicados del cáncer (73). Debido a la complejidad de la interacción de los tumores con el huésped y para superar dificultades éticas y técnicas, algunos aspectos del cáncer se investigan en modelos animales, a nivel celular y molecular (74).

No se han identificado diferencias entre las células tumorales y normales, que se hayan explotado como tratamiento del cáncer de una manera efectiva y sin dañar a los tejidos normales. La quimioterapia es útil en el manejo de algunas neoplasias malignas, debido a que una proporción importante de sus células están en proliferación, mientras que la fracción de células en crecimiento del tejido de origen es menor.

La Inmunología del Cáncer se basa en la expresión de antígenos en las células tumorales que le permiten al sistema inmune discriminarlas de las normales. Esta diferencia ofrece la posibilidad de modificar o manipular las potencialidades inmunológicas contra el cáncer, sin dañar los tejidos sanos. Sin embargo, uno de los principales problemas es la desproporción de la carga tumoral y una insuficiente respuesta inmune (1,2). Esta deficiente actividad se debe a la débil inmunogenicidad o a mecanismos de evasión inmunológica que utilizan las células malignas como la constante liberación de antígenos al me-

dio extracelular, modulación antigénica, enmascaramiento de antígenos, inexpressión de moléculas de histocompatibilidad, pero sobre todo la supresión antígeno-específica de la respuesta inmune (linfocitos supresores) (5,27,28,29,30,31,32,75).

Se ha reportado en la literatura mecanismos de supresión inespecífica, mediados por linfocitos T supresores, macrófagos, prostaglandinas y otras moléculas que dependiendo del modelo en estudio varían en peso molecular y características físico-químicas (59,60,76,66).

En el presente trabajo demostramos una profunda supresión de la Respuesta Inmune Humoral Primaria en ratones inoculados con --- células de Linfoma Murino L-5178-Y, esta supresión se transfiere a ratones normales tratados con el sobrenadante del líquido de ascitis de ratones con linfoma. La inmunosupresión observada en los animales con tumor probablemente es multifactorial -- como se ha informado en otros modelos (78). Lo anterior lo apoyamos por la menor supresión causada por la fracción soluble -- del líquido de ascitis.

El factor responsable de la supresión tiene un peso molecular - de 30,000 a 60,000 daltons y es producido o afectado en su generación o actividad por los linfocitos de origen tímico.

En nuestro modelo experimental de ratones con linfoma, encontramos en el bazo un número elevado de macrófagos y una disminu--- ción de los linfocitos inductores/cooperadores. Estas alteraciones las observamos también en los ratones transferidos con el -

líquido de ascitis de animales con este tumor, lo cual sugiere que estas modificaciones son inducidas por el factor o factores contenidos en este líquido.

Es importante señalar que no encontramos en los ratones con linfoma ni en los transferidos con su líquido, un cambio importante en la población de linfocitos supresores, que no excluye la posibilidad de que las clonas supresoras específicas contra los antígenos tumorales estén aumentadas. Tampoco podemos descartar que las prostaglandinas participen en la inmunosupresión, ya que no medimos sus niveles. Es probable que se encuentren elevadas, debido a que generalmente son producidas por los macrófagos.

No podemos afirmar si el factor inmunosupresor es producido por las células tumorales o es producto de células reguladoras del sistema inmune (macrófagos o linfocitos supresores). Tampoco conocemos su mecanismo de acción ni las células que afecta. Para resolver estas interrogantes la siguiente etapa de este trabajo se va a efectuar in vitro, en cultivo de linfocitos de ratones Balb-c y nu/nu adicionados del factor supresor y de productos liberados del cultivo de células L-5178-Y.

9. BIBLIOGRAFIA.

1. Old, L.J.: Cancer Immunology: The search for specificity.-
Cancer Res., 1981; 41:361-375.
2. Hellstrom, I.; Hellstrom, K.E.: Cell-mediated reactivity -
to human tumor - type associated antigens: Does it exist?.
J. Biol. Res. Mod., 1983; 2:310-320.
3. Wagner, H.; Pfizenmaier, K.; Rollinghoff, M.: The role of-
the major histocompatibility gene complex in murine cito--
toxic T cell responses. Cancer Res., 1980; 31:72-123.
4. Henney, C.S.; Gillis, S.: Cell-mediated cytotoxicity. In -
Paul We (ed): Fundamental Immunology. New York, Raven - --
Press, 1984, pp. 669-684.
5. Schatten, S.; Ganstein, R.D.; Drebin, J.A.; (eds): Suppres-
sor T cells an the immune response to tumors. Boca Raton -
CRC Press (in press).
6. Greenberg, P.D.; Cheveer, M.A.; Fefer, A.: Theraphy of es-
tablished tumors by adoptive transfer of T lymphocytes. In
Herberman R.B (ed): Basic and Clinical Tumor Immunology.-
Boston, Martinus Nijhoff Publishers, 1983; pp. 301-335.
7. Rosenberg, S.A.: Adoptive immunotherapy of cancer: Accom-
plishments and prospects Cancer Treat Rep., 1984; 68:233-
255....
8. Rosentein, M.; Eberlein, T.J.; Rosenberg, S.A.: Adoptive -
immunotherapy of established syngeneic solid tumors::Role-
of T lymphoid subpopulations. J. Immunol., 1984; 134: 2117
-2118.
9. Schulz, G.; Bumol, T.F.; Reisfeld, R.A.: Monocolonal anti-
body-directed effector cells sclectively lyse human mela-
noma cells in vitro and in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. --
USA, 1983; 80:5407-5411.
10. Kohher, P.F.: Human complement system. In Samter M (ed): -
Immunologic Diseases. Boston, Little, Brown and Co., 1979;
pp. 244-280.
11. Sandberg, A.L.: Complement in Oppenheim. Un J. Rosenstheich
A.L., Potter M. (eds): Cellular Functions in Immunology on
Inflammation. New York, Elsevier/North Holland, 1981; pp.-
373.

12. Ohanian, S.H.; Schlager, S.I.: Humoral immune Killing of nucleated cells: Mechanisms of complement dependent attack and target defense. *CRC Crit Rev. Immunol.*, 1981; 1:165-209.
13. Herberman, R.B.; Ortaldo, J.R.: Natural Killer cells: - Their role in defenses against disease. *Science*, 1981; 214: 24.
14. Abo, T.; Balch, C.M.: A differentiation antigen of human - NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J. Immunol.*, 1981; 127:1024-1029.
15. Lanier, L.L.; Le, A.M.; Phillips, J.H.; (eds): Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-1 and Leu-II antigens. *J. Immunol.*, 1983; 131: 1789-1796.
16. Griffin, J.D.; Hereend, T.; Beveridge, R.: (eds): Characterization of an antigen expressed by human natural ki---ller cells. *J. Immunol.*, 1983; 130:2947-2951.
17. Uchida, A.; Mickshe, M.: Lysis of fresh human tumor - -- cells by autologous large granular lymphocytes from peripheral blood and pleural effusions. *Int. J. Cancer*, 1983; 32:37-44.
18. Beran, M.; Hansson, M.; Kiessling, R.: Human natural ki--ller cells can inhibit clonagenic growth of fresh leuke--mia cells. *Blood*, 1983; 61: 596-599.
19. Herberman, R.B.; Santoni, A.: Regulation of natural ki---ller cell activity. In Mihich E. (ed): *Biological Responses in cancer: Progress Toward Potential Applications II*. New York, 1984; pp. 121-144.
20. Fogler, W.E.; Fidler, I.J.: Role of macrophages in host - resistance against tumors. In Herberman, R.B. (ed): *Basic and Clinical Tumor Immunology*. Boston, Martinus Nijhoff Publishers, 1983; pp. 83-106.
21. Hibbs, J.B. Jr.: Macrophage nonimmunologic recognition: - Target cell factors related to contact inhibition. *Science*, 1976; 180:868-870.

22. Meltzer, M.S.; Tucker, R.W.; Sanford, K.K.; (eds): Interaction of BCG activated macrophages with neoplastic and nonneoplastic cell lines in vitro: Quantitation of the cytotoxic reaction by release of tritiated thymidine from prelabeled target cells. *J.N. C.I.*, 1975; 54:1177-1184.
23. Adams, D.O.; Lewis, J.G.; Johnson, W.J.: Multiple modes of cellular injury by macrophages: Requirement for different forms of effector activation. *Prog. Immunol.*, 1983, pp. 1009-1018.
24. Nathan, C.F.; Murray, H.W.; Wiebe, E.; (eds): Identification of interferon the lymphokine that activates human macrophages oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.*, 1983; 158:670-689.
25. Johnson, W.J.; Somers, S.D.; Adams, D.O.: Expression and development of macrophage activation for tumor cytotoxicity. *Contem. Topics. Immunobiol.*, 1984; 13:127-147.
26. Nathan, C.F.; Murray, W.W.; Cohn, Z.A.: The macrophage as an effector cell. *N. Engl. J. Med.*, 1980; 303:622.
27. Ritz, J.; Pesando, J.M.; Notis-Mc Conarty, J.; (eds): Modulation of human acute lymphoblastic leukemia antigen induced by monoclonal antibody in vitro. *J. Immunol.*, 1980; 125:1506-1514.
28. Old, L.S.; Stockert, E.; Boise, E.A.; Kim, J.H.: Antigenic Modulation loss of TL antigen from cells exposed to TL antibody. Study of the phenomenon in vitro. *J. Exp. Med.*, 1963; 127:523-539.
29. Ritz, J.; Pesando, J.M.; Natis-Mc Conarty, J.; (eds): A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen. *Nature*, 1980; 283:538-585.
30. Stutman, O.: Suppressor cells in tumor-host interactions. In Mihich, E. (ed): *Biological responses in cancer: Progress Toward Potential Applications I*. New York, Plenum Press, 1982; pp. 23-88.
31. Broder, S.; Waldmann, T.A.: The suppressor cell network in cancer. *N. Engl. J. Med.* 1978; 299:1281.
32. Hayes, C.E.; Klyezek, K.K.; Krum, D.P.; (eds): Chromosome 4 JT gene control murine T cell surface -1-J expression. *Science*, 1984; 223:559-563.

33. Roitt, I. J.; Brostoff, D.M.: Immunology. Gower Medical Publishing. London - New York; 1985.
34. Greenber, P.D.: Tumor Immunology. In Stites, D.P.; Stobo, J.D.; Wells, J.V.: Basic and clinical Immunology. Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut/Los Altos California.
35. Ehrlich, P.: On immunity with special reference to cell life. Proc. R. Soc. London. 1900; 66:424.
36. Terry, W.D.; Rosenberg, S.A. (eds): The National Lung -- Cancer Group. Surgical adjuvant immunotherapy in nonoat - cell carcinoma. Immunotherapy of Human Cancer, New York:- Elsevier, 1981.
37. Burnet, F.M.: Immunological factors in the process of carcinogenesis. Brit. Med. Bull., 1964; 20:154.
38. Burnet, F.: The concept of immunological surveillance. -- Prog. Exp. Tumor Res., 1970; 13:1.
39. Prehn, R.T.; Main, J.M.: Immunity to Methyl Cholanthrene-induced sarcomas. J. Natl. Cancer Inst., 1957; 18:769.
40. Prehn, R.T.: The relationship of immunology to carcinogenesis Ann. N.Y. Acad. Ser., 1969; 164:449.
41. North, R.J.: The murine antitumor immune response and its therapeutic manipulation. Adv. Immunol., 1984; 35:89.
42. Herberman, R.B.; (eds): Immunology reactivity of lymphoid cells in tumors contemp. Top. Immunobiol., 1980; 10:161.
43. Doherty, D.C.; Kowles, B.B., Wettstein, P.J.: Immunobiological surveillance of tumors in the contest of major histocompatibility restriction of T cell function. Adv. Cancer Res., 1984; 42:1.
44. Oppenheim, J.J.: Antigen Non-specific Lymphokines: an - - overview. Methods Immunol., 1985: 116:357.
45. Nedwin, G.E.; (eds): Human Lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: Structure, Homology and Chromosomal localization. Nucleic Acids Res., 1985: 13:6361-6373.
46. Ruddle. N.H.; Powell, M.B.; Conta, B.S.: Lymphotoxin a -- Biologically relevant model lymphokine. Lymphokine Res, - 1983; 2:23-31.

47. Brunner, K.T.; (eds): Cytolytic T Lymphocyte clones recognizing murine sarcoma virus-induced tumor antigens. pp. 297-310 in. Isolation, Characterization, and utilization of T Lymphocyte clones. Fathman C.G., Fitch F.W. (eds) -- academia press, 1982.
48. Muller; Eberhard, H.J.: The membrane attack complex springer semin. Immunopathol., 1984; 7:95.
49. Herberman, R.B.; (eds): NK cells and other natural effector cells. Acad. Press, Inc., New York, 1987; pp. 1566.
50. Herberman, R.; Reynolds, C.; Ortaldo, J.: Mechanism of -- cytotoxicity by natural killer (NK) cells. Annu. Rev. -- Immunol., 1986; 4:651.
51. Evans. R.: Macrophages in neoplasms: new insights and implication in tumor immunobiology. Cancer metastasis Rev., 1982, 1:227.
52. Bellanti, J.A.: Immunology. Edited by W.B. Saunders Company, Second Edition 1985.
53. Shiraishi, M.; Himeno, K.; Nomoto, K.: Restoration by -- levamisole of immune responses suppressed in tumor-bearing mice. Cancer Immunol. Immunother, 1983; 15(2): 111---115.
54. Okuda, S.; Taniguchi, K.; Kubo, C.; Nomoto, K.: Accessory cell function in tumor - bearing mice and effects of - -- corynebacterium parvum. J.N.C.L., 1982; Dec. 69(6):1293-7.
55. Lepore, P.; Favalli, C.; (eds): PGE restores the immune response in chemotherapy - treated, tumor bearing mice. - Life, Sci., 1982; 30(14):1219-23.
56. Havas, H.F.; Benney, S.; (eds): Effect of splenectomy on the immune response of Balb-c mice bearing an immunoglobulin M plasmacytoma (TEPC-183). Cancer Es., 1979; 39(9): 3783-7.
57. Anderson, S.A.; Isakson, P.C.: (eds): Immunosuppression - in a murine B cell leukemia (B CLI): role of on adherent-cell in the suppression of primary in vitro antibody responses. J. Immunol., 1981; 126(4):1603-7.
58. Kamo, I.; Patel, C.; (eds): Immunosuppression induced in - vitro by mastocytoma tumor cells and cell-free extracts.-

- J. Immunol., 1975; 114(6):1749-56.
59. Bluestone, J.A.; López, C.: Suppression of the immune response in tumor bearing mice. Induction of functionally suppressive antigen-driven macrophages. Cancer. Invest., -- 1983; 1(1): 5-13.
 60. Gautam, S-C.: Production of immunosuppressive factor(s) - by a weakly immunogenic fibrosarcoma T 241. Anticancer -- Res., 1983; 3(4): 263-8.
 61. Grinwich, K.D.; Plescia, D.J.; (eds): Tumor mediated immuno-suppression: prevention by inhibitors of prostaglandin synthesis. Prostaglandins. 1977; 14(6); 1175-82.
 62. Kilburn, D.G.; Fairhurst, M.; (eds): Synergism between -- immune complexes and serum from tumor-bearing mice in the suppression of mitogen responses. J. Immunol., 1976; 117: 1612-7.
 63. Takana, S.; Umenai, T.; (eds): Isolation of a factor from cancer ascitic fluid increasing susceptibility of mice to Listeria infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1983; 174 (1): 65-73.
 64. Kumar, R.K.; Lukke, A.Q.; (eds): Immunosuppression associated with SJL/J murine lymphoma II. Characterization of a plasma suppressor factor in tumor-bearing mice. J.N.C.I., 1981; 67(6):1277-82.
 65. Kumar, R?K.; Lukke, A.Q.; (eds): Immunosuppression associated with SJL/J murine lymphoma I. Suppression of cell-mediated immunoresponses after tumor transplantation J.N.C. I., 1981; 67(6): 1269-75.
 66. Katzman, J.A.: Myeloma induced immunosuppression: a multistep mechanism. J. Immunol., 1980; 121(4): 1405-5.
 67. Subramanian, C.; Yu, C.; (eds): Soluble suppressor factor from the spleens of tumor - bearing mice. Cancer Res., 1978;38(7); 1996-2002.
 68. Kamo, I.; Fredman, H.: Differential immunosuppressive effects of ascites fluid from mastocytoma bearing mice on primary vs secondary immunocyte responses. J. Immunol.,- 1978; 120(2):558-62.

69. Mc Master, R.; Buhler, K.; (eds): Immunosuppression of T. Lymphocyte function by fractinated serum from tumor-bearing mice. *J. Immunol.*, 1977; 118(1): 218-22.
70. Pikovski, M.A.; Ziffron, G.Y.; (eds): Suppression of - - immune response to sheep red blood cells in mice treated with preparations of a tumor cell component and in tumor bearing mice. *J. Immunol.*, 1976; 5(7): 447-50.
71. Cunningham, A.J.: A method of increased sensitivity for detecting single antibody forming cells. *Nature*, 1965; - 207:1106.
72. Koski, I.R.; Poplack, D.C.; Blabse, M.M.: A non specific esterase stain for the identification of monocytes and macropahges. In: *Methods in cell mediated and tumor immunity*. New York. Bloom, B.R. and David, J.R. (Eds), Acad. Press. 1976; pp. 359-362.
73. Campisi, J. ; Fingert, H.J.; Pardee, A.B.: Basic Biology- and Biochemistry of cancer. In Krapp, R.C.; Berkowitz, - R.S.; (eds): *Gynecologic, Oncology*, Chapter 2. New York, Macmillan, 1984.
74. De Vita, V.T.; Hellman, S; Rosenberg, S.A.: *Principles - and Practice of Oncology*. Ed. Lippincott, Second Edition; 1985.
75. Goodenow, R.S.; Vogel, J.M.; Linsk, R.L.: *Histocompatibili- ty Antigens on Murine Tumors*. *Science*, 1985; 230:777-- 783.
76. Yc, Q.W.; Moky, M.B.; Pyle, J.M. Dray, S.: Suppression- of antitumor immunity by macrophages in spleens of mice- bearing a large MOPC-315 Tumor. *Cancer Immunol.*; 1984, - 16(3):152-9.
77. Bonventre, P.F.; Nickol, A.D.; Ball, E.J.; Michael, J.G.: Development of protective immunity against bacterial and- viral infections in tumor-bearing mice coincidentr with -- suppression of tumor immunity. *J. Reticuloendothel., Soc.*; 1982, 32(1):25-35.

78. Jessup, J.M.; Kahan, B.C.; (eds): Mechanisms of immunosuppression in tumor bearing mice: a multifactorial analysis. *Cancer*, 1982; 49(6): 1158-67.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Número 480/87

Srita. Alicia del Toro Arreola
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN RATONES CON LINFOMA MURINO L-5178-Y" para obtener la Licenciatura en Biología con Orientación Biomédica.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido -- aceptado como Director de dicha tesis al Dr. Adrian Dane_ri Navarro.

Al contestar este oficio sírvase citar fecha y número



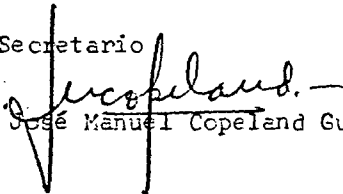
A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Mayo 9 de 1987

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario


Dr. José Manuel Copeland Gurdiel.

c.c.p. El Dr. Adrian Daneri Navarro, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Guadalajara, Jal., 3 de diciembre 1987.

C. DR. CARLOS ASTENGO OSUNA.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

P R E S E N T E :

Por medio de la presente hago CONSTAR que fue revisada y -
aprobada para su publicación la tesis titulada "ESTUDIO DE
LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN RATONES CON LINFOMA MURINO-
L-5178-Y", desarrollada por la C. Pasante de Biología - --
Alicia del Toro Arreola.

Se extiende la presente a petición de la interesada y para
los fines legales que a ella convengan el día tres de di--
ciembre de 1987.

A T E N T A M E N T E



DR. ADRIAN DANERI NAVARRO.
DIRECTOR DE TESIS.

C.c.p. C. Pasante de Biología Alicia del Toro Arreola.- Pte.-

ADN/btm.