

1985-I

REG. No. 077625216

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



EFFECTO PROTECTOR DE LA INMUNIZACION ESPECIFICA
CON STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y ALGUNAS DE SUS
FRACCIONES EN RATONES BALB/C.

MARIA DEL CARMEN BASULTO GARCIA

EFECTO PROTECTOR DE LA INMUNIZACION ESPECIFICA CON
STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y ALGUNAS DE SUS FRACCIONES
EN RATONES BALB/C.

MARIA DEL CARMEN BASULTO GARCIA.

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. ALFONSO ENRIQUE ISLAS RODRIGUEZ

ESTA TESIS SE REALIZO EN LA SECCION DE INMUNOLOGIA DE LA
DIVISION DE PATOLOGIA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIO-
MEDICA DE OCCIDENTE, BAJO LA DIRECCION DEL DR. HECTOR GO-
MEZ ESTRADA.

AGRADEZCO A TODOS LOS MIEMBROS DE LA DIVISION
DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL POR LA AYUDA QUE ME
BRINDARON.

AL DR. AMADO GONZALEZ MENDOZA, JEFE
DE LA DIVISION DE PATOLOGIA EXPE-
RIMENTAL DE LA UIBO POR LA OPORTU-
NIDAD QUE ME BRINDO PARA REALIZAR
MI TRABAJO DE TESIS.

Y DE UN SENTIR MUY ESPECIAL AL DR. HECTOR GOMEZ
ESTRADA Y A LA Q.F.B. ANA MARIA PUEBLA PEREZ,
POR SU AYUDA INCONDICIONAL SIN LA CUAL NO HUBIE
RA PODIDO REALIZAR ESTE TRABAJO.

"A MIS PADRES"....
POR SU CARINO.

"A MIS HERMANOS"..
POR SU APOYO.

"A MIS COMPAÑEROS Y
MAESTROS"..
POR SU AYUDA.

"Y PARA UNA GRAN AMIGA"..
POR SU VALIOSA AMISTAD
GRACIAS MARCELA.

I N D I C E:

INTRODUCCION.....1
ANTECEDENTES.....2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....5
HIPOTESIS.....6
OBJETIVOS.....6
MATERIAL Y METODOS.....7
EVALUACION DE LOS RESULTADOS.....13
RESULTADOS.....14
DISCUSION.....16
CONCLUSION.....17
BIBLIOGRAFIA.....18

INTRODUCCION

Staphylococcus aureus es una bacteria que coloniza principalmente la piel y el epitelio de las vías respiratorias del hombre, en donde se le ha considerado parte de la flora bacteriana normal. De hecho, se ha encontrado que un 40 a 70% de los humanos son portadores sanos del S.aureus en el exudado faringeo ¹⁻³.

Sin embargo, en algunos casos que son susceptibles, S.aureus puede causar infecciones agudas y crónicas de diversas localizaciones², cuyo tratamiento médico puede dificultarse debido a la alta resistencia de estos gérmenes a múltiples antimicrobianos^{1,2,11,12}.

Por ello, se considero necesario estudiar el efecto protector que pudiera tener la inmunización con S.aureus o sus fracciones antigénicas en contra de la infección letal en ratones, lo que constituyó el tema de este trabajo.

ANTECEDENTES

Los Staphylococcus son gérmenes esféricos de una micra de diámetro, Gram-Positivos, generalmente agrupados en racimos y crecen en diversos medios de cultivo. Se desarrollan en un amplio margen de temperaturas que fluctúan entre 12 y 45°C, siendo la óptima de 37°C, son anaerobios facultativos pero crecen mejor en presencia de oxígeno. Algunas variedades producen pigmentos característicos que varían del blanco al amarillo-dorado. Fermentan varios carbohidratos produciendo ácido sin gas, licúan la gelatina, fermentan el manitol y reducen los nitratos a nitritos. Las especies patógenas se caracterizan por la producción de coagulasa así como de la hemólisis en placas de agar sangre^{1,3}.

S.aureus presentan una membrana plasmática que rodea el citoplasma, en torno de la cual se encuentra una rígida y gruesa pared bacteriana formada por los peptidoglicanos que constituyen el 50% del peso de la pared, ácidos teicoicos en un 40% y proteína A del 5 al 10%⁴.

Los peptidoglicanos son polímeros lineales de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos entre sí por enlaces beta- 1,4 y por un conjunto de cadenas laterales tetrapeptídicas idénticas unidas al ácido N-acetilmurámico y un conjunto de puentes peptídicos transversales idénticos. Las cadenas tetrapeptídicas suelen estar conformadas por la L-alanina, D-isoglutamina, L-lisina y D-alanina¹⁻⁵. Los peptidoglicanos presentan determinantes antigénicos con los cuales se combinan las moléculas de anticuerpos de la clase IgG que protegen contra el S.aureus por su acción opsonizante^{6,7}. Los peptidoglicanos también activan el sistema del complemento por la vía clásica y por la vía alterna, lo que puede favorecer la lisis o fagocitosis bacteriana^{6,7}. Sin embargo, el S.aureus es un germen catalasa-positivo, que puede oponerse al efecto microbicida de las células fagocíticas - por desdoblar el peróxido de hidrógeno producido por ellas en agua y oxígeno gaseosos sin efecto microbicida -^{6,7}. Los peptidoglicanos también suprimen la quimiotaxis y la fagocitosis de los neutrofilos^{6,7}, y causan la degranulación de los basófilos⁸, lo que sugiere que los peptidoglicanos del S.aureus pueden modular la intensidad de la reacción inflamatoria que causa este germen⁸.

Los ácidos teicoicos forman el 40% de la pared celular del S.aureus^{6,7}. Son polímeros hidrosolubles y polares de fosfato de ribitol unidos al ácido N-acetilmurámico de los peptidoglicanos^{1,4,5}. La mayoría de los ácidos teicoicos pueden ser extraídos de las paredes celulares ya sea con ácido tricloroacético o álcalis⁵.

Los ácidos teicoicos forman antígenos de superficie del S.aureus^{4,9}. La detección de anticuerpos de las clases IgG o IgM contra ellos es útil para el diagnóstico - de las infecciones por S.aureus^{4,9}.

La proteína A es la envoltura más superficial del - S.aureus¹⁰, constituye del 5 al 10% del peso de la pared bacteriana, si bien en algunas cepas puede estar casi ausente⁴. Tiene una afinidad espontánea por el fragmento - Fc de las inmunoglobulinas (principalmente de la IgG), - fija sobre su superficie al componente C₃ del sistema -- del complemento y a la fibronectina^{4,10,11}.

S.aureus produce y libera al medio diversas protef nas extracélulares, algunas de las cuales tienen acción potogénica^{1,3}. Estas han sido más conocidas por su acción

biológica que por sus propiedades fisico-químicas, por lo que el número exacto de ellas es desconocido. Estas son por ejemplo la alfa, beta, y gama hemolisinas, enterotoxina termoresistente, coagulasa, fibrolisina, hialuronidasa, leucocidina, y una toxina exfoliativa de la piel^{1,4,10}.

Se ha informado que S.aureus ocupa el segundo o tercer lugar como bacteria patógena a los seres humanos. Es causante de la formación de abscesos de diversas localizaciones, bacteremias, septicemias, endocarditis, neumonías, osteomielitis, piomiositis, impétigo, amigadallitis, sinusitis, otitis media, shock tóxico y síndrome de la piel escaldada^{2,9,11,12}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

S.aureus es una especie con una gran resistencia a muchos de los antimicrobianos, que puede ser debida a la presencia de plásmidos o la producción de la enzima beta-lactamasa^{1,11,12}. La resistencia del S.aureus a los antimicrobianos plantea un problema medico particularmente serio en el tratamiento de las infecciones crónicas por S.aureus. Sin embargo, para ello, los médicos actualmen-

te solo cuentan con los antimicrobianos desarrollados -- por la industria farmacéutica; pero casi no se ha recurrido a inducir la respuesta inmune contra el germen.

En este trabajo se probó si la inmunización con antígenos del S.aureus podría tener efecto protector contra la infección letal por ese mismo germen en ratones.

HIPOTESIS

La inmunización con S.aureus y otros de sus componentes antigénicos, protegen a los ratones contra la infección letal por ese microorganismo.

OBJETIVOS

1. Determinar cuál es la dosis letal de S.aureus para -- los ratones de la cepa BALB/C.
2. Investigar si la inmunización con S.aureus entero y -- muerto por calentamiento protegen a los ratones con-- tra la dosis letal.
3. Investigar si la inmunización con Peptidoglicanos, -- Peptidoglicanos Asociados a la Proteína A y las pro--

teínas Extracélulares del S.aureus protegen a los ratones contra la dosis letal.

MATERIAL Y METODOS

Staphylococcus aureus. Se utilizó la cepa Cowan I del S. aureus. Esta se mantuvo congelada a -20°C en alícuotas en tubos de ensayo que contuvieron los inóculos del S.aureus en 2ml de Medio de Cultivo líquido enriquecido con extracto de cerebro y corazón (Bioxon-México) adicionado del 20% (v/v) de glicerina (Merck - México). La congelación de la cepa fue para evitar las posibles mutaciones que pudiera presentar la misma si se le hubiera conservado por resiembras sucesivas. Cada alícuota se utilizó para la obtención de cada uno de los cultivos subsecuentes.

Cultivo del S.aureus. Se efectuó en botellas planas de un litro de capacidad, una de cuyas caras de 10 X 20 cm se cubrió con 60 ml de Medio de Cultivo Sólido para Staphylococcus No.110 (Bioxon México) que al gelificarse forma una capa de 1 cm de grosor. Cada botella se inoculó con 0.5 ml del líquido de las alícuotas recién descongeladas y se incubó a 37°C por 72 horas cuando las bacte-

rias se volvieron confluentes. Las bacterias se cosecharon por lavados de la superficie de los cultivos con 10 ml de NaCl 0.15 M. enseguida, los S.aureus se lavarón - - tres veces por centrifugación a 2000G por 30 minutos a - 4°C y se resuspendieron en 10 ml de NaCl 0.15M. Las bacterias así cosechadas se utilizaron para la determinación de la dosis letal así como también para la preparación del S.aureus entero de los Peptidoglicanos Asociados a la Proteína A o de los Peptidoglicanos con los cuales los ratones fueron inmunizados.

Preparación de los peptidoglicanos. Se utilizaron los S.aureus cosechados como se describió anteriormente. Para la obtención de los peptidoglicanos se siguió el método descrito por Christensson¹³. Para ello, se preparó una suspensión de 200 mg de S.aureus (peso húmedo) en 10ml de ácido tricloracético al 10% (p/V) en agua Bidestilada y se calentaron a 95°C por una hora. Enseguida se centrifugarón a 2000 G durante 30 minutos y se lavaron 3 veces en 10 ml de NaCl 0.15 M amortiguado en fosfato disódico a pH 7.0. El sedimento se trato con 2100 U/ml de Tripsina (Sigma-Saint Louis Missouri, U S A) disuelto en la solu-

ción anterior a 37°C por 2 horas con agitación cada media hora. Luego, el sedimento se lavo 5 veces por centrifugación a 2000 G 15 minutos y resuspendio en 10 ml de agua Bidestilada.

Preparación de los Peptidoglicanos Asociados a la Proteína A. Se utilizó el mismo método descrito en el párrafo anterior sin hacer en tratamiento con Tripsina.

Al material obtenido ya sea Tripsinizado o no se le hizo determinación de proteínas por el método de Lowry¹⁴. Se estandarizaron a contener 10mg de proteína por ml y se guardaron a -20°C durante la inmunización y titulación de anticuerpos de los ratones.

Preparación de las Proteínas Extracelulares. Para la obtención de las proteínas extracelulares se siguió el método descrito por Best¹⁵. Para ello, se hicieron cultivos del S.aureus en el dializado libre de proteínas del Medio de Cultivo líquido enriquecido con extracto de cerebro y corazón (Bioxon-México). El dializado se preparó llenando con 200 ml del medio de cultivo un tubo de celofan para diálisis No.24 (Curtin-México) que permite el -

paso de moléculas de menos de 8000 daltons y no de proteínas contra 200 ml de agua bidestilada a 4°C por 24 horas con precauciones asépticas. El dializado se distribuyó en volúmenes de 10 ml en tubos de ensayo con tapón de rosca y esterilizados en autoclave a 15 libras por 15 minutos, posteriormente estos se incubaron 24 horas a 37°C como prueba de esterilidad. Después se inocularon con 5×10^7 S.aureus por tubo y se incubaron 48 horas a 37°C. Estos se centrifugaron y separaron sus sobrenadantes. Estos se mezclaron con 4 volúmenes de Etanol absoluto (Merck- México), se dejaron reposar 72 horas a 4°C y se centrifugaron a 2000 G por 30 minutos. Los sedimentos se disolvieron en agua bidestilada, se determinó su contenido de proteínas por el método de Lowry¹⁴, se estandarizaron para contener 10 mg de proteínas por ml y se guardaron a 20°C hasta que se utilizaron en el siguiente mes para la inmunización y titulación de anticuerpos de los ratones.

Preparación de los S.aureus enteros. Un volumen de una suspensión de S.aureus se calentó a 96°C por una hora a baño de agua o ebullición y se dejó enfriar. Enseguida se mezcló con un volumen igual de una solución al 10% (p/v) de Formaldehido (herlico - México) durante 48 ho--

ras a temperatura ambiente. Después se lavaron tres veces en 10 ml de NaCl 0.15 M a 2000 G por 30 minutos y a 4°C y se resuspendieron a una concentración de 3×10^9 bacterias por ml en la misma solución adicionada de 0.1 g % (p/v) de Formandehido.

Titulación de Anticuerpos por Inmunidifusión. Para la titulación de anticuerpos se utilizó el método de Ouchterlony¹⁶. Para ello se diluyó 1 g de agar noble (Difco-U S A) en 100 ml de una solución de Barbituratos de sodio (Merck-México) 0.05 M a pH 7.3 calentado a 80°C para permitir la disolución completa del agar. Se depositaron 7 ml de esta mezcla en cajas de petri de 5 cm de diámetro y se dejaron solidificar sobre una mesa horizontal durante 2 horas. Enseguida se hicieron 6 perforaciones en forma de pozos cilíndricos de 5 mm de diámetro y a la misma distancia entre sí y de otro orificio central igual cuyo interior fué extraído por succión. En el pozo central se depositaron 0.2 ml de las preparaciones ya sea Peptidoglicanos, Peptidoglicanos Asociados a la Proteína A o de las Proteínas Extracelulares del S.aureus y en los pozos

perifericos se depositarón volúmenes iguales de los sueros de los ratones inmunizados específicamente o testigos. Luego se incubarón en camara húmeda a 37°C por 24 horas. Las bandas de precipitación se observaron con iluminación oblicua contra fondo negro.

Ratones. Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/C de 2 y 3 meses de edad y de 25 a 28 g de peso, alojados en grupos de 10 ratones en jaulas de plástico con cama de aserrín esterilizado y alimentados con alimento comercial para roedores (Purina-México) y agua purificada para consumo voluntario en habitaciones a temperatura constante de 22°C y ciclos alternos de iluminación u oscuridad de 12 horas.

Determinación de la dosis letal. Se formaron 5 grupos de 10 ratones cada uno. Las dosis del S.aureus que se aplicaron a los grupos varió de 15×10^7 a 10×10^9 . De tal forma que el grupo 1) recibió 15×10^7 ; el grupo 2) 15×10^8 ; el grupo 3) 2×10^9 ; el grupo 4) 15×10^9 y el grupo 5) 10×10^9 S.aureus en 0.1 ml de NaCl 0.15 M por vía intraperitoneal. Cada grupo se observó 72 horas después de inoculados y se registro su letalidad.

Inmunización de los ratones. Se formaron 5 grupos de 10 ratones cada uno, a los cuales se les aplico 1 mg de proteína de cada antígeno. El grupo 1 se inmunizó con S.aureus entero. El grupo 2 con Proteínas Extracelulares del S.aureus. El grupo 3 con Peptidoglicanos. El grupo 4 con Complejo Peptidoglicanos Asociados a la Proteína A. Al grupo 5 se le aplico NaCl 0.15 M.

Todos los ratones fueron inmunizados cada ocho días por vía intraperitoneal hasta completar 4 inmunizaciones de cada antígeno. Una semana después de la última inmunización a los ratones se les aplico la dosis letal por vía intraperitoneal y se registro su sobrevivencia.

Evaluación de los resultados. Las cifras de mortalidad de cada grupo se evaluarón estadísticamente por el método de Chi Cuadrada¹⁷.

RESULTADOS

Dosis Letal. Los diez ratones que recibieron 10×10^9 o más S.aureus fallecieron entre las doce y veinticuatro - horas después de la inoculación. Esta fue la dosis letal al 100%.

Efecto Inmunizante. En la tabla I y Gráfica I se muestran los resultados del efecto de la inmunización del S.aureus y algunas de sus fracciones. En ellas puede verse que el Complejo Peptidoglicanos Asociados a la Proteína A y los Peptidoglicanos puros, protegieron a los ratones de la dosis letal en un 100 y 80% respectivamente. Las Proteínas Extracélulares los protegieron en un 10%, sin embargo el S.aureus entero no los protegió de la dosis letal.

Al comparar los grupos 3 y 4 con el grupo testigo hubo - diferencias altamente significativas (< 0.001). La mayor protección se observó con los Peptidoglicanos Asociados a la Proteína A.

Titulación de Anticuerpos. A los ratones que se protegieron de la dosis letal con las fracciones del S.aureus -- mencionadas en el párrafo anterior se les hizo titulación de los anticuerpos séricos veinte días después del

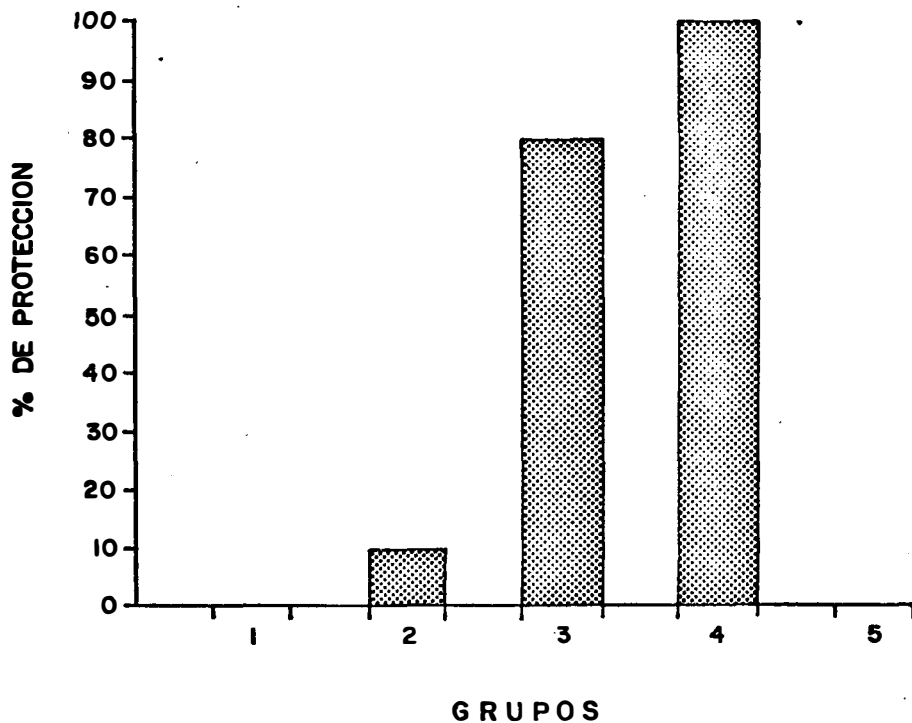
reto. El título de anticuerpos fué de 1: 8 a 1:16 tanto en el grupo inmunizado con Peptidoglicanos como en los - inmunizados con Peptidoglicanos Asociados a la Proteína

A.

TABLA I. RESULTADOS DEL EFECTO PROTECTOR DE LA INMUNIZACION CON S.AUREUS Y ALGUNAS DE SUS FRACCIONES.

GRUPO	INMUNIZADOS CON	PROTECCION &	COMPARACIONES	P
1	<u>S.aureus</u>	0	1 vs 5	N.S
2	Proteínas Extracelulares	10	2 vs 5	N.S
3	Peptidoglicanos	80	3 vs 5	<0.001
4	Peptidoglicanos Asociados a la Proteína A	100	4 vs 5	<0.001
5	Testigo	0	-	-

GRAFICA I. Resultados del efecto protector de la Inmunización con S. Aureus y algunas de sus fracciones.



1.- S. AUREUS ENTERO.

2.- PROTEINAS EXTRACELULARES.

3.- PEPTIDOGLICANOS.

4.- PEPTIDOGLICANOS

ASOCIADOS A LA
PROTEINA A.

5.- TESTIGO.

DISCUSION

En este trabajo se observó que es factible la obtención de algunos antígenos del S.aureus, como son los Peptidoglicanos y estos Asociados a la Proteína A.

La inmunización con el complejo Peptidoglicanos Asociados a la Proteína A fué el más inmunizante y confirió el mayor porcentaje de protección (100%) a los ratones inmunizados con éste.

En segundo lugar los Peptidoglicanos purificados también tuvieron un buen efecto inmunizante y protector - - (80%).

Las Proteínas Extracelulares del S.aureus dio un porcentaje bajo de protección (10%).

Finalmente la inmunización con S.aureus entero no -- confirió protección alguna.

Estos resultados indican que los Peptidoglicanos puros y los Peptidoglicanos Asociados a la Proteína A fueron mejores antígenos que el Staphylococcus, y que pueden ser más útiles para la elaboración de vacunas antiestafilococcicas para la prevención o tratamiento de las infecciones de S.aureus, a juzgar por los resultados obtenidos

en este modelo experimental y siempre y cuando los resultados sean extrapolables a otras especies.

CONCLUSION

La inmunización con Peptidoglicanos del S.aureus ya sea Asociados o no a la Proteína A protegen a los ratones contra la infección letal por ese mismo germen.

BIBLIOGRAFIA

1. Jawets E., Melnick J L., Alderberg E A.: Microbiología Medica. 1981. Ed Manual Moderno Mex. 13-16 y 182-186.
2. Kloos W E.: Natural Populations of the Genus Staphylococcus. Ann Rev. Microbiol . 1980. 34:559-92.
3. Pelczar M J., Reid R D., Chan E C S. : Microbiología - 1982. Ed. Mc Graw-Hill. Mex. 444-560.
4. Fudenberg H H., Caldwell J L., Stites D P., Wells J V.: Inmunología Clínica. 1983. Ed. Manual Moderno Mex. 616.
5. Roger H J.: Biogenesis of the Wall in Bacterial Morphogenesis. Adv. Microbiol Physiol 1979. 19:1.
6. Musher D M., Verbrugh H A., Verhoef J. : Suppression of Phagocytosis and Chemotaxis by Cell Wall Components - of Staphylococcus aureus . J. Immunol. 1981. 127:84-88.
7. Peterson P K., Wilkinson B J., Kim y., Schmeling D., Douglas S D., Quie P G., Verhoef J.: The Key Role of Peptidoglycan in the Opsonization of Staphylococcus aureus J. Clin. Invest. 1978. 61:597-609.
8. Espersen F., Jarlov O J., Jensen C., Sthal Skov P., Nor S Staphylococcus aureus Peptidoglycan Induce Histamine Release from Basophil Human Leukocytes in vitro. Infection And Immunity. 1984. 46:710-714.
9. Mackowias P A., Smith J W: Teichoic Acid Antibodies in chronic Staphylococcal Osteomyelitis. Annals of Internal Medicine. 1978. 89:494-496.

10. King B F.,Wilkinson B J. :Biding of Human Immunoglobulin G to Protein A in Encapsulated Staphylococcus aureus.Infection and Immunity.1981.33:666-672.
11. Sheagren J N.:Staphylococcus aureus.(First of Two - - Parts)The New England Journal of Medicine 1984.310: - 1368-1373.
12. Seagren J N.Staphylococcus aureus (Second of Two Parts The New England Journal of Medicine 1984.310:1437-1441
13. Christensson B.,Espersen F.,Hedström S A.,Kronvall g. Solid-Phase Radioimmunoassay of Immunoglobulin G Antibodies to Staphylococcus aureus Peptidoglycan in Patients With Staphylococcal Infection.Acta Pathol.Microbiol Immunol.Scand.1983.91.401-406.
14. Lowry O H.,Rosebrough N J.,Farr A L.,Randall A J. :Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent J.Biol. Chem.1951.193:265-275.
15. Bets., Scott D F.,Malcolm K J.,Crowell F W., Kirkland J J.:Enhanced Susceptibility of Male Rabbits to Infections with a toxic Shock train of Staphylococcus aureus .Inf.And Immunity.1984.46:727-732.
16. Ouchterlony O.:Diffusion-in-Gel Methods for Immunological Analysis.Prog.Allergy.1962.6:30-54.
17. Ya-Lun-Chou.: Analisis estadístico.Ed.Interamericana - México.1977. 479-481.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número 190/86

Srita. Marfa del Carmen Basulto Garcia
P r e s e n t e . -

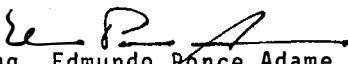
Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "Efecto protector de la inmunización específica con Staphylococcus aureus y algunas de sus fracciones en ratones Balb/C" para obtener la Licenciatura en Biología con Orientación Biomédica.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M. en C. Alfonso E. Islas Rodríguez.



A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Marzo 14 de 1986

El Director


Ing. Edmundo Ponce Adame.

FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

Arq. Mario Patricio Castillo Paredes.

c.e.p. El M.en C. Alfonso E. Islas Rodríguez; Director de Tesis.-Pte.

c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

C. Dr. Carlos Astengo Osuna
Director de la Facultad de Ciencias
de la Universidad de Guadalajara.


P r e s e n t e .

SR. DIRECTOR.

Por la presente informo a usted que he revisado la tesis titulada "Efecto protector de la inmunización específica con Staphylococcus aureus y algunas de sus fracciones en ratones BALB/C" presentada por la pasante de la carrera de Lic. en Biología María del Carmen Basulto García, la cual apruebo para que se imprima y presente a examen; debido a que la considero apta para ello.

No teniendo otro asunto que tratar me despido de usted atentamente.

Guadalajara Jalisco Noviembre 5 de 1986.


M en C. Alfonso E. Islas Rodríguez