

1985-1

REG. No. 81074038

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



DEMOSTRACION DE FRACCIONES SOLUBLES CON ACTIVIDAD
INMUNOSUPRESORA DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN
RATONES INOCULADOS CON CELULAS DE LINFOMA
MURINO L-5178-Y.

ARTURO OROZCO BAROCIO

13/10/85

DEMOSTRACION DE FRACCIONES SOLUBLES CON ACTIVIDAD
INMUNOSUPRESORA DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN
RATONES INOCULADOS CON CELULAS DEL LINFOMA MURINO

L-5178-Y.

ARTURO ORZCO BAROCIO.

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ADRIAN DANERI NAVARRO.

DEDICATORIAS

A lo inmutable

e inefable

a Dios.

Para Mercedes

con Amor.

A mis Padres.....

Por la vida que me han dado.

A mis hermanos.....

Por la amistad y apoyo
que siempre me han brin
dado.

A mis comañeros y

Maestros

Por lo que me -
enseñaron.

A todos los que laboran
en la U.I.B.O. DEL I.M.S.S.

A todos los miembros de la Div.
de Patología Experimental, por
toda la ayuda que me han dado.

Con especial agradecimiento
a los doctores: Amado Gonzá
lez M. y Héctor Gómez H. --
que han constituido parte -
en mi formación.

Muy especialmente a mi Direc--
tor de Tesis :

DR. ADRIAN DANERI NAVARRO.

Por su ayuda constante e incon
dicional, sin la cual no hubie
ra sido posible la realización
de este trabajo.

CONTENIDO

C O N T E N I D O

INTRODUCCION.

ANTECEDENTES

- Aspectos históricos de la inmunología del cancer.
- Mecanismos potenciales de la inmunidad antitumoral.
 - A). Mecanismos Específicos.
 - B). Mecanismos inespecíficos.
- Bases potenciales de la falta del rechazo de los tumores.
- Modelos experimentales en ratones con tumor.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

- Hipótesis.
- Objetivo.

MATERIAL Y METODOS.

- Plan General.
- Ratones.
- Línea Tumoral.

- Obtención de suero y líquido ascítico.
- Experimentos de transferencia celular pasiva.
- Análisis Estadísticos de los Resultados.

RESULTADOS.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

I N T R O D U C C I O N

Un considerable progreso se ha logrado desde 1950 en el tratamiento de las neoplasias humanas mediante el uso de quimioterápicos. Es factible obtener remisión completa en pacientes con determinados tipos de tumores durante 5 o más años después del diagnóstico, también el uso de radioterapia y cirugía ha incrementado el porcentaje de sobrevivencia. Algunos casos de leucemias agudas, linfomas -particularmente la enfermedad de Hodgkin-, determinados tipos de coriocarcinomas, tumores testiculares, tumor de Wilms, ciertos tumores de piel carcinoma de ovario y tumores de tiroides forman parte de la lista de tumores que en algunos casos han sido tratados con éxito. (1).

Sin embargo, graves inconvenientes limitan la eficiencia de los agentes terapéuticos actuales, por ejemplo la insuficiente selectividad de los quimioterápicos que ocasionan toxicidad a los tejidos normales. De tal manera que el frecuente desarrollo de resistencia a las drogas no puede ser superado sin una inaceptable toxicidad. Se han planteado algunas estrategias para el desarrollo de tratamientos más efectivos contra el cáncer que incluyen el desarrollo de drogas y modalidades de tratamiento basadas en una mejor comprensión de la biología y bioquímica de las células malignas, así como el desarrollo de nuevos tratamientos que modifiquen la interacción entre el huésped y el tumor.

Basados en la asunción de que los antígenos asociados a los tumores pueden evocar una respuesta específica del huésped, se ha intentado utilizar este potencial en el desarrollo de varios tipos de inmunoterapia que pueden explotar-

las reacciones fisiológicas del huésped, sin causar daños tóxicos a los tejidos normales. A pesar que el valor clínico de la mayoría de regímenes de inmunoterapia no han sido significativos, es razonable el desarrollo de tratamientos capaces de aumentar la respuesta del huésped contra el tumor y convertirse en instrumento fundamental en el manejo definitivo de algunas formas de cancer. (2).

Un aspecto importante de la interacción huésped-tumor corresponde a los mecanismos mediante los cuales las células malignas evaden al sistema inmune, dentro de ellos consideramos importante investigar la presencia de factores solubles inmunosupresores en un modelo experimental de ratones con linforma murino L-5178-Y. Este trabajo forma parte de una serie de proyectos que pretenden estudiar y caracterizar dichos factores inmunosupresores.

ANTECEDENTES

A N T E C E D E N T E S

ASPECTOS HISTORICOS DE LA INMUNOLOGIA DEL CANCER.

El concepto de que las células malignas tienen antígenos que faltan en las normales, condujo al uso de inmunoterapia pasiva con suero y activa con vacunas del tumor autólogo, desde finales del siglo pasado. Sin embargo el progreso en la inmunología del cáncer experimental se retardó debido a la falta de conocimientos acerca de: 1) ocurrencia y naturaleza de los antígenos específicos tumorales, 2) bases del rechazo de alotransplantes y 3) la falta de cepas de animales singénicos.

En 1957 PREHN y MAIN claramente demostraron el desarrollo de una respuesta inmune específica del huésped contra las células tumorales en un modelo de ratones singénicos al tumor. Este hecho marcó el inicio de la moderna inmunología del cáncer. (3).

MECANISMOS POTENCIALES DE LA INMUNIDAD ANTITUMORAL.

Los mecanismos potenciales de inmunidad contra las células cancerosas, incluyen fuerzas específicas e inespecíficas contra el tumor:

A). MECANISMOS ESPECIFICOS.- El principal mecanismo específico corresponde al mediado por células que incluye a la lisis por células Teti, macrófagos armados con SMAF (factor Específico Armador de Macrófagos), y probablemente algunas linfocinas específicas. En cambio el papel de los anticuerpos es menos importante; aunque en teoría pueden actuar en presencia de complemento, mediar citotoxicidad celu--

lar dependiente de anticuerpos por células K (asesinas), -- macrófagos y polimorfonucleares, a las células tumorales.

B). MECANISMOS INESPECIFICOS.- Involucran principalmente a las células asesinas naturales (NK) y a los macrófagos (2,3,4,5).

BASES POTENCIALES DE LA FALTA DEL RECHAZO DE LOS TUMORES.

Las razones más probables por las que los tumores no son rechazados son: 1) La mayoría de los tumores naturales no son lo suficientemente inmunogénicos, 2) el rápido crecimiento de los tumores malignos produce una gran cantidad de antígenos y productos tumorales que afectan la respuesta inmune específica y general, 3) durante su desarrollo inicial algunos tumores ocupan sitios privilegiados que restringen el contacto con el sistema inmune, y 4) sobreproducción de prostaglandinas, esteroides y otros factores por el huésped con tumor que limitan los efectos tumorocidas de los macrófagos y células NK.

Los mecanismos que pueden bloquear el desarrollo de -- una respuesta inmune contra el tumor incluyen: 1) Tolerancia inmunológica de los antígenos tumorales, 2) actividad supresora de linfocitos o macrófagos sobre las células NK, 3) retroalimentación negativa por anticuerpos, 4) modulación antigénica, 5) desviación inmunológica, 6) enmascaramiento antigénico, 7), eliminación antigénica, 9) defectos en el reconocimiento celular, 10) inmunosupresión general inducida por productos tumorales, 11) bloqueo por anticuerpos de facilitación, y 12) supresión por anticuerpos anti-ideotipo (2,3,4,5).

MODELOS EXPERIMENTALES EN RATONES CON TUMOR.

En varios modelos experimentales de ratones con diferentes tumores, se han observado la presencia de macrófagos con actividad supresora de la respuesta inmune celular y -- humoral (6,7,8,9,10,11,12). Asi mismo, de linfocitos supresores de origen tímico (13, 14, 15, 16, 17, 18) que al ---- transferirse a ratones normales deprimen su respuesta inmune a diferentes antígenos retados. Se han detectado factores solubles con actividad supresora en algunos modelos de ratones con tumor, en determinados casos son las prostaglandinas las responsables (28), en otros, complejos inmunes -- (29), pero no se ha determinado con precisión la proceden-- cia y naturaleza de tales factores (13, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los mecanismos mediante los cuales los tumores evaden la destrucción inmunológica, permanece sin comprenderse en su totalidad.

Es necesario comprender mejor la biología de la interacción entre HUESPED-TUMOR en modelos experimentales, que nos permitan investigar los efectos de posibles inmunomoduladores y drogas que restituyan una respuesta inmunológica normal.

HIPOTESIS.

Los ratones Balb-C inoculados con células del linfoma murino L-5178-Y, contienen en su suero factores inmunosupresores de la respuesta inmune celular.

OBJETIVO.

Demostrar la presencia de factores solubles inmunosupresores en ratones inoculados con células del linfoma murino L-5178-Y.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS.

PLAN GENERAL.

Se investigó la respuesta de hipersensibilidad celular al dinitrofluorobenceno (DNFB) de ratones de la cepa Balb-C con linfoma murino L-5178-Y y se comparó su respuesta con ratones normales de la misma cepa. Esta misma prueba se estudió en ratones normales inoculados con: suero y líquido ascítico libre de células de ratones con linfoma y suero de ratones normales. Además también se realizó esta prueba a ratones que se les hicieron transferencia celular pasiva.

Con la finalidad de determinar en que momento de la respuesta inmunológica actúa el líquido ascítico del linfoma, deprimiendo la respuesta al DNFB, se realizaron experimentos de transferencia con células de bazo de ratones tratados o no con líquido ascítico del linfoma libre de células con DNFB a ratones normales que solo recibieron dosis reveladoras de DNFB (FASE INDUCTORA). Y transferencia de células de bazo de ratones sensibilizados con DNFB a ratones que fueron tratados o no con líquido ascítico del linfoma libre de células inmediatamente después de la transferencia (FASE EFECTORA).

Así mismo se investigó el efecto que causa la inoculación de líquido ascítico libre de células en la actividad inmunológica de células de bazo y macrófagos peritoneales de ratones normales, mediante experimentos de transferencia celular.

También se investigó la presencia de células con actividad inmunosupresora en el bazo de ratones con linfoma mu-

rino al transferirse a ratones normales posteriormente sensibilizados con DNFB.

RATONES: Se utilizaron ratones machos Balb-C de tres meses de edad y de 23 a 25 grs. de peso, alojados en grupos de 10 (excepto en los experimentos de transferencia celular que fueron grupos de 4), en jaulas de polipropileno con cama de aserrín esterilizado, a los que se proporcionaron alimento comercial para roedores (Purina, México) y agua purificada para consumo voluntario en habitaciones con temperatura constante de $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

LINEA TUMORAL: La línea del linforma murino L-5178-Y se originó en el laboratorio del Dr. LLOYD LAW en 1956 como una linfoma tímico espontáneo en un ratón de la cepa DBA/2. Desde entonces fue mantenido por trasplante seriado a ratones singénicos por FISHER (30). El linforma fue cedido a nuestro departamento por la Universidad de Utah por cortesía del Dr. STEVENS. Nosotros le hemos mantenido por trasplante semanal en ratones Balb-C, inoculados con 5×10^6 células del linforma por vía i.p. lavadas 3 veces con solución balanceada de HANKS.

OBTENCION DE SUERO Y LIQUIDO ASCITICO: Del grupo de ratones inoculados con células del linforma murino L-5178-Y se obtuvo mediante punción cardiaca 0.5 ml. de sangre de cada ratón y 2 ml. de líquido ascítico el octavo día después de la inoculación. El líquido ascítico se centrifugó a --- 8 000 G durante 35 minutos en tres ocasiones y utilizando solo el sobrenadante; el suero fue obtenido después de la retracción del coágulo por centrifugación a 1 000 G durante 5 minutos, de igual forma se obtuvo en los grupos controles.

PRUEBA INMUNOLOGICA.

PRUEBA DEL DINITROFLUOROBENCENO (DNFB). Para estudiar la respuesta inmune celular en los ratones con linfoma murino L-5178-Y, con líquido ascítico libre de células del linfoma, en ratones normales y en ratones con transferencia celular, se utilizó la sensibilización al DINITROFLUOROBENCENO (DNFB) (31). Para esto se rasuró la piel del abdomen en un área de 2X2 cm. de cada ratón. Luego se aplicaron 20 microlitros de una solución al 0.5 por ciento (p/v) de DNFB disuelto en una mezcla de acetona y aceite de oliva en proporción 4:1. A las 24 hrs. se repitió la aplicación de una segunda dosis sensibilizante igual que la primera. Al quinto día después de iniciar la sensibilización se aplicó en la piel de la cara externa de la oreja derecho de cada ratón la dosis de reveladora de 10 microlitros de DNFB al 0.2 por ciento (p/v) en el solvente mencionado. Antes de aplicar la dosis reveladora, y 24 hrs. después de ella, se midió el grosor de la oreja con un micrómetro de precisión -- aplicado a presión siempre constante regulada por su muelle. Las lecturas del grosor se obtuvieron en milésimas de pulgadas (mp) inglesa. Se compararon los grosores de las orejas de los grupos tratados con 5×10^6 células de linfoma, con líquido ascítico libre de células del linfoma, con transferencia celular, y a los testigos. Enseguida se sacrificaron los ratones y se efectuaron cortes histológicos de las orejas para evaluar la intensidad de las reacciones de hipersensibilidad celular que ocurrieran. Los cortes de las orejas se hicieron inmediatamente después de la medición, y fueron fijadas en formol al 10%; luego se incluyeron en parafina para los cortes histológicos que fueron teñidos con técnica de Hematoxilina y Eosina.

A cada experimento, aparte de su grupo problema y su -

grupo testigo, tuvieron un tercer grupo de testigos negativos, a los que no se sensibilizaron al DNFB, solamente se les aplicó la dosis reveladora. Estos no aparecen en los cuadros, pues los resultados todos fueron siempre negativos.

EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA CELULAR PASIVA

A). DETERMINACION DE LA FASE DE LA RESPUESTA INMUNE EN LAQUE ACTUA SUPRIMIENDO LOS FACTORES SOLUBLES DEL LIQUIDO ASCITICO DE RATONES CON LINFOMA, LA RESPUESTA AL --DNFB.

i). FASE INDUCTORA: Se sensibilizaron con DNFB grupos de 4 ratones tratados o no con líquido ascítico de ratones con linfoma (0.5 ml., por vía intraperitoneal (i.p.) un día antes y el primer día de la sensibilización, posteriormente al día quinto se obtuvieron sus bazos que fueron disociados en un homogenizador de vidrio (PYREX) con 5 ml. de solución balanceada de HANKS y resuspendidos a -- una concentración de 70×10^6 cel./ml.; se observó una viabilidad de las células de bazo mayor al 90% por exclusión al AZUL TRIPANO. Dichas células fueron transferidas (70×10^6 por vía i.p.) a ratones normales que se les aplicó inmediatamente -- después de la dosis reveladora de DNFB.

ii). FASE EFECTORA: Se sensibilizaron con DNFB grupos de 4 ratones y al quinto día de la sensibiliza---ción se obtuvieron sus bazos que fueron homogenizados de la misma manera descrita anteriormente y transferidos (70×10^6 células por vía i.p.) a ratones normales que fueron inmediatamente tratados o no con líquido ascítico de ratón con linfoma -- (0.5 ml. por vía i.p. el 5o. y 6o. día del experimento) y enseguida se les aplicó la dosis reveladora.

B). EFECTO DE LOS FACTORES SOLUBLES DEL LIQUIDO ASCITICO - DE RATONES CON LINFOMA MURINO, EN LA ACTIVIDAD INMUNOLOGICA DE CELULAS DE BAZO Y MACROFAGOS PERITONEALES DE RATONES NORMALES.

Se sensibilizaron grupos de 4 ratones con DNFB, previamente tratados o no con líquido ascítico de ratones -- con linfoma (desde un día antes y con una dosis de 0.5 ml. por vía i.p. c/24 hrs. hasta el 5o. día), y el --- quinto día fueron sacrificados para obtener macrófagos peritoneales mediante lavado peritoneal con 3 ml. de -- solución balanceada de HANKS y resuspendidos a una con centración de 21.7×10^6 /ml., y así mismo se obtuvie-- ron los bazos que fueron homogenizados en 5 ml. de so-- lución balanceada de HANKS; y posteriormente incubados en cajas de patri de 10 cms. de diámetro (KIMAX) a -- 37°C durante una hora para eliminar por adherencia al-- vidrio a los macrófagos esplénicos. Se observó una -- viabilidad de las células no adherentes mayor del 90%-- por exclusión al AZUL TRIPANO, así mismo se comprobó -- que esta población estaba formada por linfocitos (ma-- yor del 95% por tinción con WRIGHT).

Las suspensiones de linfocitos esplénicos y/o macrófa-- gos peritoneales se transfirieron a ratones normales - (21.7×10^6 macrófagos, 45×10^6 linfocitos a cada ra-- tón por vía i.p.) en las siguientes combinaciones y -- posteriormente se les aplicó las siguientes combinacio-- nes y posteriormente se les aplicó la dosis reveladora al DNFB.

GRUPO 1.- Se les administró linfocitos de ratones tes-- tigos con líquido ascítico sensibilizados con DNFB.

GRUPO 2.- Se les administró linfocitos de ratones tratados con líquido ascítico sensibilizados con DNFB.

GRUPO 3.- Se les administró linfocitos y macrófagos -- peritoneales de ratones testigos, sensibilizados ambos con DNFB.

GRUPO 4.- Se les administró linfocitos y macrófagos -- peritoneales de ratones tratados con líquido ascítico, sensibilizados al DNFB.

GRUPO 5.- Se les administró linfocitos de ratones tra tados con líquido ascítico y linfocitos de ratones tes tigos, ambos sensibilizados con DNFB.

GRUPO 6.- Se les administró linfocitos de ratones testigos y macrófagos peritoneales de ratones tratados -- con líquidos ascítico, sensibilizados, ambos con DNFB.

GRUPO 7.- Se les administró linfocitos de ratones tratados con líquido ascítico y macrófagos peritoneales - de ratones testigos, sensibilizados ambos con DNFB.

GRUPO 8.- Se les administró macrófagos peritoneales -- de ratones testigos y macrófagos peritoneales de ratones tratados con líquido ascítico, sensibilizados ambos con DNFB.

GRUPO 9.- Se les administó linfocitos y macrófagos peritoneales de ratones normales no sensibilizados con - DNFB.

C). DEMOSTRACION DE CELULAS INMUNOSUPRESORAS EN EL BAZO DE RATONES CON LINFOMA MURINO.

Para demostrar la presencia de células con actividad - inmunosupresoras en el bazo de ratones inoculados con 5×10^6 células, de linfoma murino, lavadas 3 veces -- con solución balanceada de HANKS; se obtuvo el bazo de éstos ratones (al octavo día de crecimiento del tumor) y de ratones normales para transferirlos a otros ratones normales un día antes del inicio de la sensibilización con DNFB. (50×10^6 células de bazo a cada ratón - por vía i.p.).

ANALISIS ESTADISTICOS DE LOS RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en los diferentes experimentos fueron analizados estadísticamente, mediante la -- prueba "t" de Student.

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

RESULTADOS

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

R E S U L T A D O S

A). REACCION DE HIPERSENSIBILIDAD CELULAR AL DNFB EN RATONES CON LINFOMA MURINA L-5178-Y.

En el grupo de ratones inoculados con 5×10^6 células de linfoma murino L-5178-Y, se notó una falta de reacción de hipersensibilidad al DNFB, mientras que el grupo testigo mostró un notable incremento en el espesor del pabellon auricular por la intensa inflamación que produjo la reacción de hipersensibilidad al DNFB (ver cuadro I), la diferencia estadística en el incremento del grosor del pabellón auricular entre ambos grupos fue altamente significativa. Esto es corroborado por los cortes histológicos de las orejas. Se observa en los cortes de los ratones no tratados con células del linfoma, edema, vasodilatación, y un infiltrado abundante con linfocitos, células plasmáticas e histiocitos (fig. 1). En cambio, en los cortes de orejas de los ratones tratados con células del linfoma, se observa una total anergia con ausencia del infiltrado inflamatorio (fig. 2).

B). REACCION DE HIPERSENSIBILIDAD CELULAR AL DNFB EN RATONES TRATADOS CON LIQUIDO ASCITICO (SOBRENADANTE) O SUERO DE RATONES CON LINFOMA MURINO L-5178-Y.

Los grupos de ratones tratados con líquido de ascítis o suero de ratones con linfoma, mostraron una reacción de hipersensibilidad deprimida al compararse a la intensa respuesta inflamatoria observada en los grupos de ratones tratados con suero normal o testigos (solamente sensibilizados) cuyo incremento en el grosor del pa

bellon auricular fue significativamente mayor (diferencia altamente significativa) a la de los dos primeros grupos (ver cuadro II). El corte histológico de las orejas de los ratones tratados con líquido ascítico libre de células del linfoma muestra una reacción de inflamación muy leve con escaso infiltrado celular (fig. 3.). Esto concuerda con los resultados de la prueba de hipersensibilidad al DNFB.

- C). REACCION DE HIPERSENSIBILIDAD CELULAR AL DNFB EN RATONES TRANSFERIDOS CON CELULAS DE BAZO DE RATONES TRATADOS DURANTE LA FASE DE INDUCCION INMUNOLOGICA CON LIQUIDO ASCITICO DE RATONES CON LINFOMA MURINO Y SENSIBILIZADOS CON DNFB.

El grupo de ratones transferidos con las células de bazo de ratones tratados con líquido ascítico en la fase de inducción inmunológica, mostraron una hiporrespuesta al DNFB similar a la de los testigos negativos (no sensibilizados), en cambio en los testigos sensibilizados se observó un mayor incremento en el grosor del pabellón auricular, significativamente diferente a los dos grupos anteriores (ver cuadro III).

- D). REACCION DE HIPERSENSIBILIDAD CELULAR AL DNFB EN RATONES TRATADOS CON LIQUIDO ASCITICO DE RATONES CON LINFOMA DESPUES DE SER TRANSFERIDOS CON CELULAS DE BAZO DE RATONES PREVIAMENTE SENSIBILIZADOS CON DNFB (TRATAMIENTO EN LA FASE EFECTORA).

No se observó diferencia significativa entre el grupo de ratones tratados con líquido ascítico de linfoma murino (en la fase efectora) y los ratones testigos --

(transferidos con células de bazo de ratones sensibilizados), pues ambos mostraron un incremento en el grosor del pabellón auricular similar a la dosis reveladora de DNFB (ver cuadro IV).

- E). REACCION DE HIPERSENSIBILIDAD CELULAR AL DNFB EN RATONES TRANSFERIDOS CON LINFOCITOS DE BAZO Y/O MACROFAGOS PERITONEALES DE RATONES SENSIBILIZADOS Y TRATADOS O NO CON LIQUIDO ASCITICO DE RATONES CON LINFOMA.

El grupo de ratones transferidos con linfocitos o linfocitos y macrófagos peritoneales de animales sensibilizados (con DNFB) y tratados con líquido ascítico mostraron un incremento menor en el grosor del pabellón auricular al DNFB, que los transferidos con linfocitos o linfocitos y macrófagos peritoneales de animales solamente sensibilizados. Así mismo se observó que al transferir macrófagos peritoneales de animales tratados con líquido ascítico y linfocitos de ratones solamente sensibilizados, el incremento en el grosor fue menor que el observado en los animales transferidos solamente con linfocitos de ratones solamente sensibilizados (testigos). Este efecto no se observa en la combinación de linfocitos de ambos grupos de animales (ver cuadro V).

- F). REACCION DE HIPERSENSIBILIDAD CELULAR AL DNFB EN RATONES TRANSFERIDOS CON CELULAS DE BAZO DE RATONES CON LINFOMA MURINO L-5178-Y (UN DIA ANTES DE LA SENSIBILIZACION CON DNFB).

El grupo de ratones transferidos con células de bazo - de ratones con linfoma mostró una marcada hiporrespueta al DNFB, mientras que en los ratones testigos ---- (transferidos con células de bazo de ratones normales, un día antes de la sensibilización) se observó una intensa reacción inflamatoria manifestada por el incremento del grosor del pabellon auricular.



FIG. 1. Corte histológico de la oreja de un ratón -- Balb-C en el que se efectuó la prueba de hipersensibilidad al dinitrofluorobenceno (DNFB). Se observa edema, vasodilatación, así como un abundante infiltrado inflamatorio caracterizado con linfocitos, células plasmáticas e histiocitos. Muestra que el edema solo aparece en la cara superior de la oreja, donde se aplicó el DNFB. Hematoxilina y Eosina, ampliación original 160 diámetros.

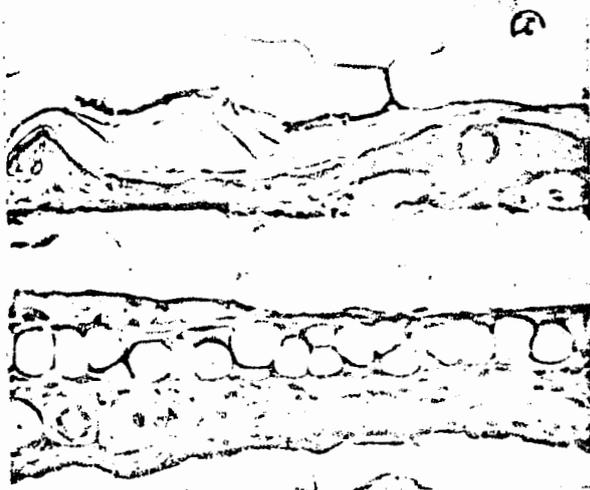


FIG. 2. Corte histológico de la oreja de un ratón --- Balb-C inoculado con células de linfoma murino L-5178-Y, en el que se efectuó la prueba de hipersensibilidad al dinitro fluorobenceno (DNFB). Se observa una anergia completa con marcada ausencia de infiltrado celular. Hematoxilina y Eosina, amplificación original 160 diámetros.

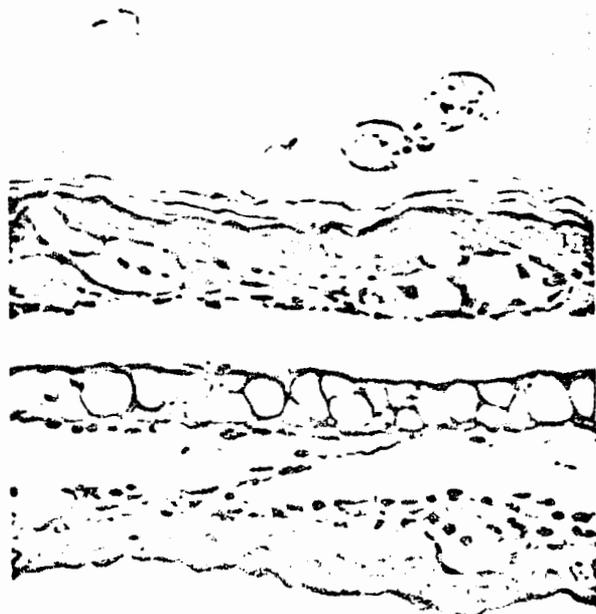


FIG. 3. Corte histológico de la oreja de un ratón --- Balb-C inoculado con líquido ascítico del linfoma murino -- L-5178-Y (libre de células), en el que se efectuó la prueba de hipersensibilidad al dinitrofluorobenceno (DNFB). Se observa una reacción de inflamación muy leve, con escaso in--filtrado celular. Hematoxilina y Eosina, amplificación ori--ginal 160 diámetros.

CUADRO I. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIZACION AL-DINITROFLUOROBENCENO (DNFB) EN RATONES CON LINFO MO MURINO L-5178-Y Y TESTIGOS, EVALUADA COMO INCREMENTO DEL ESPESOR DEL PABELLON AURICULAR POR LA INFLAMACION QUE PRODUJO LA REACCION DE HIPERSENSIBILIDAD CELULAR.

GRUPO	NO.DE RATONES	TRATAMIENTO	INCREMENTO
1	13	Testigos	5.883
2	13	Cels. Linfoma L-5178-Y'	0.160

Los incrementos están expresados en milésimas de pulgada.
Comparación mediante prueba "t" de Student.

1 vs 2 $p < 0.0001$

' 5×10^6 células de linfoma murino L-5178-Y.

CUADRO II. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIZACION AL DINITROFLUOROBENCENO (DNFB) EN RATONES TRATADOS CON LIQUIDO ASCITICO DE LINFOMA MURINO (LIBRE - DE CELULAS), CON SUERO DE RATON DE LINFOMA Y -- TESTIGOS; EVALUADA COMO INCREMENTO DEL ESPESOR- DEL PABELLON AURICULAR POR LA INFLAMACION QUE - PRODUJO LA REACCION DE HIPERSENSIBILIDAD CELU-- LAR.

GRUPO	NO.DE RATONES	TRATAMIENTO	INCREMENTO
1	13	Testigos	5.8830
2	12	Liq.Ascítico	0.4802
3	6	Suero de ratón con linfoma.	0.5900
4	10	Suero de ratón normal.	5.8300

Los incrementos están expresados en milésimas de pulgada.

Comparación mediante prueba "t" de Student.

1, 4 vs 2, 3 : $p < - 0.001$

1 vs 4 : p no significativa

2 vs 3 : p no significativa

' Dosis de 0.5 ml/vía i.p.

1 ml = 38 mg de prot.

CUADRO III. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIZACION - AL DINITROFLUOROBENCENO (DNFB) EN RATONES QUE- RECIBIERON CELULAS DE BAZO DE RATONES TRATADOS O NO CON LIQUIDO ASCITICO DEL LINFOMA UN DIA - ANTES Y EL PRIMER DIA DE LA SENSIBILIZACION. - EVALUADA COMO INCREMENTO DEL ESPESOR DEL PABELLON AURICULAR A LAS 24 HRS. FASE INDUCTORA.

GRUPO	NO.DE RATONES	CELS.TRANSFERIDAS	INCREMENTO
1	4	Testigos sensibi- lizados.	2.43
2	4	Liq. ascítico sen- sibilizados.	0.08
3	4	Testigos no sensi- bilizados.	0.12

Los incrementos están expresados en milésimas de pulgada.
Comparación mediante la prueba "t" de Student.

1 vs 2 y 3 : < 0.01

2 vs 3 : p no significativa.

Se transfirieron 70×10^6 células de bazo a cada ratón -
vía i.p.

' 0.5 ml de liq. ascítico, por via i.p. un día antes y el
primer día de la sensibilización.

CUADRO IV. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIZACION AL DINITROFLUOROBENCENO (DNFB) EN RATONES TRATADOS O NO CON LIQUIDO ASCITICO DEL LINFOMA AL 5o. -- DIA DE LA SENSIBILIZACION AL DNFB, RECIBIENDO - EL MISMO DIA CELULAS DE BAZO DE RATONES SENSIBILIZADOS AL DNFB EVALUADA COMO INCREMENTO DEL ESPESOR DEL PABELLON AURICULAR A LAS 24 HRS. FASE-EFECTORA.

GRUPO	NO.DE RATONES	TRATAMIENTO	INCRMENTO
1	4	Líquido ascítico	2.31
2	4	Testigos	1.98

Los incrementos están expresados en milésimas de pulgada.

Comparación mediante la prueba "t" de Student.

1 vs 2 : p no significativa.

Se transfirieron 70×10^6 células de bazo a cada ratón, vía i.p.

' Dosis 0.5 ml de liq. ascítico por vía i.p.
(1 ml = 38 mgs de proteínas).

CUADRO V. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIZACION AL -
 DINITROFLUOROBCENCENO (DNFB) EN RATONES TRANSFERI-
 DOS CON LINFOCITOS Y/O MACROFAGOS PERITONEALES -
 DE RATONES TRATADOS CON LIQUIDO ASCITICO Y SENSI-
 BILIZADOS PREVIAMENTE CON DNFB, Y SUS RESPECTI--
 VOS CONTROLES; EVALUADA COMO INCREMENTO DEL ESPE-
 SOR DEL PABELLON AURICULAR POR LA INFLAMACION --
 QUE PRODUJO LA REACCION DE HIPERSENSIBILIDAD CE-
 LULAR.

GRUPO	NO. DE RATONES	CELS. TRANSFERIDAS	INCREMENTO
1	4	L.T.	.95
2	4	L.L.	.22
3	4	L.T./M.T.	1.25
4	4	L.L./M.L.	.45
5	4	L.T./L.L.	.8
6	4	L.T./M.L.	.502
7	4	L.T./M.T.	.67
8	4	M.T./M.L.	.021
9	4	L.yM. no sensibil.	.013

Los incrementos están expresados en milésimas de pulgadas.
 Se transfirieron 21.7 millones de macrófagos peritoneales -
 y 45 millones de linfocitos esplénicos libres de células --
 adherentes.

CLAVES: L.T.- Linfocitos de ratones testigos sensibil. con -
 DNFB.

- L.L. Linfocitos de ratones tratados con liq. ascítico y sensibilizados con DNFB.
- M.T. Macrófagos peritoneales de ratones testigos sensibilizados con DNFB.
- M.L. Macrófagos peritoneales de ratones tratados con liq. - ascítico, sensibilizados con DNFB.
- L. Linfocitos no sensibilizados con DNFB.
- M. Macrófagos peritoneales no sensibilizados con DNFB.

CUADRO VI. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIZACION AL DINITROFLUOROBENCENO (DNFB) EN RATONES QUE RECIBIERON CELULAS ESPLENICAS DE RATONES CON LINFOMA O DE TESTIGOS, UN DIA ANTES DE LA SENSIBILIZACION. EVALUADA COMO INCREMENTO DE ESPESOR -- DEL PABELLON AURICULAR A LAS 24 HRS.

GRUPO	NO.DE RATONES	CELS.TRANSFERIDAS	INCREMENTO
1	5	Ratones-Linfoma	0.45
2	5	Ratones-Testigos	4.08

Los incrementos están expresados en milésimas de pulgada.

Comparación mediante la prueba "t" de Student.

1 vs 2 : $p < 0.001$

Se transfirieron 50 millones de células de bazo a cada ratón.

' 5×10^6 células de linfoma murino L-5178-Y inoculadas por vía i.p.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

DISCUSION

Los ratones Balb-C inoculados con células del linfoma murino L-5178-Y, fueron un excelente modelo experimental -- para el estudio de la inmunosupresión celular y de los factores que participan en ella. Así mismo los resultados confirmaron que el DNFB fue un agente sensibilizante eficaz -- para los ratones Balb-C. La reacción inflamatoria fue fácilmente apreciable macroscópicamente por el enrojecimiento y el aumento de volumen de las orejas. Se confirmó, según los resultados publicados, que el incremento micrométrico -- en el grosor de las orejas se correlacionó con la intensidad de la reacción inmunitaria celular que se observó en -- los estudios histológicos. En las orejas con reacciones positivas de sensibilización al DNFB se observó el infiltrado linfocítico e histiocítico típico de las reacciones inmunitarias de hipersensibilidad celular.

La anergia observada en los ratones con linfoma murino L-5178-Y al DNFB, confirmó los resultados reportados en -- otros modelos de animales con tumor y en pacientes con cáncer (20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 37, -- 38). En este trabajo demostramos la presencia de factores solubles con actividad inmunosupresora en el suero y líquido ascítico (sobrenadante) de ratones con linfoma, y que -- al transferirse pasivamente a ratones normales suprimieron significativamente la reacción de hipersensibilidad celular al DNFB. Los factores solubles inmunosupresores del líquido ascítico solo deprimieron la reacción de hipersensibilidad al DNFB cuando se administraron en la fase de inducción inmunológica (antes y durante la sensibilización) y no en -- la fase efectora cuando ya fueron sensibilizados los ratones con DNFB.

Los resultados observados en los experimentos de transferencia celular de linfocitos y/o macrófagos de animales - tratados o no con el líquido ascítico de ratones con linfoma, indican el probable efecto inmunosupresor de macrófagos peritoneales de los ratones tratados con líquido ascítico - sobre los linfocitos de ratones no tratados, este efecto no lo mostraron los macrófagos peritoneales de animales testigos. Así mismo se observó que los linfocitos de bazo (límbres de células adherentes) de ratones tratados transfirieron una pobre respuesta al DNFB, pero al combinarse con los ratones no tratados no suprimieron la respuesta de éstos. - Por otro lado, en otro experimento demostramos la presencia de células con actividad inmunosupresora en el bazo de ratones con linfoma (80. día del crecimiento tumoral) al inhibirla respuesta al DNFB de animales normales sensibilizados -- con este agente. En nuestro laboratorio estamos investigando mediante el uso de anticuerpos específicos la estirpe -- celular de estas células supresoras en el bazo de ratones - con linfoma y las que se generan con el tratamiento del líquido ascítico del linfoma libre de células. En la literatura se ha reportado en algunos modelos de animales con tumor a los linfocitos T supresores (14, 15, 17, 18, 26, 39, - 40) como los responsables de la inmunosupresión celular, y más recientemente se han encontrado en otros modelos a los macrófagos como los responsables de dicha actividad (6, 7, - 8, 10, 41, 42). En este momento no sabemos el mecanismo -- que determina la inmunosupresión en los ratones con linfoma pero estamos investigando la naturaleza de los factores solubles inmunosupresores del líquido ascítico, mediante cromatografía de filtración (SEPHADEX) para determinar su peso molecular y otras características físico-químicas; y posteriormente investigar si son producidos por las células tumorales o por las células del sistema inmune.

La completa anergia que presentan los ratones con linfoma murino L-5178-Y, es por lo menos parcialmente debida al efecto de los factores solubles inmunosupresores que se detectaron en el suero y líquido ascítico de estos ratones, y a la presencia de células inmunosupresoras detectadas en sus bazo.

Es probable que algunos antígenos tumorales (los factores solubles?) activen a células supresoras del sistema inmune.

1950

1951

1952

1953

1954

1955

1956

1957

1958

1959

1960

1961

1962

1963

1964

1965

1966

1967

1968

1969

1970

1971

1972

1973

1974

1975

1976

1977

1978

1979

1980

1981

1982

1983

1984

1985

1986

1987

1988

1989

1990

1991

1992

1993

1994

1995

1996

1997

1998

1999

2000

2001

2002

2003

2004

2005

2006

2007

2008

2009

2010

2011

2012

2013

2014

2015

2016

2017

2018

2019

2020

2021

2022

2023

2024

2025

BIBLIOGRAFIA

1950

1951

1952

1953

1954

1955

1956

1957

1958

1959

1960

1961

1962

1963

1964

1965

1966

1967

1968

1969

1970

1971

1972

1973

1974

1975

1976

1977

1978

1979

1980

1981

1982

1983

1984

1985

1986

1987

1988

1989

1990

1991

1992

1993

1994

1995

1996

1997

1998

1999

2000

2001

2002

2003

2004

2005

2006

2007

2008

2009

2010

2011

2012

2013

2014

2015

2016

2017

2018

2019

2020

2021

2022

2023

2024

2025

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Thorn, W. G., Adams, D. R., Braunwald, E., Isseleba---
cher, J. K., Petersdorf, G. R.; Harrison's Principles
of Internal Medicine.
Edited by McGraw-Hill, Inc. 1982.
- 2.- Mihich, E.: Immunological approach to cancer therapeu-
tics. Edited by Jonh Wiley & Sons. 1982.
- 3.- Myrvil, N. O., Weiser, S. r.; Fundamentales of immuno-
logy. Edited by Lead & Febiger. 1984.
- 4.- Unanue, E. a., Benacerraf, B.: textbook of immunology
Edited by Williams & Wilkins. 1984.
- 5.- Stites, P. D., Stobo, J. D., Fundenberg, H. H., Well,-
V. J.: Basic and clinical immunology. Edited by Lange
Medical Publication. 1984.
- 6.- Plesia, O. J., Pontieri, G. M., Brown, J., Racis, S.,-
Ippoliti F., Bellelli L., Sezzi, M. L., Lipari, M., --
Amplification by macrophages of prostaglandin-mediated
immunosuppression in mice bearing syngeneic tumors. --
Prostaglandins-Leukotrienes. Med. 1984 Nov. 16 (2). --
p. 205-23
- 7.- Ye, Q. W., Mokyr, M. B., Pyle, J. M. Dray, S.: Suppre-
ssion of antitumor immunity by macrophages in spleens-
of mice bearing a large MOPC-315 tumor. Cancer.Immunol.
Immunother. 1984 16 (3). p. 162-9.

- 8.- Bluestone, J.A., López C.: Suppression of immune response in tumor-bearing mice. Induction of functionally suppressive antigen-driven macrophages. *Cancer. Invest.* 1983. 1 (1), p. 5-13.
- 9.- Anderson, S.A., Isakson, P.C., Pure, E., Muirhead, M., Uhr J. W., Vitetta, E. S.: Immunosuppression in a murine B cell leukemia (BCL-1): role of an adherent cell in the suppression of primary in vitro antibody responses. *J. Immunol.* 1981 Apr. 126 (4). p. 1603-7.
- 10.- Gabison, A., Leibovich, S.J., Goldman, R.: Contracting effects of activated and nonactivated macrophages and macrophages from tumor-bearing mice on tumor growth in vivo. *JNCI.* 1980 Nov. 65 (5). p. 913-20.
- 11.- Kirchner, H., Glaser, M. Holden, H. T., Fernbach, B. - R., Herberman, R. B.: Suppressor cells in tumor bearing mice and rats. *Biomedicine.* 1976 Dec. 15 24(6). p. 371-4.
- 12.- Fernbach, B.R., Kirchner, H., Bonnard, G. D. Herberman R. B.: Suppression of mixed lymphocyte response in mice bearing primary tumors induced by murine sarcoma virus. *Transplantation.* 1976 May. 21(5) p. 381-6.
- 13.- Gautam, S.C.: Production of immunosuppressive factor(s) by a weakly immunogenic fibrosarcoma T 241. *Anticancer. Res.* 1983 Jul.- Aug. 3(4) p. 263-8.
- 14.- Berendt, M.J., North R. J.: T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J. Exp. Med.* 1980 Jan-

1. 151(1). p. 69-80.
- 15.- Gautam, S.C., Deodhar, S.D.: Presence of suppressor -- cells in spleen of mice bearing a weakly immunogenic - syngenic tumor. Cancer. Res. 1979 Aug. 39(8). p. 2945-51.
- 16.- Barna, B.P., Deodhar, S.D.: Immunological activity of- regional Lymph nodes in tumor bearing mice. Cancer. -- Res. 1979 Jul. 39(7 pt 1). p. 2711-17.
- 17.- Schecheter, B., Feldman, M.: Suppressor cells prevent- host resistance to tumor growth. Naturwissenschaften. - 1979 Mar. 66 (3) p 140-6.
- 18.- Treves, A.J., Cohen, I.R., Feldman, M.: Suppressor fac- tor secreted by T-lymphocytes from tumor-bearing mice. J. Natle. Cancer. Inst. 1976 Aug. 57(2). p. 409-14.
- 19.- Takano, S., Umenai, T., Tanaka, K., Edo. K., Ishida, - U.: Isolation of a factor from cancer ascitic fluid -- increasing susceptibility of mice to listeria infec--- tion. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1983 Oct. 174(1). p.- 65-73.
- 20.- Jessup. J. M. Kahan, B.D., Pellis, N. R.: Mechanisms - of immunosuppression in tumor-bearing mice: a multifac- torial analysis. Cancer. 1982. Mar. 15 49 (6) p. 1158-67.
- 21.- Kumar, R.K., Lykke, A. W., Penny, R.: Immunosuppre---- sion associated with SJL/J murine Lymphoma II. - - - - Characterization of a plasma suppressor factor in tu--

mor-bearing mice, JNCI 1981 Dec. 67(6) p. 1277-82.

- 22.- Kumar, R.K., Lykke, A.W., Penny, R.: Immunosuppression associated with SJL/J murine lymphoma I. Suppression - of cell mediated immune responses after tumor trans--plantation. JNCI. 1981 Dec. 67(-) o. 1269-75.
- 23.- Katzmann, J.A.; Myeloma-induced immunosuppression: a - multistep mechanism. J. Immunol. 1978. Oct. 121(4) p.-1405-9.
- 24.- Subramanian, C., Yu, S., Mckhann, C.F.: Soluble suppre^ussor factor from the spleens of tumor-bearing mice. -- Cancer. Res. 1978 Jul. 38(7). p. 1996-2002.
- 25.- Kamo, I., Friedman, H.: Differential immunosuppressive effects of ascites fluid from mastocytoma bearing mice in primary vs secondary immunocuyte response. J. - - - Immunol. 1978 Feb. 120 (2) p. 558-62.
- 26.- McMaster, R., Buhler, K., Whitney R., Levy, J. G.: --- Immunosuppression of T-lymphocyte function by fractio-nated serum from tumor-bearing mice. J. Immunol. 1977-Jan. 118(1) p. 218-22.
- 27.- Pikovski, M.A., Ziffroni-Gallon, Y., Witz, I.P.: Suppre^ussion of immune response to sheep red blood cells in - mice treated with preparations of a tumor cell compo--nent and in tumor-bearing mice. Eur. J. Immunol. 1976. Jul. 5(7). p. 447-50.
- 28.- Grinwich, K.D., Plescia, O.J.: Tumor-mediated immunosu^uppression: prevention by inhibitors of prostaglandin -

- synthesis. Prostaglandins. 1977. 14(6). p. 1175-82.
- 29.- Kilburn, D.G. Fairhurst, M., Levy, J.C., Whitney, R. - B.: Synergism between immune complexes and serum from tumor-bearing mice in the suppression of mitogen responses. J. Immunol. 1976 Nov. 117(5 pt 1). p. 1612-7.
- 30.- Tapia, A.G., Arellano, B.G. Gómez, E.H., Fernández, Q. P. y col. : Partículas viroides tipo a y c en el linfoma murino L-5178-Y. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1976.- 7: 9-16.
- 31.- Gómez, E. H., Daneri, N. A.: Inhibición de la reacción de hipersensibilidad celular al dinitrofluorobenceno - con Peryodato de sodio. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 1983 14 p. 351-61.
- 32.- Jessup, J. M., Macek, C. M., Kahan, B. D., Pellis, N.- R.: Effect of murine tumors upon delayed hypersensitivity to dinitrochlorobencene. III. In vivo activity of the nonspecific suppressor cell. J. Immunol. 1981 - Nov. 127(5). p. 2183-7.
- 33.- Ferrante, A., Thong. Y. H.,: Amphotericin B-induced -- immunosuppression in tumor-bearing mice, Int. J. Immunopharmacol. 1979. 1(4), p. 299-301.
- 34.- Jessur, J.M. Cohen, M. H.,: Effect of murice tumors -- upon delayed hypersensitivity to dinitrochlorobencene. II. Transitory delayed hipersensitivity in tumor-bearing mice. J. Natl. Cancer. Inst. 1977 Oct. 59 (4) p. - 1221-6.

- 35.- Kamo, I., Patel, C., Kateley, I., Friedman, H.: Immunosuppression induced in vitro by mastocytoma tumor cells and cell free extracts. J. Immunol. 1975 Jun. 114(6), p. 1749-56.
- 36.- Hillinger, S. M., Herzing, G. P.: Impaired cell-mediated immunity in Hodgkin's disease mediated by suppressor lymphocytes and monocytes. J. Clin. Invest. 1977. Dec. p. 1620-7.
- 37.- Glasgow, H.A., Nimberg, R. B., Menzoian, J. O., Saporschets, I., Cooperband, S. r., Schmio, K.: Association of anergy with an immunosuppressive peptide fraction in the serum of patients with cancer. Ney England. 1972 - Dec. 12. 291(24) p. 1263-7.
- 38.- Harris, J., Copeland, D.: Impaired immunoresponsiveness in tumor patients. Annals New York Academy of Sciences. 1974. p. 57-81.
- 39.- Elgert, K. D., Farrar, W. L.: Suppressor cell activity in tumor-bearing mice. I. Dualistic inhibition by suppressor T lymphocytes and macrophages. J. Immunol. 1978 Apr. 120(4) p. 1345-53.
- 40.- Hamaoka, T., Haba, S., Takatsu, K., Kitagawa, M.: Selective inhibition of T lymphocyte repopulation of lymphoid organs a mechanism of immunosuppression in tumor-bearing mice. Int. J. Cancer 1976 Nov. 15. 18(5), p. 612-21.
- 41.- Lapis, K., Kopper, L., Timar, J., Van-Hanh, T., Hegedus V.: Effect of macrophages on the growth of syn - and -

xenogeneic tumor. Arch. Geschwulstforsch. 1981. 51(6)
p. 475-9.

- 42.- Garrigues, H. J., Romero, P., Helistrom, I., Helistrom, K. E.: Adherent cells (macrophages?) in tumor-bearing-mice suppressores MLC responses. Cell-Immunol. 1981 -- May 60(1) p. 109-18.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número 388/85

Sr. Arturo Orozco Barocio
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido--
aprobado el tema de tesis "Demostración de Fracciones solu_
bles con actividad inmunodepresora de la respuesta Inmune Ce_
lular en ratones inoculados con Linfoma Murino L-5178-Y" pa_
ra obtener la Licenciatura en Biología con Orientación en --
Biomédica.

Al mismo tiempo informa a usted que ha sido acep_
tado como Director de dicha Tesis el Dr. Adrian Daneri Nava_
rro.



FACULTAD CIENCIAS

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Julio 10. de 1985.

El Director

Ing. Edmundo Ponce Adame.

El Secretario

Arq. Mario Patricio Castillo Paredes.

c.c.p. El Dr. Adrian Daneri Navarro, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente del alumno.

'mjsd.

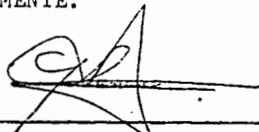
Guadalajara, Jal. a 26 de Noviembre de 1985.

ING. EDMUNDO PONCE ADAME.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.
P R E S E N T E .

Por medio de la presente doy mi aprobación para -
que la tesis titulada "DEMOSTRACION DE FRACCIONES SOLUBLES -
CON ACTIVIDAD INMUNOSUPRESORA DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR -
EN RATONES INOCULADOS CON CELULAS DEL LINFOMA MURINO L-5178-Y"
presentada por el pasante ARTURO OROZCO BAROCIO, sea impresa
y presentada a examen; pues después de haberla revisado la -
concidero apta para ello.

No teniendo otro asunto que tratar me despido de -
usted, quedando a su atenta disposición.

ATENTAMENTE.



Dr. ADRIAN DANERI NAVARRO.

DIRECTOR Y ASESOR DE LA TESIS.