

Universidad de Guadalajara

Facultad de Ciencias



« Comportamiento Inmunobiológico del Linfoma Murino
L-5178- y en Ratones Alogénicos C-57BL-6 ».

T e s i s

Que para obtener el Título de:

Licenciado en Biología

Presenta:

Suzana del Toro Arreola

**"COMPORTAMIENTO INMUNOBIOLOGICO DEL LINFOMA MURINO L-5178-Y
EN RATONES ALOGENICOS C-57BL/6"**

AUTOR DE TESIS.

Susana del Toro Arreola

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. Adrian Daneri Navarro

A DIOS: Por permitirme vivir estos momentos.

A MIS PADRES: Mi eterno agradecimiento porque con su amor y apoyo han visto realizado su esfuerzo para la culminación de mi carrera.

A MIS HERMANOS: Angélica, Celina, Lily, Miguel, Gabi y David.

AL DR. ADRIAN DANERI NAVARRO: Mi gratitud por su valiosa asesoría durante el desarrollo del presente trabajo y el invaluable apoyo en gran parte de mi desarrollo profesional.

A MIS COMPAÑEROS DEL I.P.I. y E. Agradezco la ayuda incondicional que de ellos recibí durante el desarrollo de mi tesis.

I N D I C E

| | Pág. |
|-------------------------------------|------|
| 1.- INTRODUCCION..... | 1 |
| 2.- ANTECEDENTES..... | 3 |
| 3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 9 |
| 4.- HIPOTESIS..... | 10 |
| 5.- OBJETIVOS..... | 11 |
| 6.- MATERIAL Y METODOS..... | 12 |
| 7.- RESULTADOS..... | 15 |
| 8.- DISCUSION..... | 20 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 23 |

1.- INTRODUCCION.

La propiedad más crítica del sistema inmune es discriminarlo propio de lo extraño (1). Este proceso ha alcanzado su máxima especialización en los mamíferos (2), a través del desarrollo de estructuras de membrana como anticuerpos (linfocitos B) y el receptor de linfocito T (3). Esta molécula, solamente puede reconocer al antígeno en el contexto de lo propio, donde participan los antígenos de histocompatibilidad (4), que imparten la huella propia a cada una de las células nucleadas del organismo.

Durante el crecimiento de las neoplasias se generan variantes celulares que expresan propiedades ventajosas al tumor (5). Una de las principales características que se han descrito en células de metástasis (el efecto más devastador del cáncer) es la inexpressión de las moléculas de histocompatibilidad (6).

La sublínea del linfoma murino L-5178-Y de nuestro laboratorio, se originó de una línea de tumor de origen tímico espontáneo que expresaba el haplotipo H-2^{d/d}, restringiendo su crecimiento únicamente a las cepas de ratones compatibles a este haplotipo. Sin embargo en un estudio preliminar, donde empleamos nuestra sublínea en estudios de trasplante en animales alogénicos, observamos crecimiento tumoral. El propósito de este trabajo fue confirmar este hallazgo en un número mayor de animales, las características de su creci-

miento y la respuesta de las poblaciones del sistema inmune celular y de macrófagos. En la siguiente etapa del trabajo vamos a estudiar mediante anticuerpos monoclonales la expresión de las moléculas de histocompatibilidad clase I y II; estudios de citotoxicidad y proliferación celular.

2.- ANTECEDENTES.

2.1.- Respuesta inmune.

El sistema inmune se ha dividido en innato y adaptativo. El primero actúa como la primera línea de defensa contra agentes que pueden ocasionar daños al organismo. Este sistema está representado por las barreras físicas y bioquímicas del organismo (piel, moco, cilios, acidez, secreciones sebáceas, lisozima y otros agentes químicos), fagocitos, células asesinas naturales, moléculas del complemento y factores solubles que amplifican o regulan los eventos inflamatorios (7). En contraste, el sistema adaptativo produce una reacción específica contra el antígeno que indujo la respuesta y además mantiene una memoria contra el mismo. La singularidad de la respuesta adaptativa está basada en la especificidad de los linfocitos, a través de sus receptores y productos de secreción (por ejemplo anticuerpos) (8). Estos dos sistemas funcionan in vivo en forma integrada. Los macrófagos y otras células del sistema innato, son esenciales en el transporte, procesamiento y presentación antigénica a linfocitos cooperadores (9). A su vez los anticuerpos ayudan en el reconocimiento a los fagocitos; también las linfocinas (producto de los linfocitos) activan o regulan a componentes del sistema innato (7).

La propiedad más crítica del sistema inmune es discriminarlo propio de lo extraño (1). Este proceso se ha desarrolla-

do evolutivamente desde formas primitivas (fagocitosis, encapsulación, antismas inducibles, inmunidad celular primordial) hasta alcanzar su máxima especialización en vertebrados, particularmente en mamíferos (2). Esta especializa --
 ción, se ha reflejado en el desarrollo de estructuras capa --
 ces de reconocer específicamente a los antígenos: anticuerpos secretados o de membrana (linfocitos B, mediadores de --
 la respuesta inmune humoral) y el receptor del linfocito T --
 (inmunidad celular). El receptor del linfocito T está forma --
 do por el complejo Ti/CD_3 . El heterodímero Ti (cadenas α y β --
 transmembranales) aporta la especificidad. El complejo CD_3 --
 (cinco proteínas integrales de membrana) regula el ensambla --
 je y expresión del receptor, además es responsable de las --
 señales de transducción de membrana que siguen a la unión --
 del ligando (antígeno) al Ti (3).

El receptor del linfocito T, solamente puede reconocer al --
 antígeno en el contexto de lo propio. En este evento se ne --
 cesita la identificación de moléculas denominadas antígenos --
 de histocompatibilidad (4).

2.2.- Complejo mayor de histocompatibilidad.

Los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, se --
 identificaron inicialmente por su papel en el rechazo de --
 trasplantes alogénicos y xenogénicos; sin embargo su papel --
 fundamental estriba en los fenómenos de reconocimiento e --
 interacciones inmunológicas (10).

En todos los mamíferos estudiados y recientemente en aves y anfibios, se ha descrito la existencia de los genes que codifican para los antígenos de histocompatibilidad (2). Estos genes se agrupan en el complejo mayor de histocompatibilidad de cada especie: HLA (humanos), H-2 (ratón) (11).

Uno de los complejos más estudiados es el HLA de los humanos, que se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma No.6 (4 centimorgans). Este complejo se ha clasificado en las siguientes regiones génicas: HLA-A, HLA-B, HLA-C (regiones que codifican para los antígenos de histocompatibilidad clase I); HLA-D, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ (regiones que codifican para los antígenos de histocompatibilidad clase II) y un tercer grupo de genes que codifican para los factores C2, BF, C4A y C4B del complemento (clase III) (12). El otro modelo que se ha estudiado en detalle es el H-2 de ratón, que se localiza en el cromosoma No.17. Está organizado en las regiones K, D, L, Qa, TLa, (clase I); I (clase II) y genes S que codifican para algunos factores del complemento (clase III) (13).

Los antígenos de histocompatibilidad clase I, consisten en una glucoproteína transmembranal muy polimórfica que se asocia en forma no covalente a una proteína de bajo peso molecular (B_2 microglobulina) que no está codificada en el complejo mayor de histocompatibilidad. Los antígenos clase II están formados por 2 glucoproteínas transmembranales unidas

mediante enlaces no covalentes. Las moléculas clase I se encuentran distribuidas en todas las células nucleadas y plaquetas (en el ratón también en los eritrocitos), mientras que los de clase II se encuentran restringidos a linfocitos B, macrófagos, monocitos, linfocitos T activados y algunas células epiteliales. El polimorfismo extremo que exhiben -- estas moléculas dentro de una misma especie, permite considerarlas como marcadores (huella digital) de cada individuo (14).

Los linfocitos T inductores/cooperadores CD_4^+ (humano) o $L_3T_4^+$ (ratón), solamente reconocen al antígeno presentado -- por células accesorias siempre que éstas exhiban moléculas-compatibles clase II. En contraste los linfocitos citotóxicos/supresores reconocen antígenos virales o tumorales, si las células blanco expresan antígenos clase I (15).

Los genes de histocompatibilidad se expresan en forma codominante (ambos alelos parentales). En promedio el 50% de -- los cromosomas en dos ratones hermanos son idénticos. Si -- estos animales F_1 se cruzan, existe una probabilidad de un 25% (50% x 50%) de que cualquier par particular de cromosomas de la progenie F_2 sea idéntica. Si se continúan estas -- cruza entre las mismas filiales por más de 25 generaciones, se obtienen cepas singénicas que se consideran genéticamente iguales (ejemplo BALB/c son $H-2^{d/d}$, C-57BL/6 son $H-2^{b/b}$, -- etc.). Estas cepas son importantes en el estudio de la respuesta inmune (10).

Las evidencias científicas sugieren un origen clonal en la mayoría de los tumores malignos (16). Durante el proceso de crecimiento de estas neoplasias, se generan variantes celulares que expresan propiedades ventajosas para su crecimiento y evasión al sistema inmune (5). Estas subclonas pueden presentar receptores de factores de crecimiento, secretar -- enzimas degradativas y metastatizar sin ser reconocidas por los mecanismos de defensa del organismo (17).

Se han descrito diferentes mecanismos de escape al sistema inmune, como la selección de subclonas poco inmunogénicas -- (18), inmunosupresión (19) y la inexpressión o aberración de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (20).

En un número considerable de tumores en fase de metástasis, se ha identificado la inexpressión o aberración de antígenos de histocompatibilidad clase I, en contraste con la adecuada expresión en las células del tumor primario o que no ocasionan metástasis (6). Además se ha reportado una relación inversa entre la expresión de estas moléculas en las células malignas y la resistencia a las células asesinas naturales -- (21).

Se han descrito diferentes mecanismos moleculares que participan en la inexpressión o atenuación de los antígenos de histocompatibilidad clase I: mutaciones, deleciones, recombinación, inactivación transcripcional, defectos en el procesamiento post-traducciona, pérdida de la B₂ microglobulina y

sobre todo activación o inactivación de los reguladores --
transcripcionales (20).

La sublínea del linfoma murino L-5178-Y de nuestro laboratorio, en teoría expresa el haplotipo H-2^{d/d}. Sin embargo durante un estudio donde empleamos esta línea como transplante alogénico, apreciamos su crecimiento en la cepa C-57BL/6 de haplotipo incompatible (H-2^{b/b}). En virtud de este hallazgo y del comportamiento agresivo que tiene este tumor (ocasiona la muerte del ratón singénico en un promedio de 11 -- días), se diseñó este trabajo para investigar el comportamiento del tumor en las cepas alogénicas C-57BL/6 y la respuesta inmune contra el mismo.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los linfocitos T citotóxicos reconocen los antígenos tumorales en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad-clase I. Las células tumorales que se localizan en las metástasis, frecuentemente no expresan estas moléculas y por este motivo no son reconocidas y destruidas por el sistema-inmune celular.

Desconocemos si la sublínea L-5178-Y de nuestro laboratorio expresa moléculas de histocompatibilidad clase I y el comportamiento biológico de este tumor en cepas alogénicas - - C-57BL/6.

4.- HIPOTESIS.

La sublínea del linfoma murino L-5178-Y de nuestro laboratorio no expresa moléculas de histocompatibilidad clase I, entonces luego crece y causa la muerte de ratones alogénicos como C-57BL/6 sin un reconocimiento y respuesta inmunológica de éstos.

5.- OBJETIVOS.

- 5.1.- Demostrar que la sublínea L-5178-Y crece y ocasiona - la muerte de un número significativo de ratones alogénicos C-57BL/6.
- 5.2.- Estudiar la respuesta inmune que generan los ratones- C-57BL/6 contra el tumor L-5178-Y.

6.- MATERIAL Y METODOS.

Animales de experimentación.- Los ratones C-57BL/6 y BALB/c fueron proporcionados por el Bioterio de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente (IMSS). Se mantuvieron y -- alimentaron de acuerdo a las recomendaciones generales para este tipo de estudios.

Línea tumoral.- El linfoma murino L-5178-Y teóricamente de haplotipo H-2^{d/d}, de origen espontáneo y estirpe tímica (22), fué mantenido en fase ascítica por trasplante semanal en -- ratones singénicos (BALB/c).

Medio de cultivo.- RPMI-1640 suplementado con amortiguador- Hepes 10mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, piruvato de -- sodio 1mM, L-glutamina 2mM, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M, sue -- ro fetal de ternera al 10% (todos estos componentes de GIBCO, Grand Island Co., N.Y.), bicarbonato de sodio al 0.0003% y -- antibióticos (SIGMA, Chemical, St.Louis, Mo.).

6.1.- Sobrevida de ratones C-57BL/6 inoculados con células- L-5178-Y.- Se inoculó un grupo de 20 ratones C-57BL/6 (ma -- chos de 8-12 semanas de edad) con 40×10^6 células L-5178-Y por vía intraperitoneal (I.P.) en 0.2 ml de solución balan -- ceada de Hank's. Se valoró diario el crecimiento del tumor, condiciones generales del ratón y se registró la fecha de -- la muerte de cada animal.

6.2.- Respuesta inmune en ratones C-57BL/6 inoculados con células L-5178-Y.

6.2.1.- Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T en el bazo de ratones C-57BL/6 inoculados con células de linfoma L-5178-Y.- Se inoculó un grupo de 8 ratones C-57BL/6 con 40×10^6 células L-5178-Y por vía I.P. en 0.2 ml de solución balanceada de Hank's. Se sacrificaron los ratones de este grupo (décimo cuarto día de la inoculación del tumor) y 8 ratones testigo, se obtuvo su bazo y se separaron las células mononucleares en Ficoll-Hypaque (densidad 1.087) mediante centrifugación a $400 \times G$ (26 minutos a temperatura ambiente) de acuerdo a las condiciones descritas (23). La interfase de células mononucleares se lavó en 3 ocasiones con medio RPMI-1640 y se ajustaron las células a 1×10^6 /ml. Enseguida se incubaron los paquetes celulares con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-LyT-1.2, anti-LyT-2.2 y anti-L₃T₄ (Cederlane Laboratories Limited y los anti-L₃T₄ -- del sobrenadante de cultivo de una línea de rata que tenemos en el laboratorio) durante 60 minutos a 4°C. Después de 3 lavadas con medio de cultivo, se incubaron en 1 ml de complemento de conejo al 10% (absorbido en agarosa, timo y bazo murinos) durante una hora a 37°C (24). Las células positivas se identificaron por su viabilidad con naranja de acridina (Aldrich Chemical) y bromuro de etidium (Aldrich Chemical) en una solución de una parte por millón en solución balanceada de fosfatos. La observación se realizó en -

un microscopio de epifluorescencia (Karl Zeiss, West, Germany). El índice de citotoxicidad (células positivas) se calculó con la siguiente fórmula:

$$I.C. = \frac{\%CIT(\text{Anticuerpo} + \text{Complemento}) - \%CIT(\text{Complemento})}{100\% - \%CIT(\text{Complemento})}$$

6.2.2.- Cuantificación de macrófagos esplénicos.- Los macrófagos esplénicos se identificaron mediante la tinción de esterasa inespecífica, de acuerdo al método de Koski (25) que consistió en la preparación de frotis delgados (de las suspensiones del bazo), su fijación en formaldehído/acetona e incubación en una solución de alfa-naftil-acetato en buffer de sorensen (durante 45 minutos a 37⁰C), finalmente se contrastaron con verde de metilo al 0.5%.

Análisis estadístico.- Los datos de las subpoblaciones de linfocitos T y macrófagos de los grupos de ratones testigo y con tumor alogénico, se compararon por las pruebas de T de Student y U de Mann Whitney.

7.- RESULTADOS.

7.1.- Sobrevida de ratones C-57BL/6 inoculados con células del linfoma murino L-5178-Y. En acuerdo con lo observado en los experimentos preliminares, las células del linfoma murino L-5178-Y crecieron en los 20 animales inoculados. El tumor se apreció a partir del noveno día en 4 ratones (20%), de los cuales 2 murieron al décimo segundo día de la inoculación. La mayoría de los animales murieron del décimo tercer día al vigésimo noveno (75%) en malas condiciones generales. Según se aprecia en la figura No.1, del día 30 al 55 murió únicamente un ratón y el resto (20%) del día 56 al 68, en particular los últimos cuatro días (15%). En la necropsia de los animales se observó depósitos grandes de tumor sólido sobre mesenterio y bazo, sin embargo en todos los casos hubo un predominio de crecimiento en fase ascítica.

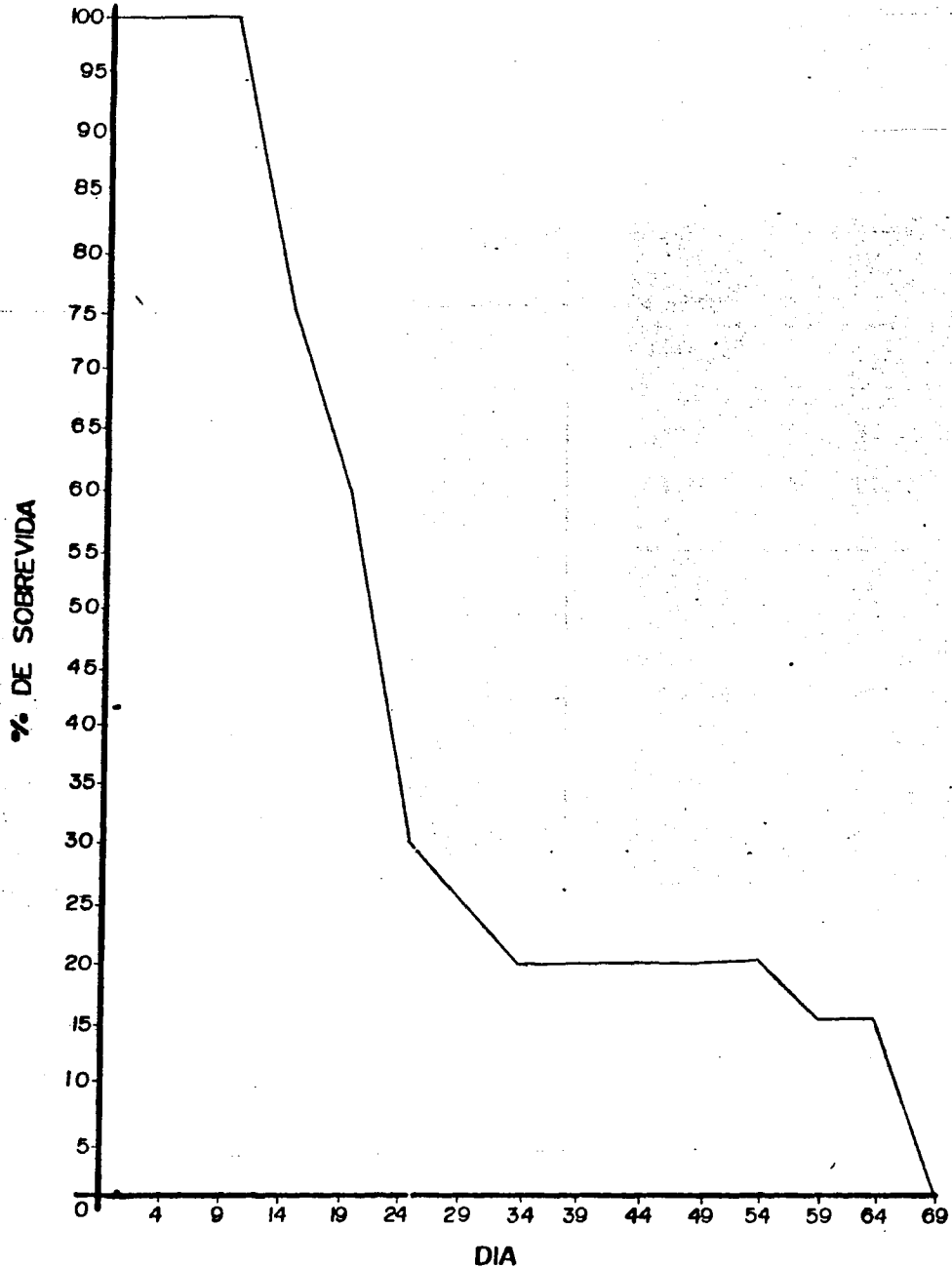
7.2.- Características del crecimiento tumoral.- En el grupo de ratones C-57BL/6 sacrificados el décimo cuarto día de la inoculación de 40×10^6 células L-5178-Y por vía I.P. se observó un promedio de $254.4 \times 10^6 \pm 99.5$ células tumorales en la cavidad peritoneal. En la mayoría de los animales se observó depósitos de tumor sólido sembrados superficialmente en mesenterio; en todos predominó la fase ascítica observándose en mayor cantidad las formas tumorales; menos del 5% de las células correspondió a leucocitos infiltrantes -- (predominando polimorfonucleares neutrófilos).

7.3.- Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T en el bazo de ratones C-57BL/6 inoculados con células del linfoma L-5178-Y.- No se observó una diferencia significativa en el número de esplenocitos totales de los ratones con tumor ($99.38 \times 10^6 \pm 48.49 \times 10^6$) respecto a los testigos sin tumor ($102.65 \times 10^6 \pm 35.05 \times 10^6$).

En relación a las subpoblaciones de linfocitos T, los ratones con tumor mostraron una disminución de las células LyT-1.2 y LyT-2.2 ($p < 0.015$ y 0.036 respectivamente) al compararlos con los testigos (Cuadro I). No se observó una diferencia significativa en las células L_3T_4 entre ambos grupos.

7.4.- Cuantificación de macrófagos esplénicos en ratones C-57BL/6 inoculados con células del linfoma L-5178-Y.- El número de macrófagos (positivos a la esterasa inespecífica) en el bazo de ratones con linfoma L-5178-Y, fue un poco mayor al doble del observado en testigos sin tumor (Cuadro II) con una $p < 0.014$. No se observaron diferencias en las características tintoriales, tamaño o morfología de las células positivas de ambos grupos.

SOBREVIVENCIA DE RATONES C-57BL/6 INOCULADOS CON
 40×10^6 CELULAS ALOGENICAS L-5178 - Y.



CUADRO I.- SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T DEL BAZO
 DE RATONES C-57BL/6 INOCULADOS O NO CON
 CELULAS L-5178-Y.

| GRUPO | \bar{X} DE CELULAS \pm S $\times 10^6$ / BAZO | | |
|--------|---|----------------------|--|
| | LyT-1.2 ⁺ | LyT-2.2 ⁺ | L ₃ T ₄ ⁺ |
| NORMAL | 12.27 \pm 4.71 | 10.72 \pm 5.82* | 31.62 \pm 21.95 |
| TUMOR | 5.40 \pm 5.03** | 4.37 \pm 4.17* | 24.13 \pm 12.35 |

n : 8

P.t S. : p < 0.05 p < 0.05 N.S.

P.U M.W. : p= 0.015 p= 0.036 N.S.

* n : 7

** n : 6

CUADRO II.- CUANTIFICACION DE MACROFAGOS ESPLENICOS DE RATONES C-57BL/6 INOCULADOS O NO CON CELULAS L-5178-Y.

| GRUPO | n | \bar{X} DE CELULAS ESTERASA POSITIVAS \pm S x 10 ⁶ /BAZO |
|--------|---|---|
| NORMAL | 4 | 2.88 \pm 1.23 |
| TUMOR | 4 | 6.68 \pm 2.05 |

P. t S.: p < 0.02

P.U M.W.: p = 0.014

8.- DISCUSION.

En este estudio se demostró el crecimiento del linfoma murino L-5178-Y de haplotipo original H-2^{d/d} en ratones incompatibles C-57BL/6 H-2^{h/b}. El tumor se desarrolló en todos los animales C-57BL/6 inoculados con 40×10^6 células del linfoma. Este hallazgo sugiere que la sublínea L-5178-Y de nuestro laboratorio no expresa moléculas de histocompatibilidad. La confirmación de esta hipótesis requiere la búsqueda de estas moléculas mediante anticuerpos monoclonales en la superficie de membrana de las células tumorales, estudios del ARN mensajero y ADN que codifican para ellas. La implicación se basa en que normalmente las células o tejidos de diferente haplotipo de histocompatibilidad (como en este caso) son reconocidos como extraños y rechazados mediante mecanismos que involucran linfocitos T citotóxicos e inductores/cooperadores, células accesorias y en menor grado anticuerpos (fijación del complemento y citotoxicidad celular mediada por anticuerpos) (26).

Se ha descrito en la literatura que la inexpressión de las moléculas de histocompatibilidad clase I, es uno de los principales mecanismos mediante los cuales los tumores evaden al sistema inmune (20). A este respecto se ha reportado que la expresión relativa H-2K en relación a H-2D es importante en el reconocimiento celular. Se ha señalado que las clonas que no presentan H-2K (en densidad baja), con expresión H-2D (densidad alta) son más metastásicas y no son reconocidas por el

sistema inmune (27). Las evidencias experimentales apoyan la regulación de H-2K por el oncogen fos (6).

En relación a las células del sistema inmune celular y macrófagos esplénicos de ratones C-57BL/6 inóculados con el tumor "alógeno". se observó un incremento significativo de macrófagos al compararlos con los testigos sin tumor. Este incremento también se observa en el modelo singénico de ratones BALB/c con el mismo tumor; aparentemente estos macrófagos presentan en el modelo del BALB/c, actividad inmunosupresora y son sensibles a 180 mgs/kg de peso de ciclofosfámido en dosis única (28). También se apreció una disminución significativa en las subpoblaciones LyT-1.2 y LyT-2.2. Este fenómeno también se aprecia en el modelo BALB/c, aunque en este último el decremento de estas células es más marcado (28). En las subpoblaciones de linfocitos inductores/cooperadores (L_3T_4) no se observó ninguna diferencia significativa entre los ratones C-57BL/c con tumor o sin él.

El promedio de sobrevivencia de ratones BALB/c inóculados con la misma dosis de células L-5178-Y fué de 11.2 ± 2.1 , mientras que en el modelo estudiado fue de $\bar{X} = 27.75 \pm 19.11$ el crecimiento en ambos es en forma ascítica, aunque con mayor tendencia de formar depósitos sólidos en C-57BL/6.

En conjunto los resultados sugieren que la sublínea L-5178-Y de nuestro laboratorio crece en los ratones alógenos --

C-57BL/6 en forma similar (aunque con mayor sobrevida) al modelo singénico. También el tipo de respuesta del aparato inmune es parecido en ambos sistemas.

El demostrar que nuestra sublínea L-5178-Y, no expresa moléculas de histocompatibilidad, la convierte en un instrumento útil para el estudio de mecanismos de regulación de esta molécula, inmunología de los tumores y agentes que pueden inducir estas glucoproteínas a nivel de membranas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Janeway, Ch.: Immunogenicity Signal 1,2,3... and 0. - Immunol. Today. 1989; 10:283-286.
- 2.- Reinisch, C., L.; Litman, G.,W.: Evolutionary immunobiology. Immunol. Today. 1989; 10:278-281.
- 3.- Lydyard, P.,M.: Immune response, overview current opinion in immunology. 1988/1989; 1:1201-1202.
- 4.- Doherty, P., C.; Kowles, B., B.; Wetistenin, P., J.: Immunological surveillance of tumors in the context of major histocompatibility restriction of T cell function. Adv. Cancer Res. 1984; 42-1.
- 5.- Nicholson, G., L.; Fidler, I., J.: Diversification -- and heterogeneity of metastatic neoplasms. Cancer -- Bull. 1987; 39:186-192.
- 6.- Esenbach, L.; Kushtai, G.; Plaksin, D.; Feldman, M.: MHC Genes and oncogenes controlling the metastatic phenotype of tumor cells. Can. Rev. 1986; 5:1-18.
- 7.- Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D.; Adaptative and innate immunity. En: Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D. eds. Immunology. St. Louis Mo. The C.V. Mosby Company. 1986; 1.1-1.10.
- 8.- Grossi, C., E.: Lymphoid tissues. Current opinion in immunology. 1988/1989. 1:210-212.
- 9.- Katz, D., R.: Antigen presentation, antigen-presenting cells and antigen processing. Current opinion in immunology. 1988/1989; 1:213-219.
- 10.- Crumpton, M.: Major histocompatibility complex. En: -- Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D. eds. Immunology. St. Louis Mo. The C.V. Mosby Company 1986; 4.1-4.12.
- 11.- Ploegh, H.,L.; Orr, H., T.; Strominger, J., L.: Major-histocompatibility antigens: The human (HLA-A-B-C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules cell. 1981; 24:-287.
- 12.- HLA-Nomenclature Committee: Nomenclature for factors of the HLA system. Hum. Immunol. 1984; 11:117.
- 13.- Hood, L.; Steinmetz, M.; Malissen, B.; Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. Annu. Rev. Immunol. 1983; 1:529-568.

- 14.- Schwarts, B., D.: The human major histocompatibility - HLA complex. En: Stites, D.,P.; Stobo, J.,Logy. - - Norwalk, Connecticut. Appleton and Lange. 1987; 50-64.
- 15.- Bolhuis, R., L., H.; Braakman, E.: Lymphocyte mediated responses: Activation of, and lysis by, cytotoxic -- lymphocytes. Current opinion in immunology. 1988/1989; 1:236-240.
- 16.- Falkow, P., J.: Clonal origin of human tumors. Ann Rev. Med. 1979; 30:135-176.
- 17.- Heppner, G.: Tumor heterogeneity. Cancer. 1984;214:2259.
- 18.- Irimura, T.; Reading, Ch., L.: Surface properties of - metastatic tumor cells. Cancer Bull. 1987.39:132-141.
- 19.- Berendt, J., J., North, R., J.: T cell mediated suppression of antitumor immunity. J. Exp. Med.1980;151:69-86.
- 20.- Goodenow, R., S.; y col.: Histocompatibility antigens - on murine tumors. Science. 1985;230:777-783.
- 21.- Sturmhölzel, K.; Hämmerling, G., J.: Correlation between H-2-class-I antigen-expression and susceptibility to - natural killer (N.K.) cells. Immunobiology. 1988;178:- 131.
- 22.- Greenberg, A., J.; Manougian, J.; Manoranjan, R.; Goldenberg, G., J.: Cytogenetic analysis of an immunogenic mutant of the L-5178-Y lymphoma. Acta Cytologica 24: - 236, 1980.
- 23.- Winchester, R., J.; Ross, G., D.: Methods for enumerating cell population by surface markers with conventional microscopy. En Rose, N., R.; Friedman, H.; Fahey, J., L.; eds. Manual of clinical laboratory immunology, Washington, D.C., American Society for Microbiology. - 1986; pages. 212-225.
- 24.- Raulet, D., H.; Gottlieb, P., D.; Bevan, M., J.: Fractionation of lymphocyte populations, with monoclonal - antibodies sepcific for LyT-2.2 and LyT-3.1 J. Immunol. 1980; 545-555.
- 25.- Koski, I., R.; Poplak, D., G.; Blease, R., M.: A non - specific esterase stain for the identification of monocytes and macrophages. En: Bloom, B., R.; David, J., R., eds. In vitro methods in cell mediated and tumor immunity. New York, Academic. Press. 1976;359-362.

- 26.- Hall., B., M.; Dorsh, S., E.: Cells mediating allogram rejection. Immunol. Rev. 1984;77:31.
- 27.- Feldman, M.; Eisenbach, L.: What makes a tumor cell - - metastatic ?. Scientific American. 1988/Nov. 60-85.
- 28.- Daneri, A., N., del Toro A.,A.; Garcia, J., V.; Fafutis M.,M.; Islas, A., R.: Sinergismo antitumoral de lincinas y dosis única de ciclofosfamida en ratones con - linfoma murino.Rev. Inc. 1990; 36(en Prensa).

A B R E V I A T U R A S

I.P. : Intraperitoneal

n : Número de animales

\bar{X} : Promedio

S : Desviación estandar

P. t S. : Prueba de t de Student

P. U M.W.: Prueba de U de Mann Whitney

N.S. : No significativo

Guadalajara, Jal., Marzo 12 de 1990.


C. ING. ADOLFO ESPINOSA DE LOS MONTEROS CARDENAS
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 "COMPORTAMIENTO INMUNOBIOLOGICO DEL-LINFOMA MURINO L-5178-Y EN RATONES ALOGENICOS C-57BL/6", desarrollada por la C. Pasante de Licenciado en Biología SUSANA DEL TORO ARREOLA.

Se extiende la presente a petición de la interesada y para los fines legales que a ella convengan el día doce de marzo de 1990.

A T E N T A M E N T E


M.en C. ADRIAN DANERI NAVARRO
DIRECTOR DE TESIS

C.c.p. La C. Pasante de Lic.en Biología Susana del Toro Arreola para su conocimiento.- Presente.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

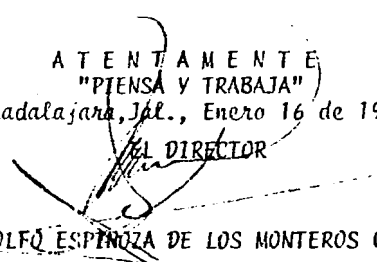
Sección
Expediente
Número 0047/90

SRITA. SUSANA DEL TORO ARREOLA
P R E S E N T E . -

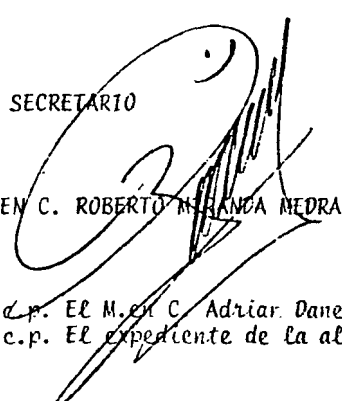
Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el -
tema de Tesis "COMPORTAMIENTO INMUNOBIOLOGICO DEL LINFOMA MURINO L-5178-Y
EN RATONES ALOGENICOS C-57 BL/6" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptado co-
mo Director de dicha Tesis al M.en C. Adrian Daneri Navarro.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Enero 16 de 1990
EL DIRECTOR


ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

EL SECRETARIO


M. EN C. ROBERTO M. HUANCA MEDRANO

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

'mjsd