

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



CINETICA Y CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DEL
LINFOMA MURINO L-5178-Y EN RATONES BALB-C

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LIC. EN BIOLOGIA

PRESENTA

JUAN CARLOS GARCIA VELAZCO

GUADALAJARA, JAL., 1988

CINETICA Y CARACTERIZACION INMUNOLOGICA
DEL LINFOMA MURINO L5178-Y EN RATONES BALB-C

AUTOR DE TESIS:

Juan Carlos Garcia Velasco

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Adrian Daneri Navarro

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS.

A MIS PADRES: Por sus consejos y
dedicación que supieron
brindarme en todo momento.

A MIS MAESTROS: Por los conocimientos
que supieron transmitirme.

A NENA: Por la forma en que
ha sabido apoyarme.

A MI HIJA: Por el aliciente
de su existencia.

EN FORMA MUY ESPECIAL: Al Dr. Adrian Daneri Navarro
por la inmerecida ayuda que de
él obtuve.

I N D I C E

	Pág.
1.- INTRODUCCION	1
2.- ANTECEDENTES	2
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROGRAMA	6
4.- OBJETIVOS	7
5.- MATERIAL Y METODOS	8
6.- RESULTADOS	11
7.- DISCUSION	18
8.- BIBLIOGRAFIA	20

1.- INTRODUCCION.

El avance tecnologico en el campo de la genética molecular, bioquímica e inmunológica, ha permitido comprender mejor las bases del cancer; que se confunden con los mismos procesos que suceden a las células normales pero en forma coordinada.

Los modelos experimentales de tumores, han desempeñado un papel fundamental en este desarrollo impresionante; sobre todo en la interacción de las células malignas con el "huesped". A este respecto es imprescindible conocer detalladamente las características fenotípicas y funcionales de las líneas experimentales que se emplean en el estudio de los tumores.

Otro aspecto primordial del estudio del cancer, es la respuesta que genera el organismo contra las neoplasias malignas, principalmente en el propio sitio donde crece el tumor. Así el número y el tipo de células del sistema inmune que infiltran la masa tumoral, son determinantes en el destino final de las células cancerosas.

En este trabajo se estudió la cinética de crecimiento del linfoma murino L5178-Y en ratones Balb-c previamente inoculados con este tumor; también se determinó el fenotipo inmunológico de esta línea y su crecimiento en cepas alogénicas. Finalmente se investigó las subpoblaciones del sistema inmune (y su número) que "infiltran" el sitio donde crece el tumor.

2.- ANTECEDENTES.

2.1 Conceptos Oncológicos.

Las células normales de un organismo contienen la misma información genética y poseen una capacidad variable de proliferación, diferenciación, desdiferenciación, autonomía y migración celular, que se transmiten en el momento y estirpes apropiadas (1). En contraste a este crecimiento controlado, las células cancerosas no obedecen a los mensajes de regulación de estos eventos y transmiten a su progenie el fenotipo neoplásico, observación que sugiere la presencia de genes específicos que determinan malignidad (2).

El descubrimiento de los oncógenes en el genoma de retrovirus y de células normales (proto-oncógenes), ha contribuido al esclarecimiento de los procesos carcinogénicos (3, 4, 5).

Las evidencias señalan un origen clonal en la mayoría de los tumores sólidos y hematopoyéticos (6, 7) y, durante la progresión tumoral se producen alteraciones heredables que al acumularse se traducen en sub-clonas con propiedades diferentes de invasión, quimiosensibilidad, antigenicidad y cambios en el cariotipo (8, 9, 36), que explican la heterogeneidad celular que se observa en los tumores avanzados. Esta variabilidad celular se correlaciona con un aumento en la autonomía, anaplasia y comportamiento agresivo (10).

El efecto más devastador del cáncer, son las metástasis, que se correlacionan con la capacidad de las células malignas de secretar enzimas degradativas como la catepsina B, colagenasa, activadores de plasminógenos y digestivas del heparán sulfato (11, 13, 34, 35); secreción de factores angiogénicos y la expresión de moléculas mediadoras de la adhesión celular (11, 12, 13, 14, 15, 16).

Una vez alcanzadas la circulación sanguínea o linfática, las células tumorales deben sobrevivir el trauma mecánico y el ataque-

de los sistemas específicos e inespecíficos del aparato inmune. La implantación de las células malignas en un tejido u órgano - particular se efectúa mediante la acción de enzimas degradati - vas; moléculas de adhesión y la expresión de receptores obliga - dos (hormonas, factores de crecimiento y de diferenciación, en - tre otros), en el microambiente tisular (17, 18, 36, 37, 38).

Durante la progresión y cinética del crecimiento tumoral, se - observa un retardo exponencial del crecimiento y duplicación -- del tumor a medida que aumenta su masa, por la influencia del - tiempo del ciclo celular, fracción en división y la proporción - de células eliminadas.

2.2. INMUNOLOGIA DEL CANCER.

La inmunología tumoral estudia las propiedades antigénicas de - las células malignas, alteraciones y mecanismos inmunológicos - que éstos inducen en el huésped y, finalmente el desarrollo de - estrategias del sistema inmune con fines terapéuticos contra -- los tumores.

2.3 ANTIGENOS TUMORALES.

El principio fundamental de la inmunología del cáncer, se basa - en la expresión de antígenos tumorales que permiten al sistema - inmune discriminar las células malignas de las normales. Estos - antígenos son del reflejo de alteraciones heredables que acompa ñan a la transformación maligna y que pueden involucrar la bio - síntesis de una molécula nueva, alteración en la estructura de una normal, exposición de conformaciones ocultas, ensamble inco rrecto de moléculas multiméricas y la expresión aberrante de - antígenos fetales o de diferenciación celular.

Los antígenos tumorales se clasifican en específicos de los tu - mores que exclusivamente se encuentran en células malignas y -- los asociados a los mismos, que se pueden localizar además en -

tejidos normales durante etapas particulares de su diferenciación (19). A este respecto, los linfomas malignos representan un modelo instructivo, ya que reflejan el espectro y la heterogeneidad anatómica y funcional del sistema inmunológico.

Así en los linfomas y leucemias de estirpe B ó T, frecuentemente se conservan las características morfológicas, funcionales, migratorias y fenotípicas de su contraparte en los linfocitos normales de acuerdo a su grado de diferenciación (20).

2.4 MECANISMOS EFECTORES INMUNOLOGICOS CONTRA LAS CELULAS MALIGNAS.

Virtualmente, todos los componentes del sistema inmune han mostrado una mayor o menor capacidad de contribuir a la erradicación de las células cancerosas (21). Los sistemas efectores específicos parecen ser los más importantes contra los tumores inmunogénicos, mientras que los inespecíficos son relevantes en los menos inmunogénicos (22, 23).

Los linfocitos derivados del Timo (Linfocitos T), representan el mecanismo principal de respuesta específica, a través de las subpoblaciones/cooperadoras (L3T4+ , LyT 1+ en el ratón; CD4 + en el hombre), y las citotóxicas (LyT 2.3+ en el ratón; CD8+ en el hombre, que desempeñan su función al lesionar la membrana de las células tumorales (24).

Se desconoce la significancia de los anticuerpos en el control del crecimiento del cáncer, sin embargo, evidencias experimentales apoyan su papel en la interferencia de metástasis (25). Las inmunoglobulinas, teóricamente, pueden lisar a las células malignas mediante la fijación de complemento o por citotoxicidad celular, mediada por anticuerpos (25).

La respuesta inmune inespecífica contra los tumores, la efectúan las células asesinas naturales, macrófagos activados y linfoci-

tos activados, linfocinas (26, 27, 28), que tienen la capacidad de aniquilar una amplia variedad de células malignas.

2.5 LINFOMA MURINO L5178-Y.

El linfoma murino L5178-Y es una línea tumoral de origen espontáneo y estirpe tímica que se ha mantenido por trasplante semanal en ratones con haplotipo H-2^{d/d}. La inestabilidad genética de las células malignas y los procesos de selección que suceden durante el desarrollo de los tumores, inducen variantes a partir de la clona original. Así se han reportado sub-clonas del linfoma murino L5178-Y que presentan un espectro heterogéneo en antigenicidad, sensibilidad a drogas, marcadores cromosómicos y expresión de antígenos de histocompatibilidad. (29,30, 31, 32, 33, 51).

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los modelos experimentales de ratones con tumor, se emplean frecuentemente en la investigación del cáncer. La línea de origen espontáneo como el linfoma murino L5178-Y, ofrecen un sistema de estudio más parecido a las neoplasias humanas.

El conocimiento de la cinética de crecimiento y expresión de marcadores como el THy-1.1, LyT-1.2 t LyT-2, son importantes en el análisis de la interacción de este linfoma con el sistema inmune del huésped.

4.- OBJETIVOS.

- 1.- Expresar matemáticamente la cinética de crecimiento del linfoma murino L5178-Y.
- 2.- Determinar el fenotipo inmunológico del linfoma murino.
- 3.- Estudiar las poblaciones celulares del sistema inmune - que infiltran el tumor de los diferentes días de su evolución.
- 4.- Investigar si el linfoma murino L5178-Y se desarrolla - en cepas alogénicas o cepas con diferente haplotipo del CMH.

5.- MATERIAL Y METODOS.

Animales de experimentación:

- Ratones hembras de la cepa Balb-c de 3 meses de edad y 23 a 25 gramos de peso, alojados en grupos de 10, en jaulas de poli - propileno con camas de aserrín estéril, a los que les fue proporcionado alimento comercial para roedores (Purina, México) - y agua purificada para consumo voluntario, localizados en habitaciones a temperatura constante de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Línea Tumoral.

- Linfoma Murino L5178-Y de origen tífico, mantenido por transplante semanal en ratones Balb-c inoculados por vfa intraperitoneal con 5×10^6 células de este tumor.

Medio de Cultivo.

- RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island Biologied Co.) suplementado con 10 mM de Hepes, .1 mM de aminoácidos no esenciales, bicarbonato de sodio y albúmina bovina al .3%.

Anticuerpos.

- Anticuerpos monoclonales anti-THY-1.2, Anti-LYT-1.2, anti-LYT 2.2 (Cederlane Laboratories Limited). Anticuerpos de cabra, anti-inmunoglobulinas de ratón (IgG_1 , IgG_{2a} , IgG_3 , IgM) marcadores con isotiocianato de fluoresceína (GAM-Fict) a una proporción molar f/p = 3.0-4.5 (Coulter Clone).

5.1 Cinética del crecimiento del Linfoma Murino L-5178-Y en ratones de la Cepa Balb-c.

Se inocularon 45 ratones hembras Balb-c con 5×10^6 células de linfoma murino L-5178-Y por vfa I.P., y fueron sacrificados en grupos de 5 animales del 5to. al 13vo. día después del inóculo,-

para cuantificar el número de células tumorales que crecieron - en la cavidad peritoneal (volumen del líquido ascítico y el número de células por ml).

5.2 y 5.3 Determinación del fenotipo de marcadores inmunológicos del linfoma murino L-5178-Y y de las células del sistema - inmune.

Se inocularon 20 ratones machos Balb-c con 5×10^6 células de - este linfoma por vfa I.P. y se obtuvo una alícuota de 0.5 ml. - de líquido de ascitis de cada uno, los días 5to., 7o., 9o., y 11o. (grupos de 5 ratones) posteriores a la inyección del tumor. Se separaron las células mediante centrifugación a $800 \times G$ durante 10' y se lavaron en 3 ocasiones en medio de cultivo a $4^\circ C$. Se - ajustó 1×10^6 células en un mililitro de solución balanceada - de fofstafos ph 7.2 (s.b.f.) y se incubaron en un volumen final - de 2 ml. 30' a $4^\circ C$ con los siguientes anticuerpos monoclonales: Anti-Thy-1.2 (1:40); anti-LyT-1.2 (1:1000); anti-LyT-2.2 (1:40) que reconocen respectivamente a marcadores de linfocitos-T, - subpoblación de inductores-cooperadores y citotóxico-supresores. Se centrifugaron y lavaron los paquetes celulares tres veces -- más en SBF ($800 \times G$, 10' y $4^\circ C$) para incubar con el segundo anticuerpo marcado con fluoresceína (GAM-Fict) a $4^\circ C$ en 0.4 ml. - otros 30'. Enseguida se lavaron 3 veces de la misma manera y se observaron al microscopio de epifluorescencia en forma paralela se correlacionó la morfología (en campo claro) de cada célula - fluorescente para determinar su origen tumoral o reactivo.

Los linfocitos-B se cuantificaron a partir de alícuotas similares, pero en este caso se incubaron las células únicamente con el segundo anticuerpo GAM-Fict.

Los macrófagos presentes en el líquido de ascitis, se determina - ron mediante una tinción de esterasa inespecífica, de acuerdo - al método de Koski (52), que consistió en la preparación de - frotis delgados (del líquido de ascitis) fijados en formaldehí - do/acetona e incubados en una solución de alfa-naftil-acetato -

- en Buffer de Sorenson (durante 45 minutos a 37°C) y contrastados con verde de metilo al 0.5%.

5.4 Crecimiento del Linfoma Murino L-5178-Y en cepas con diferente haplotipo del CMH.

Se inocularon 10 ratones de la cepa C57BL-6 (haplotipo H-2^{b/b}) con 5×10^6 células del linfoma murino L-5178-Y por vía I.P. en 0.2 ml. de solución balanceada de Hanks y se observaron cada día, durante tres meses para apreciar el crecimiento del tumor y su sobrevida.

5.5 Análisis Estadístico.

La curva de crecimiento del tumor se sometió a un coeficiente de correlación y regresión en función lineal, log. (x) y Log. (y) mientras que las células "infiltrantes" (del sistema inmune) en el sitio de crecimiento del tumor, se analizaron de acuerdo a las pruebas de varianza paramétrico y no paramétrico; prueba T. de Student y la U. de Mann Whitney.

6.- RESULTADOS.

6.1 Cinética del crecimiento del Linfoma Murino L 5178-Y en ratones de la cepa Balb-c.

La cinética de crecimiento del tumor, se ajustó a una función logarítmica (x) con un coeficiente de correlación = 0.9563 expresada en la ecuación $y = 1750.98315 [\log.(x)] - 111.227798$. En la figura 1, se observó un incremento logarítmico en la primera etapa (hasta el 7mo. día), mientras que en la segunda etapa se apreció una disminución del ritmo de crecimiento a medida que se aumenta la masa tumoral.

6.2 Fenotipo Inmunológico del Linfoma Murino L 5178-Y.

Las células del linfoma murino L 5178-Y (tamaño a 20 μ m. de diámetro; núcleo grande y cromatina laxa; nucleolos prominentes y citoplasma sumamente basófilo) expresaron el marcador Thy.1.2. Este rasgo no se modificó durante el crecimiento del tumor de la cavidad peritoneal de los ratones receptores. Ninguna de estas células fue positiva a los antígenos LyT 1.2 o LyT 2.2 en el transcurso de la evolución del linfoma en el líquido de ascitis de estos animales.

6.3 Fenotipo inmunológico de las células del sistema inmune en el líquido de ascitis de ratones con linfoma.

La fracción de células del sistema inmune en el líquido de ascitis de ratones con linfoma, fluctúa entre el 6.28% (5to. día); 3.5% (7mo. día); 4.8% (9no.) y se incrementó hasta 15.4% de la población total (células del linfoma más "infiltrantes") en el 11vo. día de la inoculación del tumor (figura 3).

El porcentaje de linfocitos B (del total de células "infiltrantes") se mantuvo alto desde el 5to. día (23.35%); 7mo. (18.67%)

y se incrementó a partir del 9no. (30.4%) alcanzando el máximo el día 11 (49%). Los macrófagos representaron el 38.62% (5to.- día); 59.7% 7mo.día (nivel más alto) y disminuyen a 41.3% y - 31.52% los días 9 y 11 respectivamente (figura 3).

La población de linfocitos LyT 1.2⁺ no se modificó porcentualmente durante la evolución del tumor, a excepción del 7mo. día (disminución a 7.42%) y se mantuvo entre el 20% (día 5to.) y - 16% (día 11), mientras que en los LyT 2.3⁺ se observó una gradual disminución desde 18% (5to.); 14.14% (7mo.); 11.1%(9no.), hasta el 3.4% (11vo. día).

En relación al número de células del sistema inmune (porcentaje multiplicado por el número de células por ml. y por el número de mls.); se observó un incremento progresivo de linfocitos B y macrófagos, sobre todo a partir del 9no. día en el caso de los primeros y del 7mo. en los segundos (cuadro No.1 y - fig.2; la significancia reportada en el cuadro No.1 corresponde a la T. de Student, siendo similar a la obtenida por la U.- de Mann Whitney). El nivel máximo de ambas poblaciones fue en el 11vo. día. En cambio las subpoblaciones de linfocitos, no - se modificaron significativamente durante el crecimiento del - tumor.

6.4 Después de un período de latencia próximo a los 2 meses de la inoculación, se apreció en los ratones de la cepa - - - C57 BL-6 (Haplotipo H-2 ^{b/b}) un incremento continuado del volumen abdominal y deterioro progresivo de su estado general. Se observó en promedio una sobrevida 68[±]17 días; y al practicar la autopsia se encontró evidencias de tumor en fase ascítica, - que se corroboró mediante examen microscópico del contenido - - peritoneal. El crecimiento del linfoma se limitó a la cavidad - intra-peritoneal y el número de células cuantificadas fue simi - lar a la de ratones Balb-c inoculados con este tumor (post-mor - tem)

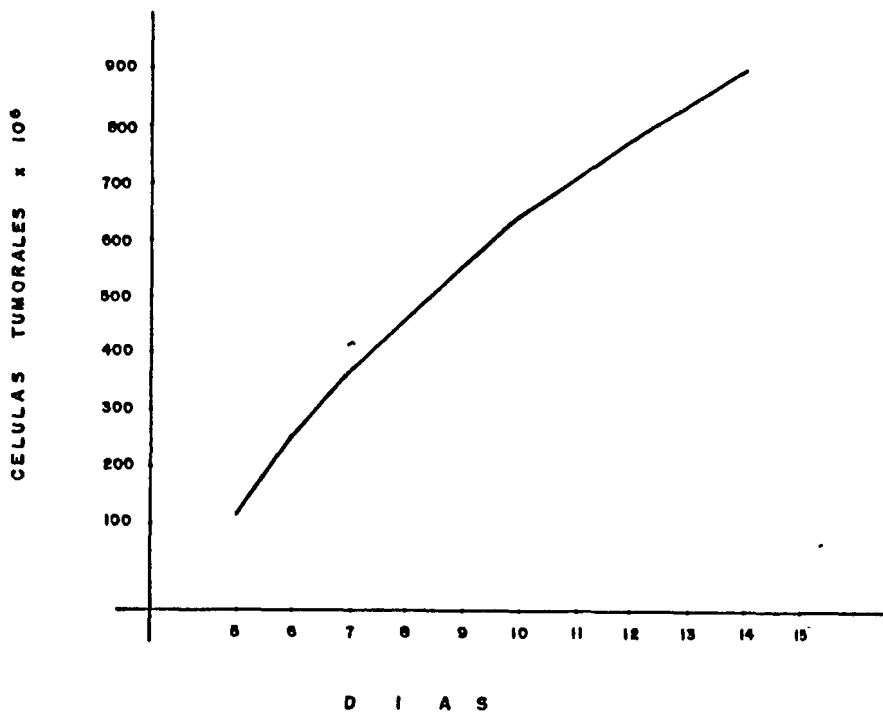


FIG 1: CINETICA DE CRECIMIENTO DE LINFOMA MURINO L 5178 - Y
EN RATONES BALB - C

$$Y = 1750.98318 (\text{LOG}(x)) - 1110.22798 \text{ (FUNCION LOGARITMICA).}$$

$$r = 0.9863 \text{ (COEFICIENTE DE CORRELACION)}$$

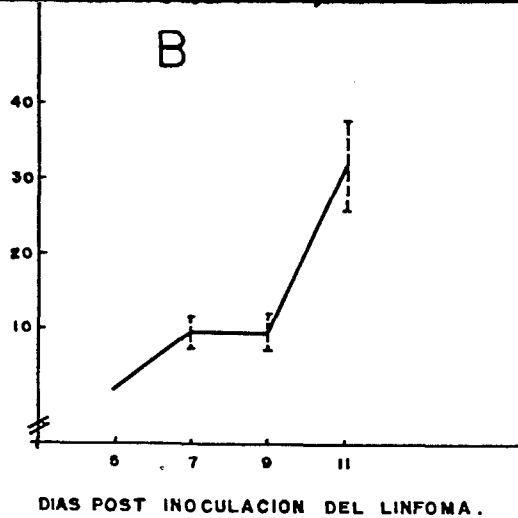
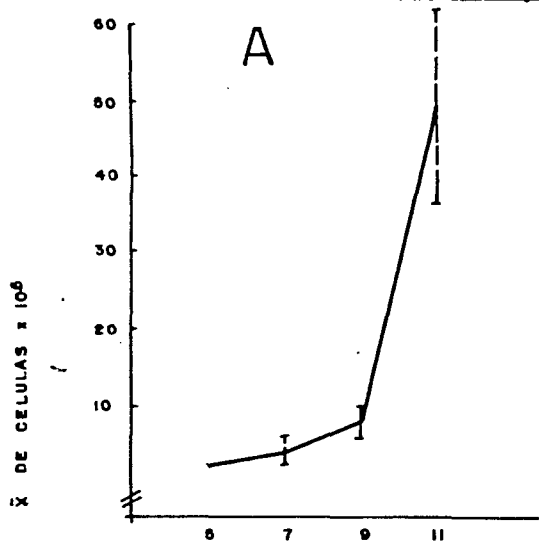
C U A D R O No. 1

CELULAS DEL SISTEMA INMUNE EN EL LIQUIDO DE ASCITIS DE RATONES CON LINFOMA MURINO L5178-Y

* DIAS POST-INOCULACION	X DE LINFOCITOS B	X DE LYT 1.2	X DE LYT 2.3	ESTERASAS POSITIVAS
5	1.148 ± 0.362	0.984 ± 1.407	0.885 ± 1.237	1.889 ± 0.344
7	3 ± 2.98	1.2 ± 2.4	2.280 ± 3.402	9.587 ± 2.170
9	7 ± 2.087	3.954 ± 5.557	2.560 ± 3.053	9.524 ± 2.4
11	49 ± 12.702	16.095 ± 22.581	3.410 ± 7.625	31.713 ± 6.191

* CADA GRUPO FORMADO POR 5 RATONES BALB-C INOCULADOS CON 10×10^6 L5178-Y POR UNA VÍA I.P.

5 vs 7 = N. S.	5 vs 7 = N. S.	5 vs 7 = N. S.	5 vs 7 = P < .005
5 vs 9 = P < .003	5 vs 9 = N. S.	5 vs 9 = N. S.	5 vs 9 = P < .007
5 vs 11 = P < .001	5 vs 11 = N. S.	5 vs 11 = N. S.	5 vs 11 = P < .0001
7 vs 9 = P < .034	7 vs 9 = N. S.	7 vs 9 = N. S.	7 vs 9 = P < N. S.
7 vs 11 = P < .001	7 vs 11 = N. S.	7 vs 11 = N. S.	7 vs 11 = P < .001
9 vs 11 = P < .001	9 vs 11 = N. S.	9 vs 11 = N. S.	9 vs 11 = P < .001



A.- LINFOCITO B

B.- CELULAS
ESTERASA
POSITIVAS

C.- CELULAS LYT 1.2

D.- CELULAS LYT 2.3

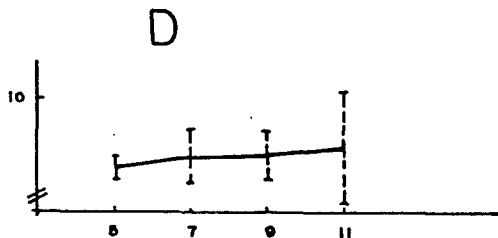
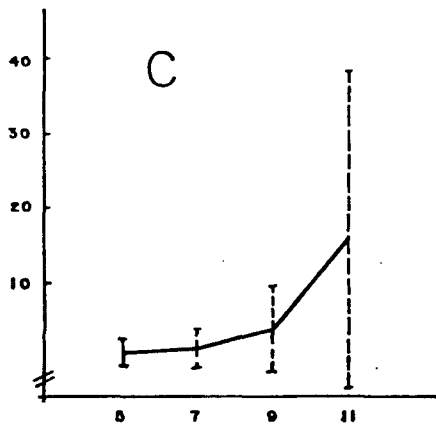
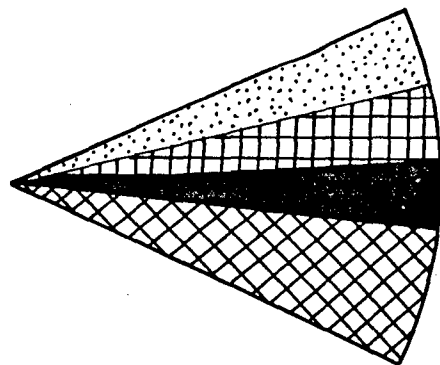
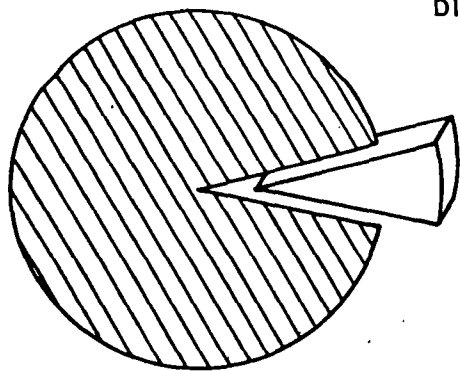


FIG. N.º 2

REPRESENTACION GRAFICA DEL NUMERO
DE CELULAS DEL SISTEMA INMUNE EN
LIQUIDO DE ASCITIS DE RATONES CON
LINFOMA MURINO L5178-Y A DIFERENTES
DIAS DE SU INOCULACION.

DIA 5:




CELULAS L5178-Y


CELULAS DEL SISTEMA
INMUNE -


LINFOCITOS B


CELULAS LYT 1.2


CELULAS LYT 2.3


MACROFAGOS

DIA 7:

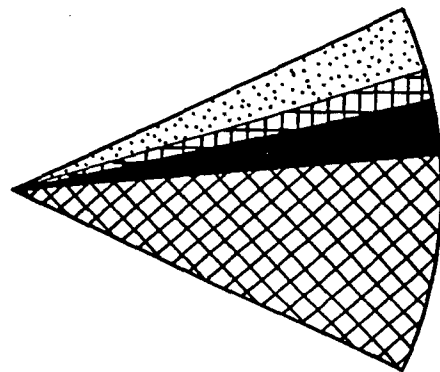
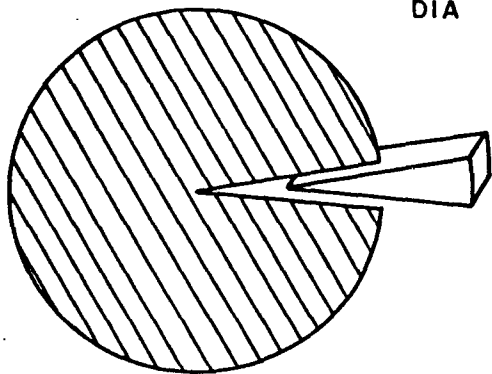
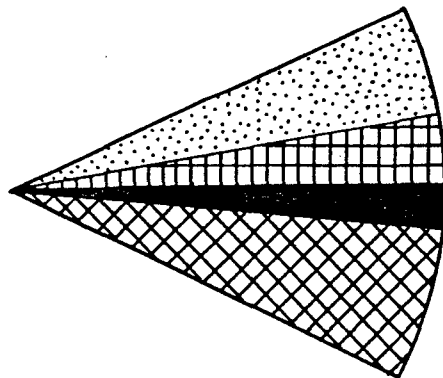
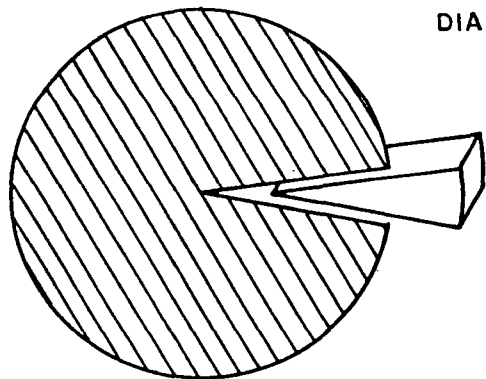


FIG. N° 3.- REPRESENTACION PORCENTUAL DE CELULAS DEL SISTEMA INMUNE Y L5178Y
A DIFERENTES DIAS DE LA INOCULACION DEL LINFOMA.

DIA 9:



CELULAS L8178-Y



CELULAS DEL SISTEMA INMUNE



LINFOCITOS B



CELULAS LYT 1.2



CELULAS LYT 2.3



MACROFAGOS

DIA 11:

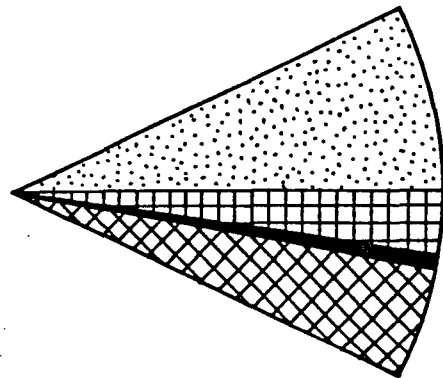
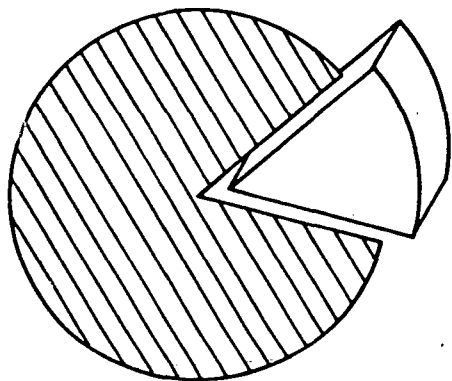


FIG. N.º 3.- CONTINUACION

7.- DISCUSION.

Uno de los problemas fundamentales del cáncer, es la heterogeneidad celular que se origina a partir de la clona transformada inicialmente. Esta creciente diversidad es la responsable del predominio selectivo de sub-clonas metastásicas; poco inmunogénicas; y con otras características biológicas o bioquímicas que les permiten sobrevivir en forma ventajosa en el ambiente tisular invadido (17, 18, 37). Durante el mantenimiento (in vivo o in vitro) de los tumores experimentales, se ha reportado la identificación de sublíneas que difieren en la sensibilidad a quimioterápicos; propiedades de invasión; características de crecimiento; receptores de membrana y producción de hormonas o factores de crecimiento (36).

La curva de crecimiento del linfoma murino L-5178-Y en la cavidad peritoneal de ratones Balb-c, fue similar a la de otros tumores murinos y de otras especies; donde también es peculiar una disminución del ritmo de crecimiento a medida que aumenta la masa tumoral. Todas las células de este linfoma expresaron el marcador Thy-1.2. Durante la evolución del tumor, no se determinaron cambios en la intensidad de este antígeno. Así mismo estas células fueron negativas a las moléculas LyT 1.2 y LyT 2.2 (en toda la fase de crecimiento). Este dato es importante, por la implicación en el tipo de linfocina o factores de regulación que pudiera producir el tumor y por la interacción con el huésped (12).

El número y el tipo de poblaciones del sistema inmune que infiltran los tumores, son determinantes en el destino final del tumor (44, 48), así se ha reportado en neoplasias diferentes, la amplificación de clonas que potencialmente pueden destruir a las células cancerosas; pero que in situ predomina un ambiente de supresión (49).

En este trabajo se observó un predominio de macrófagos; segui-

do en los últimos días del crecimiento de linfocitos B. Se desconoce en este caso, el papel funcional de estas poblaciones en la respuesta al tumor. Los macrófagos activados por linfocinas, representan un mecanismo efector importante contra los tumores (42, 46). Sin embargo también se ha informado de la actividad supresora de estas células, dependiendo del estado de activación y otras características fenotípicas (45).

En el caso de las células B, también se ha reportado una dualidad funcional de los anticuerpos: facilitación inmunológica ver su efecto antitumoral (principalmente interferencia en las metástasis) (40, 47).

Estas interrogantes se van a contestar, mediante el estudio funcional de los macrófagos y de la expresión de antígenos I-A e I-J que se han detectado en macrófagos activados y supresores respectivamente (45). Es importante investigar la especificidad de los linfocitos B que acompañan al tumor y el tipo de anticuerpo que producen.

El hallazgo de que las células L-5178-Y (tumor originado en ratones de haplotipo H-2^{d/d}) proliferan y matan (tardamente) a ratones C57 BL-6 (haplotipo H-2^{b/b}) sugiere la posibilidad, de que este tumor no expresa antígenos de histocompatibilidad clase I; o son anormales o insuficientes para desencadenar una reacción contra injerto (39, 50).

8.- B I B L I O G R A F I A

- 1.- Loonis, W.; F: Developmental Biology. New York McMillan, - 1986.
- 2.- Klein, G.: The Approaching Era of the Tumor suppressor genes Science 1987; 238: 1537-1543.
- 3.- Bishop J.; M.: Celullar oncogenes and retrovirus. Annu. -- Biochem. 1983; 52: 301-354.
- 4.- Bishop, J; M: Science. 1987; 225:305.
- 5.- Klein, G.; Klein, E. Cancer Res. 1986; 46:3211.
- 6.- Fialkow, P.; J.: Clonal origin of human tumors. Annu. Rev. Med. 1979; 30: 135-176.
- 7.- Nowell. P.; C: The clonal evolution of tumor cell popula -- tions. Science. 1976; 194: 23-28.
- 8.- Paul, J.: In theories of carcinogenesis. Washington, D.C. - Iversen, J.H. (ed.), Hemisphere, 1988, pp. 45-60.
- 9.- Heppner, G.: Tumor heterogeneity. Cancer. 1984; 214: 2259.
- 10.- Gabbert, H.: Mechanisms of tumor invasion: Evidence from in vivo observations. Cancer Metastasis. Rev. 1985. 4:283-310.
- 11.- Irimura, T.; Yamori, T.; Bennett, S; C.: The relation ship of collangenolytic activity to stage of human colorectal - carcinoma. Int. J. Cancer. 1987; 40: 24-31.
- 12.- Sherbiom, A.; P.: Moody, C; E.: Cell surface sialomucin and resistance to natural cell mediated citotoxicity of rat -- mammary tumor ascites cells. Cancer Res. 1986; 46:4543-4596.
- 13.- Terranova, V.; P.; Hujanen, E; S.; Martin, G; R.: Basement membrane and the invasive activity of metastasic tumor cells JNCI. 1986; 77: 311-316.
- 14.- Wooley, D; E.: Collagenolytic mechnisms in tumor cell inva- sion. Cancer metastasis. Rev. 1984; 3: 361-376.
- 15.- Sloane, B; E.; Honn, K; V.: Cysteine proteinases and metasta sis. Cancer metastasis. Rev. 1984; 3: 249-263.
- 16.- Strauli. P.; Haemmerli, O.: Immunology of metastasis: Can - the immune response cope with disseminated tumor? Cancer - metastasis. Rev. 1983; 2: 234-256.

- 17.- Gasic, G; J.: Role of plasma, platelets and endothelial - cells in tumor metastasis. *Cancer Metastasis. Rev.* 1984, 3: 99-114.
- 18.- Updyke, T; J.; Nicolson C.; L.: Malignant melanoma lines selective in vitro increased homotypic adhesion properties have increased experimental metastasis potential. *Clin Exp. Metastasis*, 1986; 4: 231-235.
- 19.- Brown, J.; M.; Rosenberg, S.A.: Serologic analysis of - human solid tumor antigens. Mihich E.; ed: *Immunological - approaches of cancer therapeutics*. N.Y.; John Wiley and- sons 1982; pags. 1-30.
- 20.- Jaffe, S., E.; Cossman, J.: Immunodiagnosis of lymphoid- and mononuclear phagocytic neoplasms. en rose, N. R.: - Friedman, J.; Fahey J., L. eds.: *Manual of Clinical Labora- tory Immunology*. Washington, D.C., American Society for - Microbiology. 1986; pags. 779-791.
- 21.- North, R.; J.: The murine antitumor immune response and- its therapeutic manipulation. *Adv. Immunol.* 1984: 35:89.
- 22.- Cheever. M.: A.; Greenberg P.D.; Fefer A.: Potential for - specific cancer therapy with immune T lymphocytes. *J. Biol. Response mod.* 1984: 3: 113.
- 23.- Lotzova. E.: Interleukin-2 Generated killer cells their characterization and role in cancer therapy. *Cancer Bull.* 1987: 39: 30-38.
- 24.- Doherty. P.C.; Kowles. B.B.; Wettstein. P.J.: Immunologi - cal surveillance of tumors in the context of major histo- compatibility restriction of T cell function. *C.Res.*1984;42:1.
- 25.- Oldham, R., K.: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 1983; 1: 582.
- 26.- Herberman, R., B. ed.: *NK cells an other natural effector cells* New York, ACAD. Press. Inc. 1987.
- 27.- Fidler I., J.: Macrophages and metastasis: A biological - Approach to cancer therapy: Presidential Address. *Cancer Res.* 1985; 45: 4714-4726.
- 28.- Tilden. A., B.; Itoh, K.; Balch, Ch., M.: Human Lymphokine activated killer (LAK) cells: Identification of two types of effector cells. *J. Immunol.* 1987; 138: 1068-1073.
- 29.- Beg Leiter, A.; Leith, K., M.; McClarty, G.; Beenken, S.; - Goldenberg, J., G. and wright, A., J.: Characterization of L5178-Y Murine Lymphoblastis resistant to quinone antitumor agents. *Cancer Res.* 1988; 48: 1727-1735.

- 30.- Trainer, D., L.; Wheelock, E., F.: Phenotypic shifts in the L5178-Y lymphoma population during progression of the tumor-dormant state in DBA/2 mice. *Cancer Res.* 1984; 4: 1063-1071.
- 31.- Trainer L., D.; Wheelock, E., F.: Characterization of L5178-Y cell phenotypes isolated during progression of the tumor-dormant state in DBA/2 MICE. *Cancer Res.* 1988; 48: 1727-1735.
- 32.- Greenberg, H., A.; Mandugian, J.; Ray m.; Goldenberg, J.,- G.: Cytogenetic analysis of an immunogenic mutant of the L5178-Y lymphoma. *Acta Citol.* 1980. 24: 232-236.
- 33.- Sampieri, A.; Campos, Perera., C.; Alfaro G.: Crecimiento de una línea tumoral deficiente en la expresión de antígenos H-2 en diferentes cepas murinas. Presentada en el VII Congreso Nacional de Inmunología. 1987. Zacatecas. Zac.
- 34.- Poste, G.; Fialer, I., J.: The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature.* 1979; 283: 139-146.
- 35.- Weiss, L.: Principles of metastasis. New York Academic Press. 1985.
- 36.- Nicolson, L.; G.: Tumor cell instability, Diversification and progression to the metastasis phenotype: from oncogene to oncofetal expression. *Cancer Res.* 1987; 47: 1473-1487.
- 37.- Price Je., y col.: Growth in an organ microenvironment as a selective process in metastasis. *Clin exp. Metastasis* - 1988; 6: 91-102.
- 38.- Weiss, L.; y col.: Interactions of cancer cells with the microvasculature during metastasis. *Faseb J.* 1988; 2: 12-21
- 39.- Hämmerling, G., J. y col.: The influence of major histocompatibility complex class I antigens on tumor growth and metastasis. 1988; *Cancer Res.*
- 40.- Colnaghi, I.; M.; Menard.; Taglia Bue, E.: Heterogeneity of the natural humoral antitumor immune response in mice as shown by monoclonal antibodies. *Journal of Immunology.* 1982, 128: 6: 2757-2762.
- 41.- Landolfo, S.; Arnold, B.; Suzan, M.: Immune interferon production by murine T cell lymphomas. *Journal of Immunology* 128; 6: 2807-2808.
- 42.- Fidler, J., I. DVM, PhD.: Treatment of cancer metastasis by systemically activated macrophages. *Cancer Bull.* 1987. 39; 3: 167-173.

- 43.- Liv, M., Ch.; Okayasu, T.; Goldman, P.; Suzuki Y.; Suzuki, K.; Wheelock, F., E.: Immune regulation of the L5178-Y Murine tumor Dormant State. I. In vivo and in vitro effects - of prostaglandin E₂ and indomethacin on tumor cell growth. J. Exp. Med. 1986; 164: 1259-1273.
- 44.- Heo, S., D.; Whiteside L., T.; Kan Bour, A.; Herberman, B., R.: Lymphocytes infiltrating human ovarian tumors. I. Role of leu-19 (NKH-1) positive recombinant I1-2 activated cultures of lymphocytes infiltrating human ovarian tumors. -- Journal of Immunology 1988; 140: 4042-4049.
- 45.- Kuchroo, K., V.; Minami, M.; Diamond, B.; Dorf, E., M.: - Functional analysis of cloned macrophage hybridomas. VI. - Differential ability to induce immunity or suppression. - - Journal of Immunology 1988; 141: 10-16.
- 46.- Fidler, J., I.: Macrophages and metastasis: A biological - approach to cancer therapy: Presidential Address. Cancer - Res. 1985; 45: 4714-4726.
- 47.- Bartlett, G., L.: Milestones in tumor immunology. Seminars in oncology. 1979. 6: 515-525.
- 48.- Nuul, L., M.; Spiess, P., J.; Director, E., P.; Rosenberg, S., A.: Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant-melanoma. J. Immunol. 1987; 138: 989-994.
- 49.- Plescia, O., J.; Pontieri, G., M.; Brown, J.; Ippoliti, F.; Belleilli, L.; Sezzi, M., L.; Lipari, M.: Amplification by macrophages of prostaglandin mediated immunosuppression in mice bearing tumors. Prostaglandins-Leukotrienes- Med. 1984. 16: 205-223.
- 50.- Goodenow, R., S.; Vogel, J.M.; Linsk, R., L.; Histocompatibility antigens on murine tumors. Science. 1985; 230: 777-783.
- 51.- Ocadiz, R.; Alfaro G.: Caracterización molecular de una línea tumoral de origen murino deficiente en la expresión de moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (H-2). presentado en el VII Congreso Nacional de Inmunología. 1987; Zacatecas, Zac.
- 52.- Koski, I. R.; Poplack, D.G.; and Blabse, R.M.: A non specific esterase stain for the identification of monocytes and macrophages. In: Methods in cell mediated and tumor immunity. New York. Bloom, I.B. R. and David, J.R. (eds.) Academic Press, 1976; pp 359-362.

C.DR. CARLOS ASTENGO OSUNA.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.
P R E S E N T E .

Por medio de la presente hago constar que fue revisada y aprobada para su publicación la Tesis titulada: "CINETICA Y CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DEL LINFOMA MURINO L-5178-Y " desarrollada por el C.Pasante de la Licenciatura en Biología, JUAN CARLOS GARCIA VELASCO.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para reiterarle - mi más atenta y distinguida consideración.

A T E N T A M E N T E .
Guadalajara, Jal., 10 de Noviembre de 1988.


DR. ADRIAN DANERI NAVARRO.
DIRECTOR DE TESIS.

*grr.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente.....
Número 1431/87

SR. JUAN CARLOS GARCIA VELASCO
P R E S E N T E . -

Por este conducto me permito informar a usted que se acepta el cambio de título de tesis "Estudio de la Combinación de Ciclofosfámi da y Sobrenadante de Cultivo de Linfocitos en el Linfoma Murino L 5178-Y", por el nuevo título "CINETICA Y CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DEL -- LINFOMA MURINO L 5178-Y EN RATONES BALB-C".

Dando trámite al mencionado título de tesis con fecha 26 de Noviembre del presente año estando de acuerdo su Director de tesis DR.- ADRIAN DANERI NAVARRO.

Sin otro particular nos es grato reiterar a usted la expre- sión de nuestra consideración más distinguida.



FACULTAD DE CIENCIAS

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jalisco, ~~Noviembre~~ 26 de 1987

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario

Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

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

Al contestar este oficio cítese fecha y número