

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

" MECANISMOS INMUNOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN EL SINERGISMO
ANTITUMORAL DE LAS LINFOCINAS Y DOSIS ÚNICA DE
CICLOFOSFAMIDA EN RATONES CON LINFOMA
MURINO L-5178-Y. "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A
RAMÓN REYNOSO OROZCO

GUADALAJARA, JAL.

1991

14355/22276
9/22/2005
55641

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS

TERMINO	ABREVIATURA O SIMBOLO
Abdomen	A
Acido desoxirribonucleico	ADN
Kuen	B
Ciclofosfamida	C
Cloruro de sodio 0.15M	NaCl 0.15M
Complejo mayor de histocompatibilidad (murino)	H-2
Concanavalina-A	Con-A
Depositos de tumor solidos	TS
Estado	E
Esplenocitos	esplen.
General	G
Gravedad X	Xg
Factor necrotizante de los tumores	FNT
Inmunosuprimido	inmunosupr.
Interferon	IFN
Interleucina-2	IL-2
Intraperitoneal	i.p.
Kilogramos	Kg.
Mal	M
Micras	u
Miligramos	mg
Mililitros	ml
Milimolar	mM
Potencial de hidrogenos	pH
Regular	R
Sobrenadante de cultivo de linfocitos estimulados con concanavalina-A	S.C.L.E.
Sobrenadante de cultivo de linfocitos sin estimular	S.C.L.N.
Solucion balanceada de Hanks	S.B.C.
Testigo	T
Transferido	transf.
Tratado	Trat.
Unidades	U
Volumen de liquido de ascitis	vol. liq. asc.

CUCBA

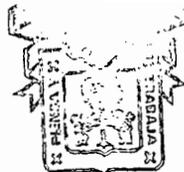


I N D I C E

	Pág.
1.- INTRODUCCION.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	3
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
4.- HIPOTESIS.....	13
5.- OBJETIVOS.....	14
6.- MATERIAL Y METODOS.....	15
7.- RESULTADOS.....	20
8.- DISCUSION.....	23
9.- CONCLUSIONES.....	26
10.- CUADROS Y FIGURAS.....	27
11.- REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFIA.....	31

BIBLIOTECA GENERAL

MECANISMOS INMUNOLOGICOS INVOLUCRADOS EN EL SINERGISMO ANTITUMORAL
DE LINFOCINAS Y DOSIS UNICA DE CICLOFOSFAMIDA EN RATONES
CON LINFOMA MURINO L-5178-Y.



INTRODUCCION.

BIBLIOTECA CENTRAL

El avance tecnológico en el campo de la genética molecular, bioquímica e inmunología, ha permitido comprender mejor las bases biológicas del cáncer (1). Sin embargo, el progreso en la oncología básica todavía no refleja su magnitud en el tratamiento del cáncer, que continúa apoyándose en los principios de la cirugía, quimioterapia y radiaciones, con sus inconvenientes y limitaciones. Dentro de las estrategias terapéuticas alternas, la inmunoterapia de los tumores, representa una de las áreas más estudiadas y prometedoras por su especificidad y supuesta inocuidad (2).

Uno de los principales problemas que enfrenta la inmunoterapia de los tumores, es la débil respuesta inmune que se genera contra la carga tumoral; debido a las características fenotípicas de las subclonas tumorales, desproporción de la masa tumoral o mecanismos de evasión inmunológica que emplean las células malignas. Estos obstáculos pueden abordarse mediante una disminución de la carga tumoral, seguida de un incremento de la inmunogenicidad, estímulo de la respuesta inmune, transferencia pasiva de la misma o contrarrestando las fuerzas supresoras que la limitan (3).

En el presente trabajo, se reprodujo un modelo experimental de inmunoterapia con dosis única de ciclofosfámid (C) y linfocinas obtenidas a partir del sobrenadante de cultivo en linfocitos estimulados mediante Concanavalina-A, en ratones BALB/c portadores del linfoma murino L-5178-Y, publicado previamente por Daneri y cols (4); donde se reportó un sinergismo antitumoral de la dosis única de

ciclofosfamida (180 mg/Kg de peso), seguida de la administración de las lincocinas (48 horas después, cada día). En esta tesis, se repitió el efecto sinérgico antitumoral de ambos agentes, en acuerdo al artículo original; además se demostró que este esquema es ineficiente en ratones atímicos nu/nu y que el efecto antitumoral está mediado por células del sistema inmune, a través de la subpoblación de linfocitos que expresan el marcador Lyt 2.2.

2.- ANTECEDENTES .

2.1 Antecedentes Oncológicos : En los organismos superiores, los fenómenos de proliferación y diferenciación celular, implican la expresión selectiva y coordinada de genes , sujetos a regulaciones intermoleculares, en parte moduladas por influencias del ambiente (5). El repertorio genómico, incluye códigos para la expansión, diferenciación, autonomía y migración celular, que se transmiten en el momento y estirpes apropiados (6). En el cáncer los mensajes de regulación de estos eventos, no se efectúan o no se obedecen en forma adecuada (7).

El desarrollo y progreso de los tumores malignos, se concibe como un proceso microevolutivo basado en cambios secuenciales de un grupo de determinantes o como la gradual emancipación de una clona de células somáticas, del control del crecimiento (1). Las células cancerosas, transmiten a su progenie el fenotipo neoplásico, observación que sugiere la presencia de genes que determinan malignidad. El descubrimiento de los oncogenes en el genoma de los retrovirus y proto-oncogenes en las células normales, ha contribuido al esclarecimiento de los procesos carcinogénicos (8).

Las evidencias apoyan un origen clonal en la mayoría de los tumores sólidos y hematopoyéticos (9). Durante el progreso tumoral, se producen alteraciones heredables que al acumularse se traducen en subclonas con propiedades diferentes de invasión, quimiosensibilidad, antigenicidad; cambios en el cariotipo, receptores, glucoproteínas y enzimas (10). La creciente heterogeneidad celular en los tumores se

correlaciona con un aumento de la autonomía, anaplasia y comportamiento agresivo que se manifiesta en invasión y metástasis (11).

La cinética del crecimiento tumoral, se describe como una función Gompertziana, donde se observa un retardo exponencial del crecimiento y duplicación del tumor a medida que aumenta su masa, por la influencia de la fracción de células en cada etapa del ciclo celular y la proporción eliminada (12).

La invasión y las metástasis a partir del tumor primario, representan los problemas más devastadores del cáncer. Estos procesos ocurren en una secuencia dinámica de pasos interrelacionados, que dependen de factores del " huésped " y de las células malignas (13).

Las secuelas clínicas de los tumores, son causadas por efectos de invasión y compresión de los tejidos normales; liberación de citocinas, hormonas y otros agentes biológicos liberados al medio local o sistémico; finalmente por las consecuencias psicosociales (14).

La estrategia ideal contra el cáncer es su prevención; a medida que se establezcan con precisión los factores que participan en la génesis del cáncer, los programas de prevención primaria y secundaria serán la principal arma en la lucha contra la " malignidad ". El diagnóstico temprano representa la siguiente herramienta que influye en el pronóstico de los enfermos con cáncer (15).

La masa tumoral es una variable importante en todas las modalidades de tratamiento, ya que se correlaciona con el grado de invasión local, probabilidad de metástasis y una mala respuesta al tratamiento

(16). La cirugía está indicada en la mayoría de los tumores en fase temprana de su desarrollo, sus limitaciones son la extirpación tolerable de tejido normal y la diseminación neoplásica. La radioterapia se emplea en el tratamiento de tumores locales o regionales, complementaria a la cirugía o quimioterapia. La quimioterapia se utiliza como un tratamiento sistémico en tumores avanzados o sensibles a estos agentes químicos, sus restricciones son la toxicidad a las células normales y la quimiorresistencia natural o desarrollada en las células tumorales (2).

Los inconvenientes y resultados desfavorables de las 3 modalidades clásicas de tratamiento, ha motivado el desarrollo de estrategias alternas que entre otros incluyen, a los inductores de diferenciación celular, agentes hormonales, hipertermia y modificadores biológicos (2).

2.2.- Inmunología del cáncer : 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 el reflejo de alteraciones heredables, que acompañan a la transformación maligna, y que pueden involucrar la biosíntesis de una molécula nueva (expresión viral), alteración en la estructura de una molécula normal, exposición de conformaciones ocultas, ensamblaje incorrecto de moléculas multiméricas y la expresión aberrante de antígenos fetales o de diferenciación celular. Los antígenos tumorales se clasifican en específicos (células malignas en particular) y asociados (pueden

localizarse en tejidos normales en ciertas estirpes o etapas de la diferenciación celular) (17).

Virtualmente todos los componentes del sistema inmune, han mostrado una mayor o menor capacidad de contribuir a la erradicación de las células cancerosas; de tal suerte que se pueden eliminar células premalignas o en las primeras etapas del crecimiento tumoral (3). Los sistemas efectores específicos, parecen importantes contra los tumores inmunogénicos, mientras que los inespecíficos son relevantes en los menos inmunogénicos (18, 19).

Los linfocitos derivados del timo (linfocitos T), representan el mecanismo principal de respuesta específica contra las células malignas y se efectúa a través de la función de subpoblaciones inductoras de cooperación y citotóxicas. Las primeras que expresan el marcador L3T4 (ratón) o CD4 (humano), requieren la presentación del antígeno en el contexto de moléculas de histocompatibilidad clase II, por células auxiliares y cumplen su función mediante la liberación de linfocinas que activan a otras células del sistema inmune o que tienen actividad antitumoral; las segundas que exhiben el marcador Lyt-2+ (ratón) o CD8 (humano), reconocen al antígeno en el marco de histocompatibilidad clase I, dañando en forma directa la membrana de las células tumorales (20,21,22). La respuesta humoral, mediada por los linfocitos B, parece desempeñar un papel menos importante contra los tumores, sin embargo se ha reportado que los anticuerpos pueden interferir en el establecimiento de las metástasis (23).

La respuesta inespecífica contra los tumores, esta mediada principalmente por las células asesinas naturales, macrófagos y linfocitos activados por linfocinas. Los linfocitos asesinos naturales tienen la capacidad de aniquilar una variedad amplia de células malignas in vitro, y se correlacionan con la resistencia a algunos tumores transplantados (24). Los macrófagos se activan mediante linfocinas como el interferón gama y adquieren la aptitud de lisar a algunas células malignas mediante contacto directo o la secreción de factores (25, 26). Las células activadas por linfocinas, adquieren la capacidad de lisar células malignas frescas y líneas resistentes a linfocitos asesinos naturales, en respuesta a concentraciones elevadas de linfocinas como la interleucina-2; estas células no tienen memoria inmunológica ni están restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad (27).

Al progresar los tumores, se incrementa la heterogeneidad celular y puede ocurrir selección de variantes que expresan antígenos débiles, subclonas no inmunogénicas o que no expresan antígenos de histocompatibilidad (28, 29). Las células malignas pueden además evadir el sistema inmune, en virtud del sitio anatómico privilegiado donde están creciendo (un ejemplo el sistema nervioso central), enmascaramiento antigénico (ácido siálico), liberación de antígenos solubles y en vesículas, modulación antigénica, complejos inmunes, factores inmunosupresores y por la actividad de células supresoras o inductoras de supresión (30, 31, 32, 33, 34, 35). Al último respecto, se ha dudado la existencia de las células T supresoras como una entidad independiente de las citotóxicas, y se sugiere que la actividad de supresión es realizada por diferentes células y

moléculas del sistema inmune (36). El resultado final de la contienda, entre los mecanismos de resistencia contra los tumores y los de evasión al sistema inmune, es crucial en el destino final del huésped con tumor (3).

2.3- Regulación de la respuesta inflamatoria e inmunológica por citocinas : En el curso de las reacciones inflamatorias e inmunológicas se liberan sustancias denominadas citocinas; las producidas por linfocitos se llaman linfocinas; las secretadas por monocitos o macrófagos se designan como monocinas. Estos mediadores son mensajeros intercelulares que regulan la respuesta inflamatoria local y en ocasiones sistémica. Modulan la inflamación e inmunidad a nivel del crecimiento, movilidad y diferenciación de los leucocitos y otros grupos celulares (37).

Se han detectado, caracterizado y purificado un número importante de citocinas con un rango de peso molecular de 6,000 a 60,000 daltons. Estos compuestos son extremadamente potentes a concentraciones bajas, para estimular las funciones de sus células blanco, mediante la unión a sus receptores específicos. Las citocinas que se han purificado, han mostrado efectos múltiples en el crecimiento y diferenciación de células linfoides, mieloides y del tejido conectivo (38). Algunas de estas citocinas, se producen durante los cultivos de linfocitos estimulados con antígenos o mitógenos como la concanavalina-A y la fitohemaglutinina (39). Se ha estudiado el efecto *in vitro* e *in vivo* de algunas citocinas obtenidas en forma recombinante, como la interleucina-2, interleucina-4, interferones, factor necrotizante de los tumores y linfoquinas (40, 41, 42). En pacientes con cáncer, se

han observado resultados inconstantes y algunos efectos tóxicos en respuesta a estos agentes (43).

2.4- Farmacología de la Ciclofosfamida y sus efectos sobre la respuesta inmune : La C es un quimioterápico, fundamental en diferentes esquemas de tratamiento de tumores malignos en el humano (44). Este medicamento, es un agente alquilante, derivado de la mostaza nitrogenada, mediante el reemplazo del N-metilo por una fosfamida cíclica. Se precisa para su activación del sistema citocromo oxidasa P-450 en el hígado, que rinde 4-hidroxíciclofosfamida. Esta a su vez es interconvertible a aldofosfamida; ambas son susceptibles a la oxidasa hepática de aldehídos, que produce 4-cetociclofosfamida y carboxifosfamida respectivamente. Estos metabolitos no presentan actividad biológica importante y no dañan al hígado. Los efectos terapéuticos y tóxicos del medicamento, son mediados por la mostaza de fosforamida, acroleína y nor-mostaza nitrogenada; productos de la aldofosfamida, por una reacción de Beta-eliminación en las células sensibles (45).

El resultado final de las reacciones anteriores es la formación de enlaces covalentes con los componentes del ADN y proteínas asociadas. El átomo 7 de la guanina, es particularmente sensible a la alquilación, favoreciendo la unión a residuos de timina en lugar de citocina; labiliza el anillo de imidazol y fomenta la depurinización al separar los residuos de guanina. Debido a que la ciclofosfamida es un agente alquilante bifuncional, se pueden generar entrecruzamientos entre dos cadenas de ácidos nucleicos o con una de proteínas, afectando al ADN y otras funciones celulares (45).

La C alcanza una concentración máxima en el plasma, dentro de los primeros 15 a 30 minutos después de su administración intraperitoneal (i.p.) y una vida media de 5 horas (46).

Los linfocitos son susceptibles a los efectos tóxicos de la ciclofosfamida, especialmente las células B. Esta vulnerabilidad se manifiesta como linfopenia a las 24 horas post-tratamiento y de acuerdo a la dosis y tiempo de aplicación puede ocasionar inmunosupresión (47). Sin embargo se ha establecido que en condiciones apropiadas, este medicamento puede intensificar la respuesta inmune celular y humoral (48).

El momento de aplicación en la relación al antígeno y la dosis, son críticos en la inmunopotenciación mediada por la ciclofosfamida (49). Las evidencias experimentales sugieren que las células supresoras son más sensibles a este medicamento que el resto de las subpoblaciones celulares (50).

Se han empleado diferentes dosis de este medicamento que varían desde 15 mg/Kg de peso hasta 300 mg/Kg en aplicación única (51). La administración de esta última dosis en ratones, elimina durante cinco días la actividad de las células T citotóxicas, que se recuperan a partir del sexto día; la actividad de las asesinas naturales se recupera a partir del noveno día, con un incremento posterior a los niveles basales; hasta el día 21 se pueden generar células activadas por linfocinas (52). La aplicación única de 180 mg/Kg de peso de ciclofosfamida por vía intraperitoneal, ha incrementado la sobrevivencia de ratones inoculados con células tumorales. Este efecto se atribuyó a la disminución de la carga tumoral y a la eliminación de

precursores de células supresoras (53). Se ha comunicado que dosis de 200 mg/kg de peso, ocasionan un aumento en la producción de interleucina-3 en ratas y una disminución de los efectos tóxicos de la interleucina-2 aplicada a dosis altas en ratones (54, 55).

En un trabajo realizado en este laboratorio, se demostró un efecto sinérgico antitumoral, al administrar ciclofosfamida en dosis única (180 mg/Kg de peso) y linfoquinas (obtenidas a partir de cultivo de linfocitos estimulados mediante Con-A a ratones previamente inoculados con células del linfoma murino L-5178-Y (4).

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se desconocen los mecanismos inmunológicos implicados en el sinergismo antitumoral de la ciclofosfamida (dosis única de 180 mg/Kg de peso) y linfoquinas en el modelo de ratones BALB/c con linfoma murino L-S178-Y.

4.- HIPOTESIS.

El sinergismo antitumoral de la ciclofosfamida (dosis única de 180 mg/Kg de peso) y linfoquinas en ratones con linfoma murino L-5178-Y, está mediado inmunológicamente por el sistema inmune celular.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

5.- OBJETIVOS

5.1- Reproducir el modelo de sinergismo antitumoral de dosis única de ciclofosfamida (180 mg/Kg de peso) y linfocinas en ratones BALB/c con linfoma murino L-5178-Y.

5.2- Investigar si el efecto antitumoral se transfiere en forma adoptiva mediante células de bazo.

5.3- Identificar la subpoblación responsable del efecto antitumoral.

6.- MATERIAL Y METODOS.

Plan General. En forma inicial se repitieron los experimentos que demostraron un sinergismo antitumoral de la dosis única de ciclofosfamida (180 mg/Kg de peso) y linfocinas en ratones con linfoma murino L-5178-Y. En seguida se investigó si el efecto antitumoral, se transfiere mediante las células del bazo de animales tratados con este esquema y sus respectivos controles. Para determinar la subpoblación de células implicadas en la actividad antitumoral, se eliminaron en forma selectiva mediante anticuerpos monoclonales y complemento las subpoblaciones linfocitarias L3T4+, Lyt-2.2+ o Lyt-1.2+, antes de la transferencia en conjunto con células del linfoma murino L-5178-Y. En forma paralela se estudió la eficacia de la ciclofosfamida a la dosis señalada y linfocinas en ratones atímicos nu/nu.

Animales de Experimentación. Los ratones BALB/c (hembras) y sus mutantes atímicos nu/nu (machos) de 10 a 12 semanas de edad, fueron proporcionados por el Centro de Reproducción Animal de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente IMSS. Únicamente se emplearon ratas Wistar (machos de 8 semanas de edad) de la misma institución, para la obtención del sobrenadante de cultivo en linfocitos estimulados o no con concanavalina A.

Células Tumorales. Linfoma murino L-5178-Y (H-2d) de origen espontáneo y estirpe tímica (56), fué mantenido en fase ascítica por

transplante semanal de 1×10^6 EXP 06 células en ratones singénicos BALB/c; esta dosis mata a los ratones en un promedio 13 ± 2 días posteriores a la inoculación del tumor.

Medicamentos. La ciclofosfamida (Genoxal; Schering, México) se disolvió antes de su uso en NaCl 0.15 M, y se aplicó por vía intraperitoneal en un volumen de 0.2 ml. Cada ratón recibió 180 mg/Kg de peso en dosis única.

Medio de cultivo. RPMI-1640 suplementado con amortiguador HEPES 10 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M, suero fetal de ternera al 10% (Gibco, Grand Island Co., N.Y.), bicarbonato de sodio al 0.0003% (Sigma Chemical, St. Louis Mo.).

Viabilidad celular. La viabilidad de las células se determinó mediante naranja de acridina y bromuro de ethidium a una parte por millón en solución de fosfatos pH 7.2, siguiendo el método descrito por Parks (57).

Preparación del sobrenadante de cultivo de linfocitos rico en linfocinas. Se cultivaron linfocitos de bazo de rata a una densidad de 1×10^6 células/ml del medio señalado más 5 ug/ml de Con-A (Sigma Chemical, St Louis Mo), en botellás de 80 cm cuadrados (Corning), durante 24 horas a 37 grados C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Al término de la incubación se obtuvo el sobrenadante mediante centrifugación a 800 x g durante 20 minutos a 4 grados C. En seguida se filtró en membranas con poros de 0.45 u (millipore Corp. Bedford Massachusetts) y se dializó durante 24 horas contra NaCl 0.15

M a 4 grados C. Finalmente se liofilizó (liofilizador, Labconco Co) en condiciones de esterilidad.

Inoculación del tumor y aplicación de los esquemas de tratamiento. Se inocularon siete grupos (10 ratones BALB/c, por grupo) con 5×10^6 EXP 06 células del linfoma L-5178-Y viables por vía I.P. en un volumen de 0.2 ml de RPMI-1640 sin suplementar (día 01); al quinto fueron tratados o no (según el grupo), con la dosis señalada de ciclofosfamida; a partir del séptimo día recibieron alguno de los siguientes tratamientos : sobrenadante de cultivo de linfocitos estimulados con la Concanavalina-A (SCLE), sobrenadante de cultivo de linfocitos sin estímulo mitogénico (SCLN) o NaCl 0.15 M. Estos tratamientos se aplicaron por vía i.p., c/24 horas en un volumen de 0.5 ml, hasta el décimo quinto día del experimento. En el caso de los sobrenadantes de cultivo de linfocitos, cada ratón recibió en total el equivalente a 50 ml del sobrenadante original (antes de la diálisis y liofilización).

Valoración del crecimiento tumoral. Los ratones se sacrificaron el décimo quinto día de la inoculación del tumor; se obtuvo el líquido de ascitis de la cavidad peritoneal, se midió su volumen y se contó el número de células tumorales por ml (contador celular Reichert, Buffalo N.Y.). También se registró el estado clínico de los animales y el aspecto macroscópico del tumor y principales órganos de cada ratón.

Inoculación del tumor y aplicación del esquema de tratamiento en ratones atímicos nu/nu. Se inocularon 3 grupos (5 ratones) con 5×10^6 EXP 06 células del linfoma murino L-5178-Y por vía I.P. en 0.2 ml de

RPMI-1640; dos de los grupos recibieron ciclofosfamida en las condiciones señaladas; a uno de estos grupos se le aplicó además, el esquema de SCLE y al otro sin estímulo mitogénico; El tercer grupo recibió únicamente el SCLE, sin la ciclofosfamida. La valoración del crecimiento tumoral, se realizó en la forma señalada con anterioridad.

Experimentos de transferencias celulares. Se extrajeron en forma estéril los bazo de ratones "normales" o previamente inoculados con el tumor (15 días antes) y tratados con el esquema completo (ciclofosfamida y SCLE), o por separado. Se separaron las células mononucleares en Ficoll Hypaque a una densidad de 1.087, mediante centrifugación a $400 \times g$ durante 26 minutos (4). Se ajustaron 1×10^7 EXP 07 células mononucleares / ml en medio RPMI-1640 con HEPES 25 mM y 0.3% de albúmina bovina. En forma selectiva se eliminaron o no las subpoblaciones de linfocitos inductores / cooperadores o citotóxicos / supresores, mediante anticuerpos monoclonales Anti-L3T4 (hibridoma GK-1.5, donado amablemente por el Dr. Steven Reed., Seattle Biomedical Research Institute) y Anti-Lyt-2.2 (Cederlane laboratories Limited) respectivamente. Además se eliminó la subpoblación de linfocitos que expresan el marcador Lyt-1.2 (presente en una fracción importante de linfocitos T), con su respectivo anticuerpo (Cederlane Laboratories Limited). La eliminación de las subpoblaciones celulares, se efectuó en presencia de complemento de conejo, de acuerdo a lo descrito por Forni (5B). Se transfirieron grupos de 5 ratones (inmunosuprimidos 8 días antes con 300 mg/Kg de peso de ciclofosfamida por vía i.p.) con 10×10^6 EXP 06 células mononucleares tratadas o no con alguno de los anticuerpos monoclonales en presencia

de complemento, más 100×10^3 EXP 03 células del linfoma murino L-5178-Y. La transferencia se realizó por vía S.C. en 0.2 ml de RPMI-1640, en la región dorsal de cada ratón. La valoración se efectuó mediante el registro de la sobrevida de los animales de cada grupo.

Analisis Estadístico. Los resultados de los experimentos se compararon mediante las pruebas de U de Mann Whitney y t de Student.

7.- RESULTADOS.

Efecto antitumoral del sobrenadante del cultivo de linfocitos estimulados con Con-A y dosis única de ciclofosfamida en ratones BALB/c con linfoma. En 6 de los 10 ratones que recibieron ambos tratamientos (grupo 7), no se encontró evidencias del tumor (macroscópicas ni microscópicas); el promedio de células tumorales en la cavidad peritoneal de los 4 animales restantes, fué significativamente menor al cuantificado en los ratones de los 6 grupos testigo (Cuadro I). En la mayoría de los animales de este grupo 7, se observó un incremento en el volumen de su abdomen del octavo al décimo primer día de la inoculación del tumor; seguido de una disminución brusca a partir del décimo segundo día, hasta no detectarse en el décimo quinto. No se observó ninguna anomalía patente en los principales órganos de estos ratones.

Todos los grupos de animales que no recibieron ciclofosfamida, se sacrificaron el décimo tercer día del inóculo tumoral, debido a su mal estado general. Esta condición fué más acentuada en el grupo de ratones tratados únicamente con el SCLC, donde se observaron datos de vasodilatación y hemorragias pequeñas en los órganos del abdomen y tórax, así como depósitos de tumor sólido (nódulos tumorales). En contraste todos los animales de los grupos que recibieron ciclofosfamida, sobrevivieron hasta la fecha programada para su sacrificio (décimo quinto día) en diferentes condiciones generales, dependiendo de los otros tratamientos que recibieron (Cuadro I). Sin tomar en cuenta a los ratones del grupo experimental (No 7), el resto

de los que recibieron ciclofosfamida, mostraron una tendencia (no significativa) a un menor número de células tumorales en relación a los grupos no tratados con este agente alquilante (Cuadro I). A excepción del mismo grupo experimental, todos los que recibieron sobrenadante de cultivo de linfocitos estimulados o no con el mitógeno, mostraron una tendencia a un volumen menor de líquido ascítico y depósitos de tumor sólido.

Esquema de tratamiento de ciclofosfamida y sobrenadante de cultivo de linfocitos, en ratones atímicos nu/nu. Algunos de los ratones atímicos murieron en los primeros días de la inoculación del tumor, a causa de problemas infecciosos; sin embargo el resto de animales sobrevivieron aunque en mal o regular estado general hasta el décimo quinto día. En todos los grupos tratados o no con ciclofosfamida y sobrenadantes de cultivo de linfocitos (SCLC o SCLN), se registraron cifras de células tumorales superiores a 300×10^6 EXP 06 por ratón. Los 2 grupos de animales tratados con la ciclofosfamida más SCLC o SCLN, mostraron una discreta tendencia a un menor número de células L-5178-Y (no significativa), regular estado general y abdomen menos voluminoso en relación a los que recibieron únicamente los sobrenadantes (Cuadro II). No se observaron diferencias significativas en el volumen y en el depósito de tumor sólido entre los diferentes grupos de animales.

Experimentos de transferencias celulares. Con la finalidad de investigar si el efecto antitumoral de la dosis única de ciclofosfamida y linfocinas en ratones BALB/c con linfoma, está mediado por células del sistema inmune; se transfirieron células mononucleares del bazo de estos animales más células L-5178-Y a

receptores inmunosuprimidos. Los ratones transferidos de esta manera, mostraron una supervivencia del 100% después de 24 semanas, posteriores a la transferencia e inoculación del tumor, por lo que los consideramos curados; en contraste los animales transferidos con células de base de ratones "normales", tratados con ciclofosfamida o linfoquinas (SCLF) por separado, no sobrevivieron más de 37, 35, y 34 días respectivamente (figura 1).

El siguiente experimento consistió en la eliminación selectiva de las subpoblaciones de linfocitos T presentes en las células transferidas, mediante anticuerpos monoclonales y complemento. Los ratones transferidos con las células mononucleares sin anticuerpos (únicamente complemento), registraron una supervivencia del 100% después de 24 semanas de valoración. En contraste, los grupos que recibieron la transferencia de células incubadas con Anti-Lyt 2.2 o Anti-Lyt 1.2, no sobrevivieron más de 25 y 35 días respectivamente (figura 2). En cambio los anticuerpos Anti- L3T4, no afectaron de igual manera la transferencia del efecto antitumoral, ya que el 67% de los animales de este grupo sobrevivió más de 24 semanas (figura 2).

8.- DISCUSION.

En este trabajo, observamos el efecto sinérgico antitumoral de la dosis única de ciclofosfamida, seguida de sobrenadante de cultivo de linfocitos estimulados mediante Con-A, en ratones BALB/c previamente inoculados con células del linfoma murino L-5178-Y. En esta forma se logró reproducir el modelo reportado por Daneri y cols (4), con un comportamiento similar. Otra observación que se repitió en este trabajo, fue la regresión del tamaño del abdomen a partir del décimo segundo día de la inoculación del tumor, en los animales tratados con el esquema completo; esto sugiere la activación de un mecanismo inmunológico contra el tumor.

La aplicación de sobrenadantes de cultivo de linfocitos estimulados o no con la Con-A (a excepción del grupo experimental), se asoció a la presencia de depósitos de tumor sólido en las paredes de la cavidad peritoneal. Desconocemos la explicación de este fenómeno, pero pudiera estar mediado por los nutrientes y factores de crecimiento del medio de cultivo. Por su parte los datos de vasodilatación, hemorragias y mal estado general que se registraron en los animales tratados con el SCLF, se pueden deber a los efectos colaterales de la interleucina-2 y otras linfocinas presentes en este sobrenadante, en acuerdo a lo publicado con anterioridad (43).

Desconocemos el papel exacto de la ciclofosfamida por un lado y de las linfocinas presentes en el SCLF por el otro, en el sinérgico antitumoral que observamos en este modelo experimental. La ciclofosfamida a la dosis empleada, destruye una fracción de las células del linfoma, pero no detiene el crecimiento del tumor (4). Se

na descrito en la literatura su actividad inmunomoduladora (48-53), que se ha atribuido a la inhibición preferente de los precursores de linfocitos T supresores y de las células presentadoras de antígeno, involucradas en la inducción de células supresoras (59). Se ha sugerido que la acroleína (metabolito de la ciclofosfamida) es una a grupos sulfhidrilos de moléculas críticas en la actividad de supresión (sistemas enzimáticos), afectando la función o viabilidad celular (60). Por otro lado, también desconocemos el factor o factores del sobrenadante de cultivo de linfocitos estimulados, responsable del efecto antitumoral. En sobrenadantes obtenidos en condiciones similares, se ha detectado interleucina-2, interferón gama, linfoquinas, factor necrotizante de tumores y otras linfoquinas (61). Según el reporte original de este modelo, cada animal recibió una dosis diaria de 7,500 unidades de interleucina-2 (4). Se ha informado que la administración desde 50 unidades de esta linfoquina (via i.p.), aumenta el número de células asesinas naturales en el exudado peritoneal; mientras que se requirieron 4,000 unidades por dosis para inducir o aumentar las funciones de los linfocitos citotóxicos y más de 10,000 unidades para generar *in vivo*, en forma eficiente células activadas por linfoquinas (62).

En este trabajo demostramos, la ineficiencia de nuestro esquema completo de tratamiento en ratones atímicos nu/nu, lo cual indica que es indispensable la integridad de la respuesta inmune celular y sugiere que parte del efecto antitumoral está mediado por células T. La transferencia adoptiva celular del efecto antitumoral a receptores inmunosuprimidos, apoya en forma más sólida un mecanismo antitumoral mediado por las células del sistema inmune, presentes en los tejidos

esplénicos transferidos. La eliminación de este efecto, mediante los anticuerpos monoclonales Anti-Lyt 1.2 y Anti-Lyt 2.2. más complemento, sugiere que la subpoblación responsable de la actividad antitumoral son linfocitos T citotóxicos; por su parte la ineficiencia de los anticuerpos monoclonales Anti L3T4 para bloquear esta actividad, nos hace pensar que la subpoblación inductor/cooperadora no es importante en la etapa efectora de nuestro modelo de estudio. Sin embargo, no podemos descartar que esta subpoblación desempeñe un papel primordial en las etapas de inducción, activación o amplificación de la respuesta inmune, previas a la fase efectora. Para poder contestar esta interrogante, requerimos eliminar in vivo a esta subpoblación a diferentes tiempos de la aplicación del esquema completo de tratamiento.

Englobando en su conjunto los resultados, pensamos que la ciclofosfamida, además de matar cierta fracción de células tumorales, actúa contra alguno de los sistemas de inhibición de la respuesta inmune (48-51, 59,60); propiciando un ambiente favorable para la acción de las linfocinas presentes en el sobrenadante de cultivo de linfocitos estimulados con la Con-A; permitiendo la generación de linfocitos citotóxicos contra el tumor. A este último respecto conviene comprobar in vitro la actividad citotóxica específica contra el Linfoma Murino L-5178-Y; además, determinar el papel de las diferentes linfocinas presentes en el SOLE, en relación a la generación de las células citotóxicas; para resolver este problema se diseñó una serie de experimentos con anticuerpos contra IFN gama, IL-2, IL-4, y FNT, con la finalidad de bloquear su efecto in vitro, antes de aplicar los sobrenadantes a los ratones con tumor.

9.- CONCLUSIONES.

9.1.- Se logró reproducir el sinergismo antitumoral, de la aplicación de ciclofosfamida en dosis única y linfocinas en ratones BALB/c con linfoma murino L-0178-Y.

9.2.- Este esquema resultó ineficiente en ratones atímicos nu/nu.

9.3.- El efecto antitumoral se transfirió a ratones BALB/c inmunosuprimidos, mediante células de bazo.

9.4.- El efecto antitumoral se inhibió al eliminar las subpoblaciones que expresan los marcadores Lyt-2.2. y Lyt-1.2. (linfocitos T citotóxicos y la mayoría de las células T respectivamente).

Cuadro I. Efecto antitumoral de linfocinas y dosis única de ciclofosfamida en ratones con linfoma.

Grupo/Trat ^{nt}	células L-5178-Y- X +- S	Vol Liq Asc**	Observaciones
1.- NaCl	299.6 +- 54.5	5.9 +- 1.8	MEG A++++
2.- SCLN	297.4 +- 47.3	3.8 +- 1.5	MEG A++++ TS
3.- C	239.8 +- 52.4	4.9 +- 2.1	REG A+++
4.- C NaCl	207.5 +- 39.6	5.1 +- 1.1	REG A+++
5.- C SCLN	184.4 +- 46.3	2.9 +- 0.9	REG A+++ TS
6.- SCLE	225.6 +- 33.7	2.4 +- 0.7	MEG A++++ TS
7.- C SCLE	9.3 +- 5.4	0.3 +- 0.04	BEG A-

* 1 x 10 EXP 06 (células totales)

** ml

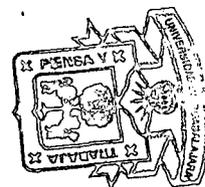
Comparaciones mediante prueba de "t" de Student y U de M.W.:

7 vs 1 hasta 6 : p< 0.001 1 hasta 6 (entre ellos): NS

M^o mal R^o regular B^o buen E^o estado G^o general

N = 10 ratones TS = tumor sólido A = abdomen

BIBLIOTECA CENTR



2

Cuadro II.- Esquema de linfocinas y dosis única de ciclofosfamida en ratones atípicos nu/nu.

Grupo/Trat	Células L-5178-Y ^a X ± S	Vol Liq Asc**	Observaciones
1.- SCLN	328.4 ± 64.2	3.9 ± 1.9	MEG A++++ TS
2.- C SCLN	238.5 ± 49.8	3.5 ± 1.4	REG A+++ TS
3.- SCLE	337.7 ± 57.9	3.6 ± 2.1	MEG A++++ TS
4.- C SCLE	229.9 ± 47.3	3.8 ± 1.6	REG A+++ TS

* 1 x 10⁶ EXP 06 (células totales)

** ml

Comparaciones mediante prueba de "t" de Student U de M.W. :
1 hasta 4 (entre ellos) : NS

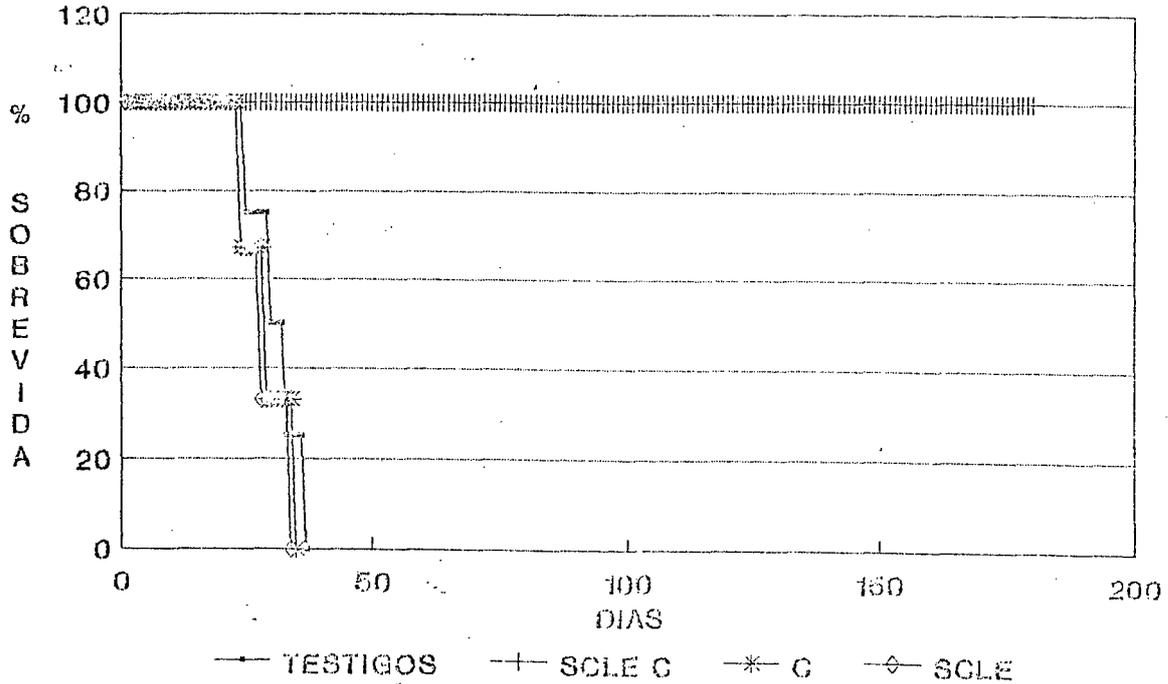
M^a mal R^a regular B^a buen E^a estado G^a general

A^a abdomen

TS^a depósitos de tumor sólido

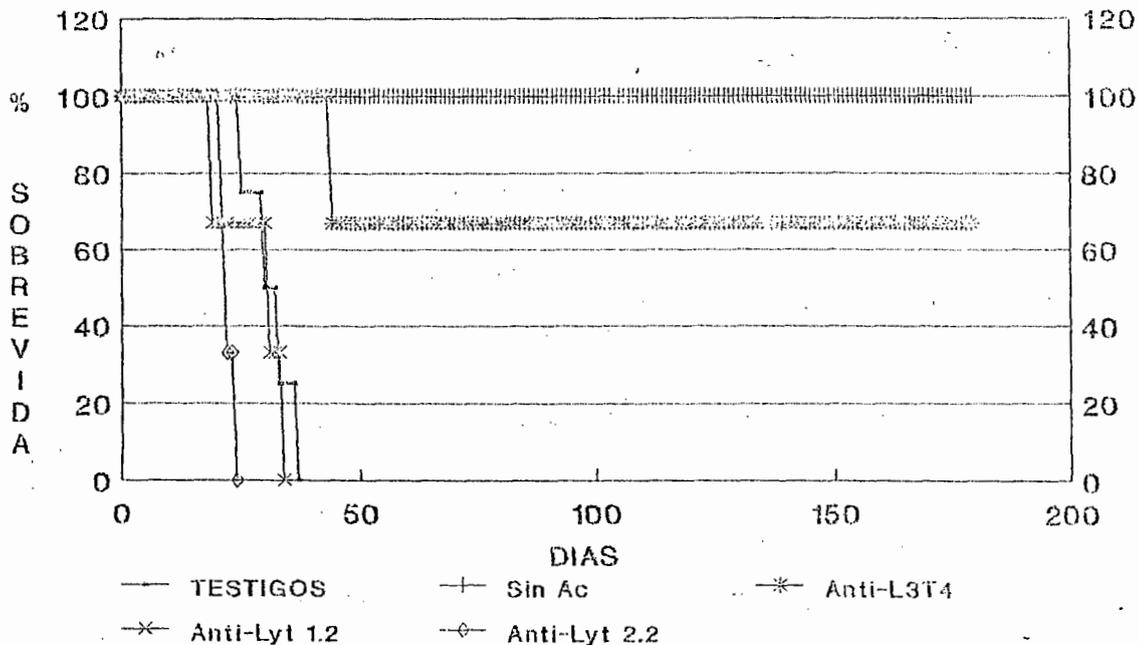
N^o 5 ratones en cada grupo

Figura 1. Transferencia del efecto antitumoral mediante células de bazo.



Sobrevivida de grupos de 5 ratones inmunosupr/ transf con 1×10^6 EXP 06 esplen + 1×10^5 EXP 05 L-5178-Y
 Análisis estadístico : prueba de U de Mann-Whitney : SCLE C versus TESTIGOS, C, SCLE C - $p < 0.0001$

Figura 2. Bloqueo selectivo de la transferencia adoptiva del efecto antitumoral



Sobrevida de Gps de 5 ratones Inmunosup/transf 1 x 10 EXP 07 esplen de ratones SCLE C c/sin Ace + 1 x 10 EXP 05 L-5178-Y Testigos: recibieron esplen de ratones "normales"

p de U de Mann-Whitney : Sin acs versus Anti-L3T4 - p < 0.08 Sin acs/Anti-L3T4 vs resto Gps - p < 0.001

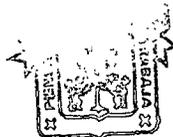
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Klein,G.; Klein,E.: Evolution of tumor and the impact of molecular oncology. Nature, 1985;315:190-195.
- 2.- De Vita,V.,T., y col.: Cancer: Principles and practices of oncology. Philadelphia, Lippincott, 1989.
- 3.- North, R.,J.: The murine antitumor immune response and its therapeutic manipulation. Adv. Immunol. 1984;35:89.
- 4.- Daneri-Navarro A., Del Toro-Arreola A., Garcia-Velasco J. C.: Sinergismo antitumoral de linfocinas y dosis única de ciclofosfamida en ratones con linfoma murino. Cancerologia. 1990; 35: 1039-1044.
- 5.- Davidson,E., H.: Gene activity in early development. New York.- Academic Press, 1986.
- 6.- Loomis, W.,F.: Developmental Biology. New York, MacMillan,1986.
- 7.- Feramisco,J.; Ozanne; Stiles,C.: Growth factors and transformation. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.- 1985.
- 8.- Winberg,R., A.: The action of oncogenes in the cytoplasm and -- nucleus. Science. 1985;230:770-776.
- 9.- Falkow, P., J.: Clonal origin of human tumors. Ann. Rev. Med. - 1979;30:135-176.
- 10.- Heppner, G.: Tumor heterogeneity. Cancer. 1984;214:2259.
- 11.- Gasbert, H.: Mechanisms of tumor invasion: Evidence from in vivo observations. Cancer Metastasis Rev. 1985;4:283-310.
- 12.- Miller, F., R.: Tumor subpopulation interactions in metastasis.- Invasion metastasis. 1985;3:234-242.
- 13.- Skipper, H., T.; Schabel, F., M., Jr.: Quantitative and cytotoxic studies in experimental tumor models. En Holland, S., R.; Frei,E.; eds. Philadelphia, Lea and Febiger. 1982, pages.663-684.
- 14.- Calabresi,P.: Medical oncology: Basic principles and clinical - management of cancer. New York, MacMillan, 1985.
- 15.- Morrison, A.,S.; Hakama,M.; Aoki,K.: Primary and secondary prevention of cancer. (seventh annual sapporo cancer seminar). Cancer Res. 1988;46:4434-4436.

- 16.- De Vita, V.,T.: Principles of cancer therapy. En Braun Wald, E.; Isselbacher, K., T.; Petersdorf, R., G.; Wilson, J.,D.; Martin, J.,G.; Fauci, A., S., eds. Principles of internal medicine. Eleventh edition. McGraw-Hill Book Company. 1987; pag. 431-446.
- 17.- Brown, G.,M.; Rosenberg, S.,A.: Serologic Analysis of human solid tumor antigens. En Minich, E., ed. Immunological approaches to cancer. Therapeutics, N.Y., John Wiley and sons. 1982; págs.1-30.
- 18.- Cheever, A.,A.; Greenberg, P.,D.; Fefer, A.: Potential for specific cancer therapy with immune T lymphocytes. J. Biol. Response Mod. 1984;3:113.
- 19.- Lotzova, S.: Interleukin-2 generated killer cells, their characterization and role in cancer therapy. Cancer Bull. 1987;39:30-36.
- 20.- Sonarty, P.,C.; Kowles, S., B.; Wettstein, P., J.: Immunological surveillance of tumors in the context of major histocompatibility restriction of T cell function. Adv. Cancer Res. 1984;42-1.
- 21.- Holmes, K.,L.; Morse III, H.,C.: Murine hematopoietic cell surface antigen expression. Immunol. Tod. 1988;9:344-350.
- 22.- Edward, A.; Clark; Lanier, L.,L.: Report from Vienna: In search of all surface molecules expressed on human leucocytes. J. of Clin.-Immunol. 1989;9:264-272.
- 23.- Holmes, E.,C.: Immunology of tumor infiltrating lymphocytes. Ann. Surg. 1985;201:158.
- 24.- Herberman, R.,B. ed.: NK cells and other natural effector cells. New York, Acad. Press. Inc. 1987.
- 25.- Varesio, L.; Blasi, E.; Thurman, G.,B.; Talmadge, J.,E.; Wiltrout, R., H.; Herberman, R.,B.: Potent activation of mouse macrophage by recombinant interferon-gamma. Cancer Res. 1984;44:4465.
- 26.- Dacker, T.; Lohmann-matthes, M.; Gifford, G., E.: Cell associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. J. Immunol. 1987;138:957-962.
- 27.- Herberman, R.,B.: Adoptive therapy for cancer with interleukin-2 activated cells. Cancer Bull. 1987;39:6-13.
- 28.- Nicolson, G.,L.; Fidler, I.,D.: Diversification and heterogeneity of metastatic neoplasm. Cancer Bull. 1987;39:185-192.
- 29.- Goddenow, R.,S.; Vogel, J., M.; Linsk, R., L.: Histocompatibility antigen on murine tumors. Science 1985;230:777-783.

- 30.- Irimura, T.; Reading, Ch., L.: Surface properties of metastatic tumor cells. *Cancer Bull.* 1987;39:132-141.
- 31.- Alexander, P.: Escape from immune destruction by the host through of surface antigens: Is this a characteristic shared by malignant and embryonic cells? *Cancer Res.* 1974;34:2077-2082.
- 32.- Theofilopoulos, A., N.: Immune complex in cancer. *N. Engl. J. Med.* 1982;307-1208.
- 33.- Jacobson, J., B.; Galuska, S.; Stackpole, C., W.: In vivo modulation of TL antigens on mouse leukemia cells and thymocytes: modulation antibody remains on the cell surface. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1978; 61:819.
- 34.- Gautam, S., C.: Production in immunosuppressive factor (s) by a weakly immunogenic fibrosarcoma T241. *Anticancer Res.* 1983; 3: 263-266.
- 35.- Ienida, N.: Isolation of factor responsible for the immunosuppression found in tumor bearing animals. *Yakugaku Zeisshi.* 1985; 105:91-106.
- 36.- Moller, G.: Do suppressor T cell exist? *Scand. J. Immunol.* 1982;27: 247-250.
- 37.- Oppenheim, J., J.; Cohen, S.: Interleukins, Lymphokines and cytokines. Academic. Press. 1983.
- 38.- Oppenheim, J., J.; Ruscetti, F., W., MD., Faltinek, C.: Cytokines. En: Stiles, D., F., Terr, A., I. eds. *Basic human immunology.* Appleton & Lange Publishing Division of Prentice Hall. 1991:page. 78-100.
- 39.- Oppenheim, J., J.: Antigen non-specific lymphokines. An overview. *Methods Immunol.* 1985;116:357.
- 40.- Atkins, M., S.; Gould, S., A.; Allegretta, M., y col.: Phase I evaluation of recombinant interleukin-2 in patients with advanced malignant disease. *J. Clin. Oncol.* 1986;4:1380-1391.
- 41.- Sherwin, S., A.; Kaost, J., A.; Fein, S.; Mayer, D.; Ochs, J., J.: A multiple-dose phase I trial of recombinant leukocyte an interferon in cancer patients. *Jamma.* 1982; 248:2461.
- 42.- Gray, P., W.; y col.: Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumors necrosis activity. *Nature.* 1984;312:721.

- 43.- Kolitz, J., E.; Mertlesmann, R.; Sykora, J., W.; Welte, K.: Interleukin-2: Basic and clinical studies. *Cancer Bull.* 1987;39:13-18.
- 44.- De Vita, V., T.: Hodgkin's disease and the non-hodgkin's lymphomas. En: De Vita y col. eds. *Cancer: Principles and practice of oncology*. Philadelphia. Lippincott. 1985; págs. 1433-1495.
- 45.- Calabresi, P.; Parke, R., E.: Antiproliferative agents and drugs used for immunosuppression. En: Goodman, A., G.; Goodman, L., S.; Rall, T., W.; Murad, F. eds. *The pharmacological basis of therapeutics*. MacMillan Publishing Company. 1985; págs. 1247-1306.
- 46.- Connors, T., A.: Alkylating drugs, nitrosoureas and alkyltriazenes. En: Chabner, B., A.; Finedo, H., M. eds. *The cancer pharmacology annual*. Amsterdam. Excerpta Medica. 1983; págs. 29-50.
- 47.- Colvin, M.: The alkylating agents. En: Chabner, B., A.: *Pharmacologic principles of cancer treatment*. Philadelphia, W.B. Saunders C. 1982; págs. 276-308.
- 48.- Berd, D.; Mastrangelo, M., J.; Engstrom, P., F.; Paul, A.; Maguirre, H., C.: Augmentation of the immune response by cyclophosphamide. *Cancer Res.* 1982;42:4862-4866.
- 49.- Turk, J., L.; Parker, D.: Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms. *Immunol. Rev.* 1982; 65:99-113.
- 50.- Berd, D.; Maguirre, H., C.; Mastrangelo, M., J.: Impairment of concanavalina-A- inducible suppressor activity following administration of cyclophosphamide to patients with advanced cancer. *Cancer Res.* 1984;44:1275-1280.
- 51.- Ferguson, R., M.; Simmons, R., L.: Differential cyclophosphamide sensitivity of suppressor and cytotoxic cell precursors. *Transplantation.* 1978;25:36-38.
- 52.- Ballas, Z., K.: Lymphokine-activated killer (LAK) cell T differential recovery of LAK, Natural killer cells, and cytotoxic T lymphocytes after a suplethal dose of cyclophosphamide. *J. Immunol.* 1986;137:2380-2384.
- 53.- Greenberg, P., D.; Cheever, M., A.: Treatment of disseminated leukemia with cyclophosphamide and immune cells: Tumor immunity reflects long-term persistence of tumor specific donor T cells. *J. Immunol.* 1984;133:3402.
- 54.- Sewell, W., A.; De moerlouse, P., A.; Hamilton, J., A.; Schrader, J. W.; Mackay, I., R.; Vacas, M., A.: Potentiation of delayed-type hypersensitivity by pertussigen or cyclophosphamide with release of different lymphokines. *Immunology.* 1987;61:483-488.



- 55.- Resenstain, M.; Ettinghausen, S., E.; Rosenberg, S., A.: Extravasation of intravascular fluid mediated by the systemic administration of recombinant interleukin-2. *J. Immunol.* 1986;137:1735-1742.
- 56.- Reenberg A. J., Manougian J., Manokhanjan R., Goldberger G. J.: Cytogenetic analysis of an immunogenic mutant of the L-8178-Y lymphoma. *Acta Cytologica.* 24:236, 1980.
- 57.- Parks, D.R., V.M. Bryan, V.T. Di, and L.A. Herzenberg. 1979: Antigen specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence activated cell sorter. (FACS). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:1962.
- 58.- Forni, G.; Musso, T.; Gemma, C.; Boraschi, D.; Tagliabue, A.; Giovarelli, M.: Lymphokine-activated tumor inhibition in mice. Ability of a nonapeptide of the human IL-1B to recruit anti-tumor reactivity in recipient mice. *The Journal of Immunology.* 142:2, - 1989.
- 59.- Lowy, A., Tominaga, A., Drebin, J.A., Takaoki, M., Benacerraf, F., Greene, M.: Identification of an I-J antigen presenting cell required for third order suppressor cell activation. *J. Exp. Med.* 157:353, 1983.
- 60.- Kawabata T.T., White K.L.: Enhancement of in vivo and in vitro murine responses by the cyclophosphamide metabolite acrolein. *Cancer Res.* 48:41, 1988.
- 61.- Agah K., Malloy B., Sherrrod A., Mazumder A.: Successful therapy of natural killer-resistant pulmonary metastasis by the synergism of gamma-interferon with tumor necrosis factor and interleukin-2 in mice. *Cancer Res.* 48:2245, 1988.
- 62.- Mier J.W.: Therapeutic uses of recombinant interleukin-2 in patients with cancer. *Cancer Bull.* 39:19, 1987.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Sección
Expediente
Número 0585/90

SR. RAMON REYNOSO OROZCO
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "MECANISMOS INMUNOLOGICOS INVOLUCRADOS EN EL SINERGISMO - ANTITUMORAL DE LINFOCINAS Y DOSIS UNICA DE CICLOFOSFAMIDA EN RATONES -- CON LINFOMA MURINO L-5178-Y" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M.en C. Adrian Daneri Navarro.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Abril 27 de 1990
EL DIRECTOR



ING. ADOLFO ESPINOSA DE LOS MONTEROS CARDENAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

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

lmjsd

Al contestar este oficio efírese fecha y número

M. EN C. CARLOS BEAS ZARATE
DIRECTOR DE LA FAC. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

P R E S E N T E .

Por este conducto me dirijo a usted para solicitar de la manera más atenta me sea autorizada la impresión y publicación de la Tesis titulada: "MECANISMOS INMUNOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN EL SINERGISMO ANTITUMORAL DE LAS LINFOCINAS Y DOSIS ÚNICA DE CICLOFOSFAMIDA EN RATONES CON LINFOMA MURINO L-5178-Y"

Agradezco de antemano las atenciones que se sirva prestar a la presente, reiterándole las seguridades de mi más atenta y distinguida consideración.

A T E N T A M E N T E
Guadalajara, Jal., 8 de Mayo de 1991.

DIRECTOR DE TESIS



M. EN C. ADRIAN DANERI NAVARRO

RAMON REYNOSO OROZCO

C. DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E.-

Por este conducto me permito extender a usted el presente
borrador para Impresión de Tesis titulado:

" MECANISMOS INMUNOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN EL SINERGISMO ANTITUMORAL
DE LAS LINFOCINAS Y DOSIS ÚNICAS DE CICLOFOSFAMIDA EN RATONES CON -

LINFOMA MURINO L-5178-Y"
Realizado por el pasante : RAMÓN REYNOSO OSOZCO

del cual me permito hacer las siguientes observaciones:

1) Incluir información referida en la tesis

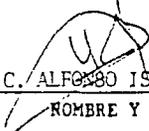
Por lo anterior considero que esta se recomienda

y depende con la para su desarrollo.

observación Sin otro particular me es grato reiterar a usted la expresión
arriba señalada de mi consideración más distinguida.

A T E N T A M E N T E

Guadaleajara, Jal., a 16 de Mayo de 1971.


M.C. ALFONSO ISLAS RODRIGUEZ

NOMBRE Y FIRMA.

C. DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E.-

Por este conducto me permito extender a usted el presente
borrador para Impresión de Tesis titulado: _____

" MECANISMOS INMUNOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN EL SINERGISMO ANTITUMORAL
DE LAS LINFOCINAS Y DOSIS ÚNICAS DE CICLOFOSFAMIDA EN RATONES CON -

LINFOMA MURINO L-5178-Y"

Realizado por el pasante : _____ RAMON REYNOSO OROZCO

del cual me permito hacer las siguientes observaciones: Se

deben de hacer algunas correcciones
ortográficas y en la integración
de la Introducción antes de
su impresión.

Por lo anterior considero que esta debe ser aceptada
para su impresión para su desarrollo.

Sin otro particular me es grato reiterar a usted la expresi-
ón de mi consideración más distinguida.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal., Mayo 20 de 1991.

DR. EDUARDO VAQUÉ VALLS

NOMBRE Y FIRMA.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Mi agradecimiento total a mi familia y muy especialmente a mis padres por el apoyo que siempre me brindaron.

Con todo mi respeto y sincero agradecimiento para el Maestro Adrian Daneri Navarro, por todo lo que representa en la realizacion de este trabajo, así como a todas aquellas personas que en alguna forma contribuyeron a tal fin.

Este trabajo está dedicado a todos aquellos seres que de alguna manera dan fé de mi existencia.