

1 9 9 3 - B

082347968

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

**INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE LINFOMA MURINO L5178Y
MEDIANTE LA UTILIZACION DE LINFOCITOS ALOGENICOS**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA**

P R E S E N T A

IRMA VARGAS MEDINA

DIRECTOR DR. EN C.

ALEJANDRO BRAVO CUELLAR

GUADALAJARA, JALISCO. 1993

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE
INMUNOLOGIA DE LOS TUMORES DEL AREA DE
PATOLOGIA EXPERIMENTAL
EN EL CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE
OCCIDENTE DEL I.M.S.S EN GUADALAJARA, JAL.

A mi director.

Dr. en C. Alejandro Bravo Cuellar
con todo mi respeto y agradecimiento,
por todo lo que representa en la realización
de este trabajo.

Gracias a todo ese apoyo
incondicional de la M. en C.
Ana Maria Puebla Pérez por los
conocimientos obtenidos a su
lado.

A la M.en C. Blanca Torres Mendoza
mi agradecimiento por su apoyo y
entusiasmo, en la terminación de
este trabajo.

Mi agradecimiento total
a mi familia especialmente a
mis Padres, por el apoyo que
siempre me brindaron.

A mis compañeros,
con los que conviví unidos
para alcanzar nuestros
ideales.

A todas aquellas personas
que en alguna forma,
contribuyeron a tal fin.
Gracias.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
INTRODUCCION	1
JUSTIFICACION	5
HIPOTESIS	7
OBJETIVOS	8
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	12
DISCUSION	16
CONCLUSION	18
BIBLIOGRAFIA	19
CARTA DE ACEPTACION DE TESIS	23
CARTA DE TERMINACION DE TESIS	24

ABREVIATURAS

BC	CEPA DE RATONES BALB/C
B6	CEPA DE RATONES C57BL/6
D2	CEPA DE RATONES DBA/2
G VS H	INJERTO CONTRA HUESPED
G VS L	INJERTO CONTRA LEUCEMIA
IL	INTERLEUCINA
LAK	LINFOCITOS ASESINOS ACTIVADOS
NK	NATURALES ASESINOS
TIL	LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMORES

INTRODUCCION

El sistema inmunológico es el responsable de mantener la integridad molecular del individuo, dicho en otras palabras de reconocer lo propio de lo no propio y eliminarlo.

Es un complejo sistema en el que intervienen distintos tipos de células (linfocitos, macrófagos, etc.), moléculas (anticuerpos, factores del complemento) y sustancias solubles que sirven para la comunicación de señales (citoquinas).(1,2).

Se sabe que para que las células o tejidos de un individuo puedan ser aceptadas por otro individuo, deben ser compatibles en sus antígenos, principalmente en el sistema HLA, ya que de lo contrario serán rechazadas, esta reacción de rechazo ha sido bien estudiada tanto in vitro como in vivo (3,4). Así por ejemplo si tomamos linfocitos singénicos de un individuo A y los cultivamos con los linfocitos de un individuo B los cuales han sido previamente irradiados para que éstos no respondan al estímulo de los linfocitos A, a partir del cuarto día de cultivo se observará que aparecen linfocitos citotóxicos específicos contra las células del individuo B (5). Para que esto suceda es necesario la participación de dos interleucinas (IL) la 1 y la 2. La primera es secretada por los macrófagos que va actuar sobre los linfocitos T induciendo la generación de la IL-2 y la aparición de sus receptores en las células. Esta citocina es muy importante ya

que las células citotóxicas la requieren para su activación y proliferación (6,7).

Por otra parte es sabido que las células tumorales pueden ser reconocidas como extrañas y desencadenar la respuesta inmune contra ellas ya que poseen antígenos que pueden ser reconocidos como no propios (8,9). Estos cambios antigénicos en las células tumorales pueden activar en su contra distintos mecanismos de lucha por parte del huésped, uno inespecífico mediado por células asesinas con actividad espontánea, eso quiere decir que no requieren de un previo reconocimiento para atacar a la célula maligna. Entre estas células podemos mencionar las asesinas naturales conocidas como NK, linfocitos asesinos activados (LAK), linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), macrófagos etc. (10,11). También se generan linfocitos citotóxicos los cuales necesitan de un contacto previo con los antígenos tumorales para manifestar su actividad citotóxica, la cual es específica contra las células portadoras de los antígenos que indujeron su capacitación; otras características importantes es que a diferencia de las células citotóxicas naturales su actividad está restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad y crean memoria inmunológica (12).

En 1959 el profesor GEORGE MATHE realizó el primer trasplante de médula ósea con éxito (13) y a partir de esa fecha se observaron en humanos dos eventos importantes en clínica: uno fué

que los linfocitos del huésped eran capaces de eliminar las células trasplantadas, que es el rechazo del injerto del inglés Host vs Graft. En el segundo caso de los linfocitos trasplantados atacaban a la célula y tejidos del huésped, lo cual es conocido como enfermedad de injerto contra huésped, del inglés G vs H (14,15). En la actualidad ambas situaciones pueden ser controladas con inmunosupresores (16). Después el mismo profesor MATHE intentó con cierto éxito el trasplante de médula ósea en pacientes leucémicos y describió otra situación que puede ser importante en clínica, la cual casi no ha sido estudiada, fué lo que llamó injerto contra leucemia conocido en inglés como Graft vs Leukemia (G vs L) y que consiste en la generación de células citotóxicas por parte de los linfocitos trasplantados capaces de matar a las células leucémicas remanentes (17,19). Bajo estas perspectivas es el mismo profesor MATHE quien da origen a lo que ahora en cancerología se conoce como celuloterapia; él trató pacientes leucémicos inyectándoles linfocitos alogénicos reportando el 20% de remisiones (20-21).

Desafortunadamente el concepto de G vs L no ha recibido mucho auge probablemente por la dificultad que tienen los modelos experimentales y que el tratamiento con células alogénicas no fué confirmado por otros grupos. Sin embargo todos estos estudios parecen coincidir en que es posible utilizar la propiedad que tienen las células inmunes para combatir a las células

tumorales mediante reacciones de rechazo tal como ocurre con los injertos por medio de la generación de células citotóxicas específicas y ambientes ricos en IL-2 la cual puede activar a su vez a las células citotóxicas con actividad espontánea de tipo NK.

En este trabajo pretendemos estudiar en un modelo experimental murino si la celuloterapia a base de células alogénicas es decir, mediante el injerto de linfocitos de la misma especie pero defiriendo en el complejo mayor de histocompatibilidad, puede controlar el crecimiento tumoral.

Esto puede beneficiar ya que sería utilizado contra la enfermedad residual después de haber aplicado los tratamientos clásicos y presenta la ventaja de ser una inmunoterapia a bajo costo, ya que los actuales métodos resultan sumamente caros en nuestro medio, y además no requiere de alta tecnología .

JUSTIFICACION

En la actualidad las enfermedades tumorales en todo el mundo constituyen un verdadero problema de salud pública, por ejemplo en los Estados Unidos la AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH informa que cada minuto muere un paciente oncológico, en nuestro país las enfermedades oncológicas ocupan la tercera causa de mortalidad.

Hoy en día los tratamientos clásicos en oncología, la quimioterapia, la radioterapia, y la cirugía jamás brindan la seguridad total de haber erradicado completamente el tumor, (enfermedad residual) y cuando los cánceres están avanzados son ineficaces. Otra seria desventaja es que estos tipos de terapia se ven limitados por la generación de graves efectos colaterales y mutilaciones que ocasionan.

Por esas razones hoy en día para superar estos problemas, en todo el mundo los grupos de trabajo buscan otras alternativas en las diferentes ramas de la Biomedicina, siendo así la Inmunología una de las más prometedoras, la cual se basa en que las propias defensas del organismo pueden eliminar a las células malignas ya que éstas son reconocidas como extrañas.

Existen diversas formas de inmunoterapia antitumoral casi todas ellas en estudio y con costos muy altos, sin embargo existe

documentación para suponer que la celuloterapia a base de linfocitos isogénicos puede ser de alguna utilidad mediante la generación de células citotóxicas e interleucinas que ocurren normalmente durante las reacciones de rechazo de injertos; es probable que el trasplante de linfocitos alogénicos puedan destruir células tumorales en el huésped portador de una neoplasia.

Lo anterior potencialmente constituye una buena alternativa ya que no requiere de altos costos ni de alta tecnología y podría ser útil como adyuvante de los tratamientos clásicos en cancerología.

HIPOTESIS

El trasplante intraperitoneal de linfocitos alogénicos pueden inhibir el crecimiento intraperitoneal del linfoma L5178Y en ratones.

OBJETIVOS**GENERAL:**

- 1.- Establecer un modelo sencillo y económico para el estudio de la utilización terapéutica de los fenómenos de trasplante en oncología.

PARTICULARES:

- 1.- Determinar si la administración intraperitoneal de los linfocitos esplénicos de ratones C57BL/6 aumenta la supervivencia de ratones BALB/C previamente inoculados con células tumorales L5178Y.
- 2.- Determinar la participación de las células T involucradas en la reacción antitumoral.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES; Se utilizaron 5 ratones machos por grupo de 6 a 8 semanas de edad BALB/C, (BC) C57BL/6, (B6) Y DBA-2 (D2), procedentes del centro de reproducción animal del C.I.B.O. del I.M.S.S.

CELULAS TUMORALES: Se utilizó el linfoma murino L5178Y (H2B) de origen tímico el cual se mantuvo in vivo mediante pasajes semanales de 2×10^4 células las cuales matan a los ratones en aproximadamente 15 ± 2 días.

OBTENCION DE CELULAS:

LINFOCITOS: Se sacrificaron los animales por descerebración cervical y posteriormente a recuperar los bazoos asepticamente, se disgregaron las células entre dos porta objetos y resuspendieron en solución salina balanceada de HANKS (HBSS) (Sigma); se determina la viabilidad mediante exclusión con azul tripano (Sigma), y se ajustan las células a la concentración deseada.

HEPATICAS: Al sacrificio de los animales se recuperan los hígados asépticamente, se disocian las células en un homogenizador, se lavan y resuspenden en solución salina balanceada (HBSS) (Sigma), y se determina la viabilidad mediante exclusión con azul tripano y se ajustan a la concentración deseada.

SOBREVIDA DE RATONES: A ratones BC, se inyectó el día 0 vía intraperitoneal 2×10^4 células tumorales, 24 hrs. después se inyectaron por la misma vía 40×10^6 linfocitos de ratones B6, o D2; como controles se utilizaron ratones inyectados exclusivamente con células tumorales o linfocitos singénicos, y se recupera la sobrevida diariamente con el fin de comprobar la participación activa de los linfocitos alogénicos. En un segundo experimento 24 hrs. después que los ratones BC hayan recibido las células tumorales (2×10^4) son tratados por vía intraperitoneal con linfocitos singénicos, otro grupo con linfocitos alogénicos, con el propósito de descartar la posibilidad que los resultados obtenidos sean diluidos a la manipulación de los animales.

Un tercer grupo los ratones BC que recibieron células tumorales, fueron transferidos tres días después con diferentes dosis de células esplénicas D2, 10, 20 y 40×10^6 .

Con el propósito de estudiar la reacción de manera unidireccional a un cuarto grupo de ratones BC fueron inyectados con la misma cantidad de células hepáticas alogénicas 40×10^6 sin que contengan linfocitos.

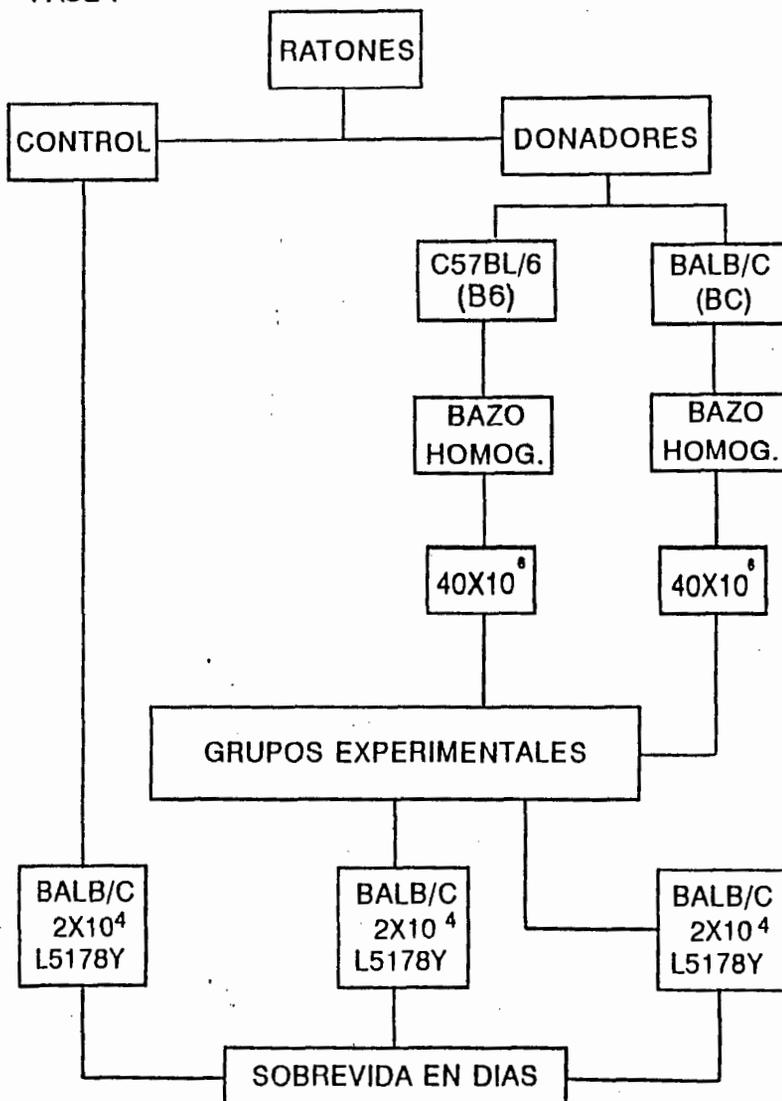
Se efectuó un quinto experimento en las mismas condiciones que el primero para determinar el tipo de célula efectora, por Inmunofluorescencia indirecta, y con anticuerpos monoclonales

Lyt 1 se comprobó que el 80% de las células inyectadas eran linfocitos T, los ratones BC portadores del linfoma serán tratados con linfocitos T de ratones B6 previamente separados mediante un pasaje por una columna de nylon (22). En todos los casos los experimentos se repetirán dos veces.

Analisis Estadístico: Prueba no paramétrica de Mantel-Haensel (log-rank) para datos apareados.

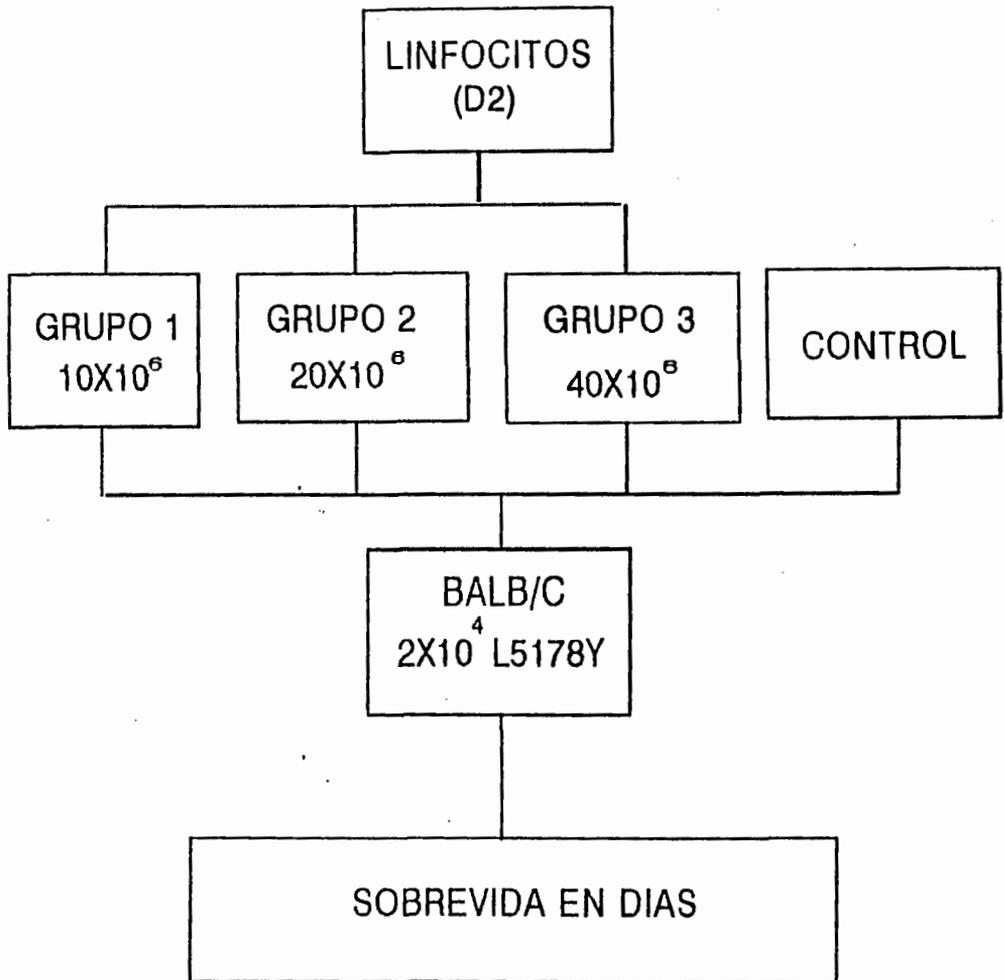
TRANSFERENCIA DEL EFECTO ANTITUMORAL MEDIANTE CELULAS ALOGENICAS DE BAZO

FASE I



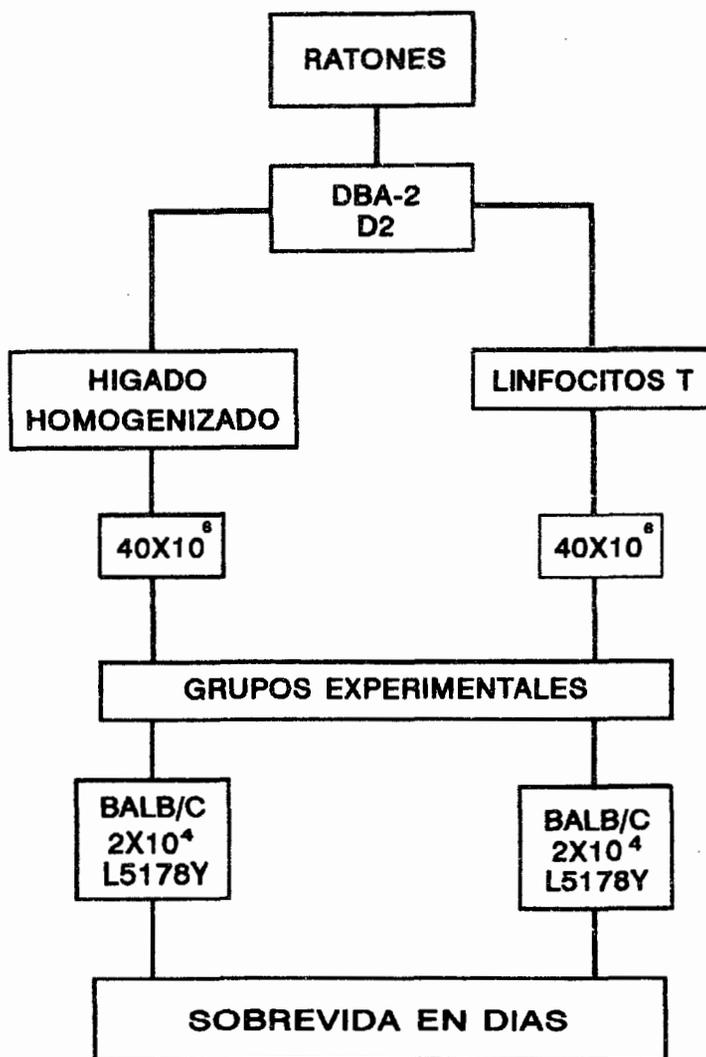
TRANSFERENCIA DEL EFECTO ANTITUMORAL
MEDIANTE CELULAS ALOGENICAS DBA-2.

FASE II



TRANSFERENCIA DEL EFECTO ANTITUMORAL MEDIANTE CELULAS HEPATICAS Y LINFOCITOS "T"

FASE III



RESULTADOS

En un primer tiempo con el objeto de observar si la transferencia de linfocitos alogénicos puede ser útil en el control de crecimiento de células tumorales, a un grupo de 5 ratones BC se inocularon intraperitonealmente con 2×10^4 células tumorales L5178y y tres días después se transfirieron 40×10^6 células esplénicas de ratones B6 y se procedió a determinar la sobrevida.

En la Fig. 1 claramente se puede observar que el grupo control que no fué tratado con células esplénicas sobrevivió menos tiempo (30 ± 1 días) que el grupo de ratones que recibieron linfocitos alogénicos los cuales sobrevivieron en promedio (36 ± 3) días ($P < 0.05$), sugiriendo que los linfocitos no compatibles puedan ser de alguna utilidad.

Los ratones BC inoculados con el linfoma como en los experimentos anteriores recibieron transferencia ya sea de 40×10^6 células esplénicas isogénicas (BC) o alogénicas (B6). Los resultados en la fig. 2 muestran que los ratones tratados con linfocitos singénicos mostraron estrictamente la misma sobrevida que los ratones BC no tratados (28 ± 2 días), en cambio en los ratones transplantados con células esplénicas alogénicas (B6) mostraron una sobrevida significativamente mayor (36 ± 3 días), sugiriendo que nuestra observación es debida a la presencia de células alogénicas y no a la manipulación de animales.

En un segundo tiempo con la finalidad de estudiar si la observación precedente era debida a una combinación genética especial y para determinar las condiciones ideales, se procedió a repetir el experimento anterior pero en este caso los grupos de ratones BC experimentales fueron transferidos 3 días después del inóculo de células tumorales (2×10^4) i.p. con diferentes dosis de células esplénicas de ratones D2 los cuales también difieren genéticamente de los ratones BC; en la Fig.3 los resultados obtenidos muestran un efecto dosis dependiente en los ratones portadores de tumor tratados con linfocitos alogénicos, así el grupo de animales que recibió solamente 5×10^5 células esplénicas de D2 sobrevivió prácticamente el mismo número de días que el grupo control no transferido con células esplénicas (30 ± 0.5) (dato no mostrado) sin embargo los grupos de ratones tratados con $10, 20, 40, \times 10^5$ células esplénicas de ratones D2 sobrevivieron $36 \pm 0.4, 43 \pm 2$ y 45 ± 0.5 días respectivamente, siendo estadísticamente significativa la diferencia de estos grupos comparados con el control ($p=0.05$) y también entre los grupos tratados con 40×10^5 células esplénicas alogénicas $P=(0.05)$.

Estos resultados en su conjunto nos sugieren que el fenómeno observado no es específico de una variedad genética y se expresa de una manera dosis dependiente.

Con la finalidad de estudiar el mecanismo de acción se diseñaron dos experimentos: el primero tenía como objeto investigar si las células inmunes del huésped jugaban algún papel en nuestras observaciones; con el mismo seguimiento se evaluó la sobrevivencia de ratones BC portadores del tumor L5178Y y transferidos el tercer día, en lugar de que los linfocitos alogénicos como en las otras ocasiones, en esta vez fué con células hepáticas alogénicas. Los resultados en la Fig. 4 muestran sin ambigüedad que los ratones controles no tratados y los transferidos con células hepáticas alogénicas (D2) sobrevivieron el mismo número de días (33 ± 1 y 32 ± 3 días respectivamente) sugirieron que las células inmunes transferidas juegan un papel determinante en el aumento de la sobrevivencia.

En el segundo experimento se realizó la determinación del papel de los linfocitos T esplénicos alogénicos en función de que es bien conocido que las células T juegan un papel primordial en las reacciones de rechazo (6); nosotros repetimos el experimento con células T purificadas para observar si se repetía esta condición, para lo cual se pasó a purificarlos por medio de la adherencia a columnas de nylon donde más del 85% de las células no adherentes eran linfocitos T.

Después de haber inoculado a los ratones BALB/C con células tumorales, tres días después se transfirieron con células T esplénicas y encontramos que los resultados de sobrevivencia de este

grupo fueron mayores (38 ± 0.9 días) que el grupo no tratado (30 ± 2 días) y comparables a los obtenidos en la población total Fig. 5.

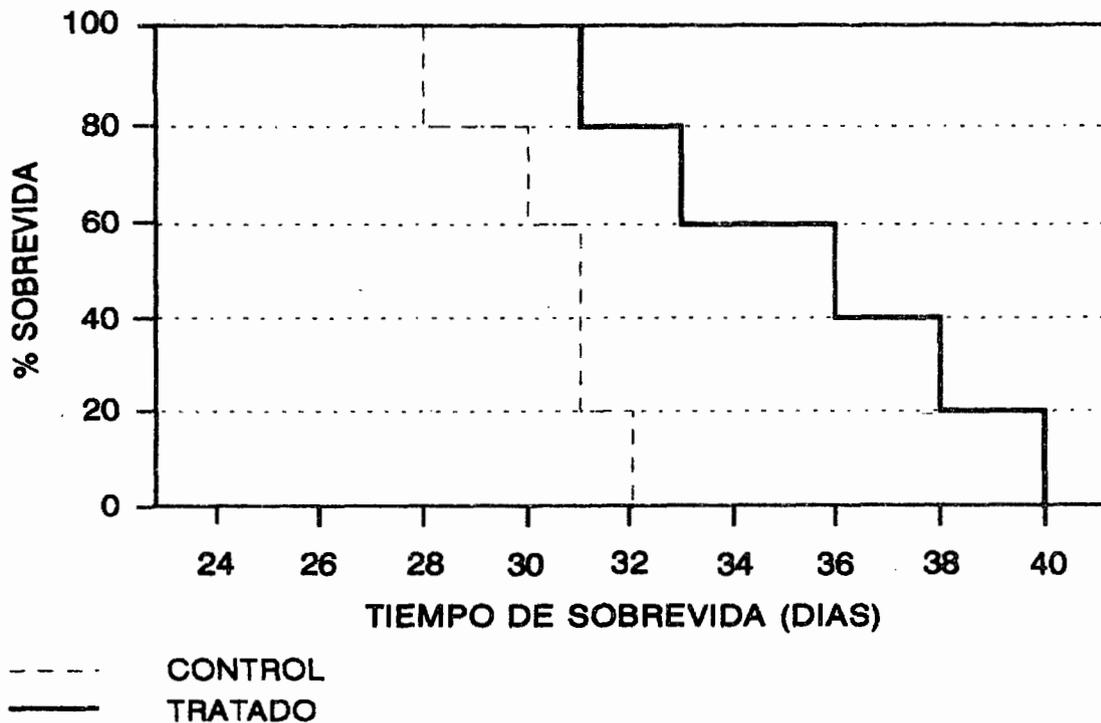


FIG.1 SOBREVIVA DE RATONES BALB/C PORTADORES DEL LINFOMA L5178Y, TRATADOS CON 40×10^6 CELULAS ALOGENICAS (B6).
 ANALISIS ESTADISTICO: PRUEBA DE MANTEL-HAENSEL. $p < 0.05$ $n = 5$

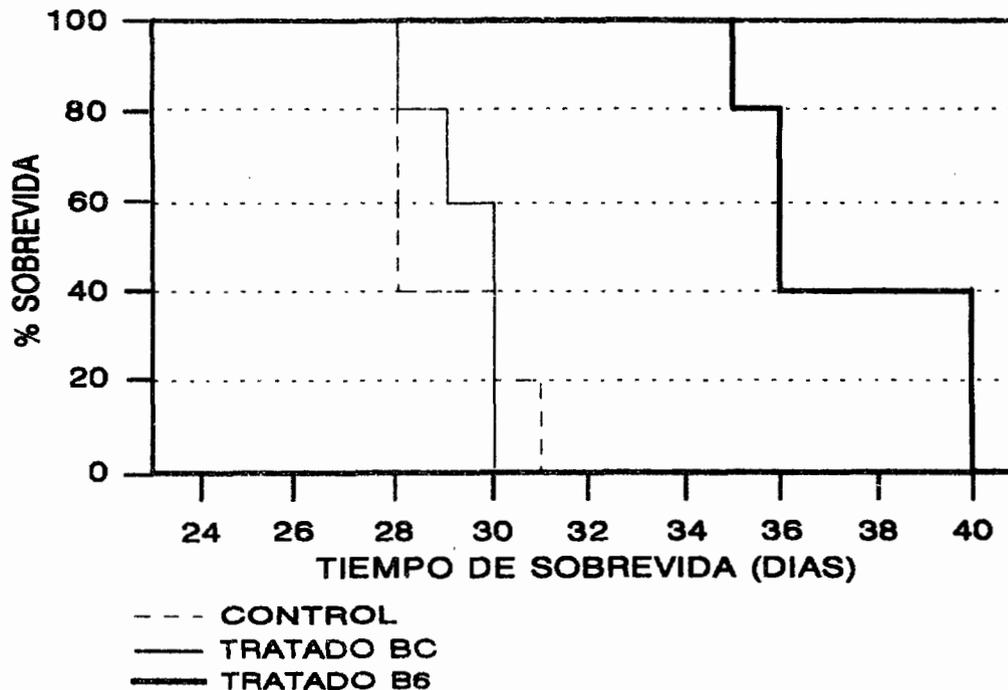
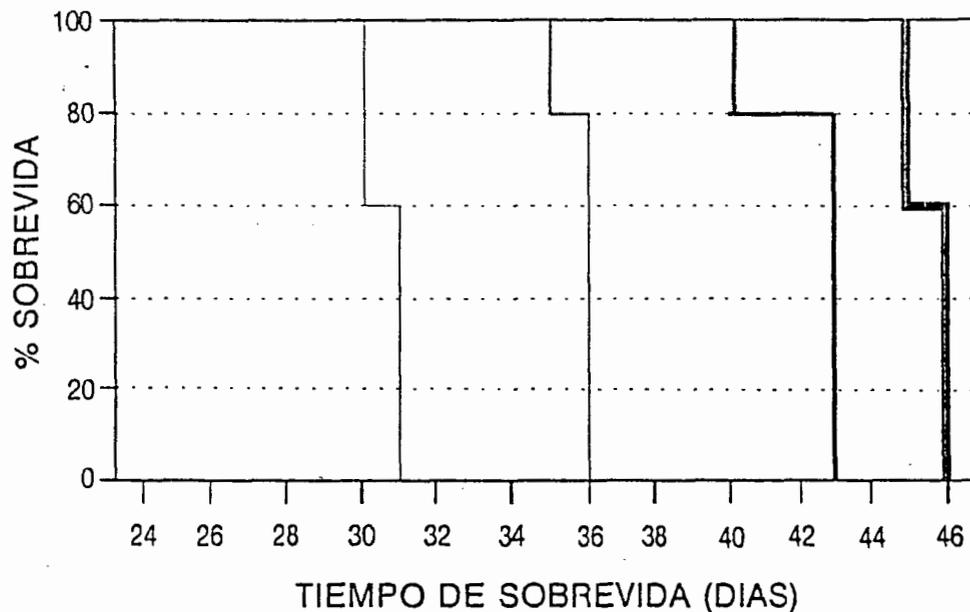


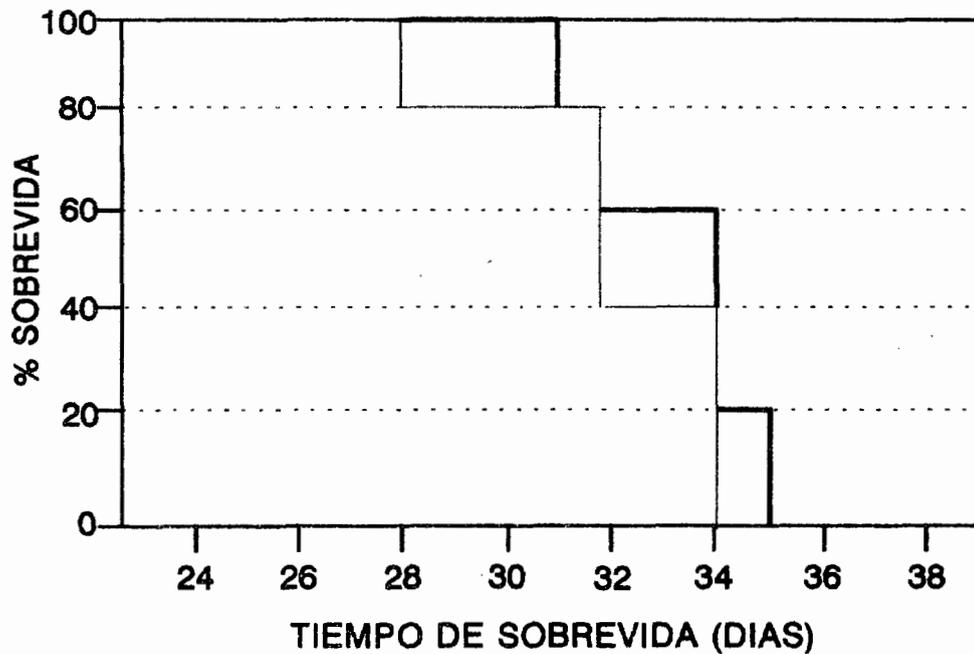
FIG. 2 SOBREVIDA DE RATONES PORTADORES DE LINFOMA L5178Y TRATADOS CON CELULAS ALOGENICAS (B6) Y SINGENICAS (BC) 40×10^6
 PRUEBA DE MANTEL-HAENSEL $p < 0.05$ $n = 5$.



— CONTROL
 — C.A. DE 10X10⁶
 — C.A. DE 20X10⁶
 — C.A. DE 40X10⁶

FIG. 3 SOBREVIDA DE RATONES BALB/C PORTADORES DE LINFOMA L5178Y, TRATADOS CON DIFERENTES NUMEROS 10,20 Y 40X10⁶ DE CELULAS ALOGENICAS (D2).

ANALISIS ESTADISTICOS: PRUEBA MANTEL-HAENSEL. $p \leq 0.05$ $n=5$.



— CONTROL
 - - - TRATADO D2

FIG. 4 SOBREVIVENCIA DE RATONES BABL/B/C PORTADORES DE LINFOMA L5178Y TRATADOS CON 40×10^6 CELULAS HEPATICAS ALOGENICAS (D2).

ANALISIS ESTADISTICO: PRUEBA DE MANTEL-HAENSEL $p < 0.05$ $n=5$.

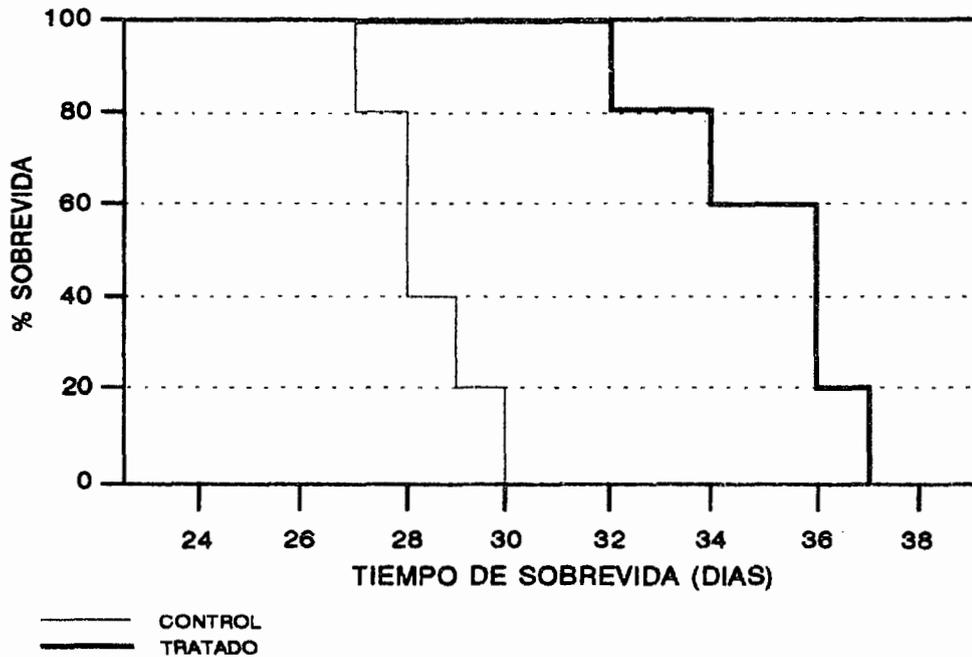


FIG. 5 SOBREVIVENCIA RATONES BALB/C PORTADORES DE LINFOMA L5178Y TRATADOS CON 40×10^6 LINFOCITOS T ALOGENICOS (B6).

ANALISIS ESTADISTICO: PRUEBA MANTEL-HAENSEL $p < 0.001$ $n=5$.

DISCUSION

Nuestros resultados muestran que cuando los ratones portadores de tumor son transferidos con células esplénicas alógenicas sobreviven más que los controles.

Esta observación fué confirmada con dos cepas de ratones diferentes el C57BL/6 y DBA/2, los cuales genéticamente son incompatibles entre si, esto es interesante porque sugiere que el fenómeno no es específico de una variedad genética en especial, sino más bien se trata de una respuesta de tipo genérico. También es importante remarcar que nuestros resultados de sobrevivencia de ratones portadores de tumor fueron dosis-dependientes, lo que en parte confirma que nuestras observaciones sí son debidas a la presencia de células esplénicas alogénicas.

Por otra parte si tomamos todos los experimentos en conjunto, se observará cierta variación en cuanto al número de días que sobrevivieron los animales controles o tratados. Sin embargo en todos los experimentos se observa el mismo comportamiento. Probablemente esta variabilidad se deba a las condiciones del Bioterio.

En este trabajo también se efectuaron experimentos para confirmar y determinar la especificidad de nuestras observaciones;

En primer lugar sólo se prolonga la sobrevida de los ratones portadores del tumor cuando se inyectan con linfocitos alogénicos y no singénicos, lo que sugiere que es un efecto específico y que sí ocupa la existencia de un fenómeno de rechazo, el cual parece ser mediado por los linfocitos alogénicos transferidos ya que cuando se transfirieron células hepáticas no se modificó la sobrevida de los ratones portadores del tumor, situación que es de esperarse ya que en los animales portadores del tumor existe inmunosupresión lo que podría impedir que se establezca de manera efectiva un rechazo de injerto unidireccional.

Finalmente mediante la purificación de células se determinó que efectivamente los linfocitos T juegan un papel muy importante que apoya la idea de un rechazo inmunológico a las células tumorales.

Estos resultados en su conjunto sugieren que las observaciones hechas por el grupo de médicos Villejuif puedan tener fundamento, y que es posible a bajo costo establecer un modelo confiable de injerto contra célula tumoral (G vs L). Los resultados de este tipo de estudios pueden llegar a tomar consideración clínica.

CONCLUSION

La transferencia de células esplénicas alogénicas prolonga la vida de ratones portadores del tumor.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abbas, A.K; and Pober, J.S.: General properties of immune responses."in Cellular and Molecular Immunology," Abbas, A.K. Lichtman, A.H; and Pober, J. S. (eds), W.B. Saunders company, Philadelphia U.S. pp 3-13, 1991.
- 2.- Arai, K; Lee, F; Miyajima, A; S, Miyatake; N. Arai; and Yacota. T: Citokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. Annual of Biochemistry 59: 783-836, 1990.
- 3.- Clift, R; and Storb, R.: Histoincompatible bone marrow transplants in humans. Annual Review of Immunology. 5: 43-64, 1987.
- 4.- Hayry, P: Anamnestic responses in mixed lymphocyte culture-induced cytotoxicity (MLC-CML) reaction. Immunogenetics 3: 417-453, 1976.
- 5.- Barbati, A; Franceschini, F; Bravo-Cuellar, A; Osculati, A; Accordini, C; and Orbach-Arbouys, S.: Allo-activated CD4+ and lymphocyte subsets: New ultrastructural findings based on computer-assisted image analysis. Eur J. Haematol. 44: 178-185. 1990
- 6.- Bravo-Cuellar, A; Martin-Ruiz, J.L.; Ramos Zepeda, R; Puebla-Perez, A.M; Xu-Hui, L; y Orbach-Arbouys, S.: Incremento a la respuesta proliferativa y citotóxica a la estimulación

- aloantigénica de células esplénicas de ratones tratados con aclacinomicina. Arch. Invest. Med. 21: 331-337, 1990.
- 7.- Ehrke, M.J; Macubben, D; Royayama, K; Cohen, S. A; and Mihic E.: Correlation between Adriamycin-induced augmentation of interleukine-2 production and cell-mediated cytotoxicity in mice. 46: 44-48, 1986.
 - 8.- Burnet B (ed) Immunological surveillance. Pergamon Press, Osford, pp 1-28, 1969.
 - 9.- Klein J.: Experimental studies in tumor immunology. Federation Proc. 28: 1739-1746, 1969.
 - 10.- Bravo-Cuellar, A; Scott-Algara, D; Metzger, G; and Orbach-Arbouys, S.: Enhanced activity of mouse peritoneal cells after aclacinomycin administration. Cancer Research 47: 3477-3488. 1987.
 - 11.- Rosenberg, S.A; Spiess, P; and Lafreniere R.: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. Science 233: 1318-1321, 1986.
 - 12.- Mason, D. W; and Morris, P. J.: Effector mechanisms in allograft rejection. Annual Review of Immunology 4: 119-145 1986.
 - 13.- Mathe, G; Jammet, H; Pendic, B; Schwarzenber, L; Duplan, J. F; Mauripin, B; Latarjet, R; Larrieu, M. J; Kalic, D;

- Djukic, Z.: Transfusions et greffes de moelle oseuse homologue chez des humains irradiés a haute dose accidentellement. Rev. Franc. Etud. Clin. Biol. 4: 226-229, 1959.
- 14.- Tutschka, P. J.: Graft vs host disease: Immunobiological aspects. Haematol. Blut. Transfus. 28: 97-101, 1983.
- 15.- Wingard, J.R; Curbow, B; Baker, F; and Piantadosi, S: Health, functional status, and employment of adult survivors of adult survivors of bone marrow transplantation Ann. Intern. MED. 114: 113-118, 1991.
- 16.- Kahan, B.D.: Cyclosporine. New Engl. J. of Med. 321: 1725-1738, 1989.
- 17.- Mathe. G; Amiel, J. L; Schwarzenberg, L; Cattani, and Schneider, M: Haemopoietic chimera in man after allogenic (homologous) bone marrow transplantation. Control of secondary syndrome. Specific tolerance due to the chimerism. Brit. Med. J. 5373: 1663-1639, 1963.
- 18.- Mathe, G; Amiel, J. L; Schwarzenberg, L; et al.: Successful allogenic bone marrow transplantation in man Chimerism induced specific tolerance and possible antileukemic effects. Blood 25: 179-184, 1965.

- 19.- Offit, K; Burns, J.P; Cunningham, I; et al. Cytogenetic analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic myelogenous leukemia patients after T cell-depleted bone marrow transplantation. 75: 1346-1355 1990.
- 20.- Schwarzenberg, L; Mathe, G; Schneider, M; Amiel, J,L; Cattan, A; and Schlumberger, J.R; Attempted adoptive immunotherapy of acute leukemia by leukocyte transfusions. Lancet 2 (459): 365-368, 1966.
- 21.- Mathe, G; Schwarzanberg, L; Amiel, L. L; Cattan, A; Schneider, M; and Schlumberger, J.R; Adoptive Immunotherapy (by bone marrow graft or leukocyte transfusion) or acute leukemias. Sem-Hop-paris 43 (7): 450-457, 1967.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente

Número

Sección

C. IRMA VARGAS MEDINA
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado el tema de Tesis "INHIBICION DEL CRECIMIENTO DEL LINFOMA MURINO L5178Y MEDIANTE LA UTILIZACION DE LINFOCITOS ISOGENICOS", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M. en C. Alejandro Bravo Cuellar

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "
"AÑO DEL BICENTENARIO"

Guadalajara, Jal., 08 de Octubre de 1992.

EL DIRECTOR



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

M. EN C. JUAN LOIS CIFUENTES LEMUS

EL SECRETARIO

BIOL. JESUS ALBERTO ESPINOSA ARIAS

c.c.p.- M. en C. Alejandro Bravo Cuellar, Director de tesis pte.-
c.c.p.- El expediente del alumno.

JLCL>JAEA>Cg1r.

Al contestar este oficio cifrese fecha y número

C.
 Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
 de la Universidad de Guadalajara

P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a
 Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el
 (la) Pasante IRMA VARGAS MEDINA
 código número 082347968 con el título INHIBICION DEL
CRECIMIENTO DE LINFOMA MURINO L5178Y MEDIANTE LA UTILIZACION
DE LINFOCITOS ALOGENICOS.

consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión
 de la misma y la realización de los exámenes profesionales
 respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya
 lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 20 de SEPTIEMBRE 1993

EL DIRECTOR DE TESIS

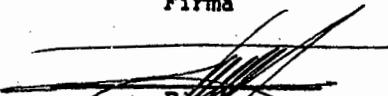


SINODALES

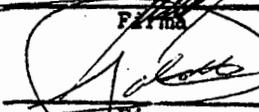
1. Biol. Maricela G. Mendoza M.
 Nombre completo


 Firma

2. Eduardo Vazquez Valls.
 Nombre completo


 Firma

3. Oswaldo S. Palacios Rivera
 Nombre completo


 Firma



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE

SEPTIEMBRE 03, 1993.

C. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P r e s e n t e .

Por medio de este conducto, comunico a usted que la C. IRMA VARGAS MEDINA, Pasante de la licenciatura en Biología, con el número de registro 082347968, ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado: "INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE LINFOMA MURINO L5178Y MEDIANTE LA UTILIZACION DE LINFOCITOS ALOGENICOS". El cual se llevó a cabo en el laboratorio de Inmunología de Tumores a mi cargo en la División de Patología Experimental del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS.

Asimismo, le informo que al revisar el manuscrito de la tesis este cumple con los requisitos establecidos por la H. Comisión de Tesis de la Facultad de Ciencias Biológicas, por lo que no tengo inconveniente para su impresión.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un afectuoso saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. en C. Alejandro Bravo Cuellar.