

45
2 eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD AL
CRECIMIENTO DE UNA LINEA CELULAR
TUMORAL MURINA DEFICIENTE EN LA
EXPRESION DE ANTIGENOS CLASE
1 DEL CMH.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :

DIAZ HERRERA GEORGINA



MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD AL CRECIMIENTO DE UNA
LINEA CELULAR TUMORAL MURINA DEFICIENTE EN LA
EXPRESION DE ANTIGENOS CLASE I DEL CMH.**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista
por
Diaz Herrera Georgina.

Asesores: M.V.Z. Ciro Lomeli y Flores.
y
Dr.IB. Raúl Barrera Rodriguez.

México, D.F.

1994.

DEDICATORIA

*Con mucho cariño dedico este trabajo a mi esposo y a mi hijo,
que son el estímulo de mi superación y a mis padres por su
apoyo.*

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Mis asesores por su incondicional apoyo y amistad.

**A mis compañeros de trabajo del bioterio del Instituto de
Investigaciones Biomédicas de la UNAM.**

y

**A todas aquellas personas que con su apoyo hicieron
posible la realización de este trabajo.**

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	16
RESULTADOS.....	18
DISCUSION.....	29
LITERATURA CITADA.....	33
FIGURAS.....	36
CUADROS.....	51
GLOSARIO.....	53

RESUMEN

DÍAZ HERRERA , GEORGINA. Estudio de la susceptibilidad al crecimiento de una línea celular tumoral murina deficiente en la expresión de antígenos clase I del CMH. (Bajo la dirección de : MVZ Ciro Lomelí y Flores y el Dr. IB. Raúl Barrera Rodríguez). Se utilizó un total de 192 ratones de 10 a 12 semanas de edad de las cepas singénicas BALB/cAnN, C57Bl/6J, e híbridos F1 y F2 de las cepas anteriores y animales resultado de la retrocruza entre los F1 y la cepa progenitora resistente con el fin de estudiar los patrones de heredabilidad de las características de resistencia y susceptibilidad a la muerte provocada por la inoculación de una línea celular tumoral murina deficiente en la expresión de antígenos clase I del CMH, denominada LF.c1. Se propone que estas características son transmitidas por un gen con dos variedades alélicas y que se expresa en forma codominante, aunque son necesarios análisis posteriores. Debido a que se conoce en forma detallada el mapa genético del ratón, lo hace ser el modelo casi perfecto para el estudio de la genética de mamíferos, que junto con la inmunología tumoral y los análisis inmunoquímicos den por resultado formas efectivas para la inmunoterapia del cáncer tanto de los animales como del hombre.

INTRODUCCION

En éste trabajo se empleó una línea celular tumoral de origen murino denominada LF.c1, que es una clona derivada de la línea celular linfoblastoide de estirpe T, denominada L5178Y; esta última fué inducida químicamente con metilcolantreno (MC) en ratones DBA/2J (Haplotipo H-2^d) (14).

La clona LF.c1, crece en la estirpe en la que fué originada, en DBA/1 que es una sublínea de la anterior y en las siguientes cepas BALB/cAnN, C.B6-H-2b, C.C3-H-2k, A/J, AKR/J, C3H/HeJ, C3HeB/FeJ y C57Bl/6J que ofrecen barreras alogénicas porque son haplotipos b, k y k/d.; ocasionando la muerte en todas las cepas de ratones, con excepción de la cepa C57Bl/6J (H-2^b). En esta última cepa el tumor crece, pero posteriormente es rechazado, a través de una respuesta inmune compleja en la que intervienen anticuerpos y células citotóxicas (1).

El crecimiento a través de barreras alogénicas, así como la falta de expresión de RNA mensajero y proteínas de los H-2^d en la membrana plasmática (1), sugirió que ésta línea celular tumoral no expresa ninguno de los antígenos clase I del H-2; por lo que la respuesta inmune antitumoral generada por la cepa C57Bl/6J puede estar mediada por otro antígeno (s).

ANTECEDENTES.

El ratón de laboratorio, descendiente del ratón doméstico común (*Mus musculus*), ha sido empleado por el hombre desde la antigüedad, en algunos casos para comprender su propia naturaleza a través del conocimiento de ellos, o bien, con fines prácticos para su beneficio inmediato. Las primeras referencias históricas del uso de animales como sujetos de experimentación científica se remontan a cuatro siglos antes de Cristo, en los escritos de Aristóteles (384 - 322 A.C.), posteriormente por el médico Inglés William Harvey (1578 - 1657) fundador del método experimental , fué quien empleó por primera vez a los ratones en estudios de Anatomía Comparada (6).

Es en el siglo XVII, con el nacimiento de las ciencias biomédicas, que se dá énfasis al empleo de los ratones como sujetos de experimentación. Durante éste período la Biología abandona los límites de una ciencia puramente descriptiva para entrar de lleno al campo de la experimentación científica, creandose un hábitat nuevo y diferente para éstos animales, **el Laboratorio**. Es entonces, cuando el hombre descubre la enorme utilidad de los ratones como sujetos de experimentación científica, por su fácil adaptación a dicho ambiente (6).

Paralelo a los avances de la investigación científica, surge la necesidad de seleccionar a los animales de acuerdo al proposito de la investigación, lo cual, va conformando la identidad del ratón de laboratorio como un individuo

seleccionado por sus características específicas. La absoluta necesidad de disponer de material biológico idóneo ha conducido a la investigación biomédica durante el presente siglo al desarrollo de múltiples cepas de ratones, con una constitución genética definida, un estado nutricional y de salud conocidos (6,11). El desarrollo de los ratones como sujetos de experimentación científica está desde sus orígenes, vinculado al estudio del cáncer. Así como en 1903, Jensen logra la propagación de un carcinoma alveolar espontáneo en una cepa particular de ratones consanguíneos (blancos) durante 19 generaciones consecutivas de ratones de esa misma colonia. En 1908, Leo Loeb hizo un hallazgo similar y logra la propagación de un tumor en ratones "Waltzing" que ahora sabemos que estos ratones habían sido mantenidos en el lejano oriente en cruza consanguíneas durante muchas generaciones; estas observaciones fortalecían las hipótesis de que el cáncer era una enfermedad hereditaria. Para 1909, Tyzzer realiza el primer análisis genético de resistencia al trasplante tumoral y en 1914 desarrolla una hipótesis para explicar este fenómeno, afirmando que las células cancerosas eran diferentes a las células normales y por eso era rechazado el tumor, sin embargo esto explicaba el 50% del fenómeno, ya que no explicaba el porque el tumor crecía cuando era trasplantado en animales de la misma colonia. En éste mismo año, Little propone una teoría en la que explica el comportamiento genético del trasplante tumoral. En 1916, Little y Tyzzer demuestran que algunos de

los genes dominantes de susceptibilidad influyen fuera del tumor alogénico injertado. En 1929, W.H. Woglom propone que la regresión de tumores trasplantados es ocasionada por una respuesta inmune por parte del receptor. En 1932, Lumsden demuestra la inmunidad contra células tumorales. La observación básica en los estudios de cáncer era que los tumores fracasan cuando se trasplantan a receptores genéticamente diferentes, por lo que el trabajo con las cepas consanguíneas condujo a pensar que el número de genes responsable por el éxito o fracaso del crecimiento tumoral varía de 2 a 15 genes, pero la naturaleza de los genes y el mecanismo responsable por la regresión de tumor eran aún desconocidas (6, 11, 12).

COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CMH).

En 1933, Haldane visita a W.H. Woglom en New York, quien estudiaba el mecanismo de resistencia del receptor al trasplante tumoral, apoyando así las teorías de Haldane, que en ese mismo año propone que el rechazo de los tumores se debe a la presencia de aloantígenos que también se encuentran presentes en las células normales (11, 12).

Peter Gorer, patólogo que trabajaba en el Instituto Lister en Londres, en 1936 escribió cinco artículos, los dos primeros sobre la fisiología de la hibernación, el tercero sobre los diferentes antígenos de los eritrocitos del ratón y los dos últimos

sobre el H-2 del ratón, descubriéndose entonces el complejo mayor de histocompatibilidad del ratón. Con este descubrimiento, dos tendencias de investigación se fusionaron: el estudio de la influencia de genes sobre el resultado del trasplante de tumor y, la investigación de los genes que controlan los antígenos de los grupos sanguíneos, llegando a la conclusión de que el rechazo a el trasplante tumoral está mediado por antígenos presentes tanto en células normales como en células neoplásicas (11, 12).

En la actualidad está bien establecido el concepto de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), definido como: Un grupo de genes que codifican para antígenos de superficie celular y cuya función principal es el reconocimiento de lo propio y lo extraño, a través de linfocitos T (LT) (9, 10, 11)

El CMH en el humano se denomina sistema HLA, que es el equivalente al sistema H-2 en el ratón (5, 9). Se conoce en forma detallada el mapa genético de la región cromosómica que codifica para los productos fenolípícos (7, 9), tanto del HLA en el humano como del H-2 en el ratón (5, 9, 10).

El CMH mide dos centimorgans (cM) y su localización en el cromosoma 17 es la siguiente: a 30 cM del centrómero y a 15 cM del telómero, entre los loci *Gló-1* y *Ce-2* (9, 10) (Fig. 1). El CMH comprende tres clases de genes (clase I, II y III), involucrados en el reconocimiento y respuesta inmune hacia antígenos. Los antígenos clase I, en el ratón, están ubicados en el cromosoma 17 y se

encuentran codificados por cuatro loci: H-2K, H-2D/H-2L, Qa-2,3 y Tla. Los antígenos K, D y L se expresan normalmente en todas las células del organismo y su función es dirigir el reconocimiento y rechazo de células malignas o infectadas por virus, a través de linfocitos T citotóxicos (LTC) y células asesinas naturales (CAN) (4, 7, 10, 16) (Fig. 2). Los antígenos Qa-2,3 y Tla son menos polimórficos y se expresan solo en algunos tejidos (9).

Los antígenos clase I son heterodímeros de membrana, formados por dos cadenas glicoproteicas, una pesada de 43 KDa y la otra ligera de 12 KDa (15). La cadena pesada está dividida en tres regiones funcionales:

- a) Extracelular
- b) Transmembranal
- c) Citoplásmica.

a) La región extracelular está formada por más de 280 aminoácidos, por lo que representa la mayor parte de la cadena glicoproteica; su estructura presenta tres dominios denominados como $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. La cadena ligera sólo presenta un dominio extracelular denominado β -2 microglobulina (5, 9, 10) (Fig. 3).

El progresivo descubrimiento de la participación del CMH en varios de los eventos de la respuesta inmune intensificó su estudio. Así, hasta la fecha se continúa explorando el CMH en muchos vertebrados y en especial en el ratón donde la posibilidad de utilizar cepas endogámicas permitió identificar casi todos los loci y

establecer sus posiciones asociándolos con sus productos fenotípicos. (11, 12). Como la función global del CMH es regular la función inmune, resulta lógico suponer que estos genes también tendrán influencia en la susceptibilidad a enfermedades o reacciones en las cuales las respuestas inmunitarias desempeñan un papel importante, por lo tanto, la selección de antígenos específicos de histocompatibilidad ofrece grandes posibilidades de aplicación para la selección genética de animales resistentes a ciertas enfermedades (11, 12).

RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL.

En el reconocimiento y rechazo de un tumor, los LTC reconocen moléculas de la célula tumoral en el contexto de los antígenos clase I, causando su destrucción (13, 14).

Existe evidencia de la gran importancia que tienen los antígenos de histocompatibilidad en el reconocimiento, rechazo o progresión tumoral dentro de la fisiopatología del cáncer; cambios en la expresión de uno, varios ó todos los productos de los genes del sistema H-2, determinan variaciones importantes en su capacidad invasiva y aún en la producción de metástasis (2, 6, 8, 14).

La falta de expresión, la supresión ó el enmascaramiento de los antígenos clase I, permite a la célula tumoral escapar del reconocimiento de los LTC, conduciendo al crecimiento tumoral (12, 13). Se han reportado varios casos de líneas celulares

tumorales de origen murino y humano que no expresan éstos antígenos debido a mutaciones, deleciones ó hipermetilación de los genes (8, 9, 15).

HERENCIA MENDELIANA

El monje austriaco Gregor Mendel (1822-1884) como resultado de sus trabajos e investigaciones descubre las Leyes Básicas de la Genética en eucariotes. Mendel publicó estos conocimientos en la reunión de la Sociedad de "Brünn" para el estudio de las Ciencias Naturales y publicó sus resultados en las actas de esta sociedad en 1866. La importancia de sus descubrimientos no fué apreciada por los biólogos de su tiempo, por lo que fueron relegados durante casi 35 años.

En 1900, Hugo de Vries en Holanda, Karl Correns en Alemania y Eric von Tschermak en Austria redescubrierón, cada uno por su cuenta, las Leyes de la herencia descritas por Mendel. La investigación bibliográfica que forma parte de cualquier investigación científica los condujo hasta el artículo de Mendel, en el cual dichas leyes habían sido claramente postulados 34 años antes. Estos investigadores otorgaron a Mendel el crédito y se postularon así las "Leyes Básicas de la Herencia de Mendel".

Mendel también estableció el principio de la Dominancia que establece esencialmente que en cualquier híbrido de la generación filial 1 (F1) el factor hereditario presente en uno de los padres enmascara al correspondiente del otro

progenitor. El factor hereditario que se expresa en la generación F1 es llamado dominante, el factor que es ocultado se llama recesivo (18).

Las conclusiones de Mendel derivados de las cruzas monohíbridas estaban basadas en su concepto de unidades de caracteres; los elementos físicos (genes) se concibieron en pares a partir de la adecuada evidencia experimental. Estos determinantes de las unidades de caracteres podían ser dominantes o recesivos, uno con respecto al otro, y los miembros de cada par eran capaces de segregarse, lo que hizo que Mendel denominara "separación de los híbridos" a este proceso. La deducción más significativa de los resultados de Mendel sobre las cruzas de monohíbridos consistió en que la separación de los pares de alelos originó la "pureza de los gametos". El concepto de Segregación se ha identificado como la 1a. Ley de Mendel (14).

El reconocimiento hecho por Mendel de que los determinantes de las características hereditarias eran elementos físicos y sus principios de Segregación y Distribución independiente constituyen la base de la Genética, definida como la ciencia de la herencia y la variación.

Presumiblemente los mecanismos hereditarios operan en casi todos los grupos de animales, pero algunos de ellos se presentan más que otros para las investigaciones. Para los experimentos de cruzamiento se seleccionan generalmente los organismos con ciclo de vida corto, prole abundante y

variaciones claras, también es deseable, trabajar con un material que pueda mantenerse con facilidad.

PRINCIPIO DE HARDY- WEINBERG.

Las frecuencias génicas no dependen de la dominancia o de la recesividad, sino que bajo ciertas condiciones pueden permanecer esencialmente sin cambiar o conservarse o conservarse de una generación a la siguiente.

En una población grande en la que todos los genotipos son igualmente viables y bajo condiciones de apareamiento aleatorio, las frecuencias génicas de una generación determinada dependen de las frecuencias génicas de las generaciones anteriores y no de las frecuencias genotípicas (3).

Las frecuencias de los distintos genotipos que se forman con apareamientos aleatorios dependen únicamente de las frecuencias génicas.

Estos dos puntos quieren decir que si centramos nuestra atención en los genes más que en los genotipos, podemos predecir las frecuencias tanto génicas como genotípicas de las generaciones futuras. Este equilibrio genotípico, basado en las frecuencias génicas estables y en apareamiento aleatorio, se conoce como "el principio de Hardy-Weinberg" y ha servido de teorema fundamental de la genética de poblaciones (3).

La relación general entre frecuencias génicas y genotípicas puede describirse en

términos algebraicos de la siguiente forma: si p es la frecuencia de un determinado gen en una población y q es la frecuencia de su alelo, de modo que $p+q=1$, las frecuencias genotípicas de equilibrio vienen dadas por los términos p^2 (TT), $2pq$ (Tt) y q^2 (tt). Si las frecuencias génicas de T y t son $p=0.6$ y $q=0.4$ respectivamente, las frecuencias genotípicas de equilibrio serán:

$$(0.6)^2 (TT) + 2(0.6)(0.4) (Tt) + (0.4)^2 (tt) = 0.36 TT + 0.48 Tt + 0.16 tt.$$

También se obtienen los mismos resultados desarrollando el binomio: $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$. (3).

CODOMINANCIA EN LAS POBLACIONES NATURALES.

Si pueden contarse todos los segregantes de las diferencias génicas de un solo locus, pueden estimarse las frecuencias génicas y entonces pueden compararse fácilmente las frecuencias genotípicas observadas con los valores que se esperan en el equilibrio. Entonces puede probarse la diferencia entre los valores genotípicos observados y los esperados por el método de Ji-cuadrada. Con los datos obtenidos y con un grado de libertad, la probabilidad de la Ji-cuadrada observada es lo suficientemente grande como para que la hipótesis de equilibrio en la población pueda aceptarse. La dominancia incompleta se refiere a aquellos casos en que el heterocigoto tiene un fenotipo intermedio y el término codominancia se refiere a los casos en que dos alelos se expresan en forma

independiente en un heterocigoto (3, 14, 19).

JUSTIFICACION.

El ratón se ha convertido en el mejor modelo para el estudio de la genética de mamíferos, ya que se conoce en forma detallada su mapa genético. La contribución de las líneas consanguíneas de ratón al estudio de la biología de los trasplantes ha sido fundamental. Se sabe que los trasplantes de órganos o de tejidos efectuados entre individuos no emparentados sufren sistemáticamente rechazo, en el ratón, el rechazo es igualmente sistemático, salvo en casos muy precisos en los que donante y receptor son miembros de la misma línea consanguínea (10).

Esta observación, que se remonta a los inicios de la genética del ratón, se refería fundamentalmente a los tejidos tumorales que se trasplantaban de un ratón a otro para estudiar la biología del cáncer. En Estados Unidos, Clarence C. Little y Strong utilizan el mismo sistema pero con tejidos normales y comprenden muy pronto que la aceptación o rechazo de un trasplante, dependía de un proceso de naturaleza inmunológica. Mostraron también que el determinismo genético de la aceptación o rechazo de un trasplante podía resumirse en cinco puntos:

a) Los trasplantes efectuados entre ratones de una misma línea consanguínea (isotrasplantes) son aceptados en los dos sentidos, o sea de uno u otro ratón.

- b) Los trasplantes efectuados entre ratones de dos líneas diferentes (alotrasplantes) sufren rechazo.
- c) Los híbridos surgidos de cruza entre dos líneas de ratón aceptan trasplantes de sus padres, de sus colaterales o de sus descendientes.
- d) Ningun ratón acepta tejidos que provengan de híbridos de primera generación.
- e) Los genes implicados en el determinismo de trasplantes, son llamados genes de histocompatibilidad (los genes del "yo") (11).

A partir de 1948, George Snell intentó esclarecer el determinismo genético del rechazo de trasplantes. Para ello realizó, gracias a innumerables cruza retrógradas (backcross), una serie de líneas llamadas "congénicas", es decir, idénticas a una línea consanguínea ya establecida, salvo para un gen único implicado en la histocompatibilidad. Con estas líneas congénicas aisló la mayoría de los principales genes de histocompatibilidad y en colaboración con otros investigadores inició la inmunogenética que, aún guarda gran número de secretos y debe mucho a los ratones. Todo ello contribuye a un sensible avance de conocimientos en la inmunogenética del cáncer, y permite en cierta medida, extraer conclusiones y tratar de extrapolarlas a la especie humana (10, 11).

HIPOTESIS.

El mecanismo a través del cual la cepa de ratones C57Bl/6J controla el crecimiento tumoral, tiene evidentemente una base genética; por lo que se propone que la respuesta está gobernada por un gen con dos variedades alélicas que se expresan en forma codominante.

El criterio para aceptar o rechazar la hipótesis se basó en los resultados de la prueba de segregación, la cual, permitió conocer si el número de genes involucrados en la respuesta es igual o mayor a uno, así como también la forma en que se heredan dichas características, existiendo la posibilidad de que éstas se hereden en forma no codominante.

OBJETIVOS

Determinar por medio de los análisis estadísticos y genéticos, si las características de resistencia y susceptibilidad a la muerte provocada por el tumor son transmitidas por un gen con dos variedades alélicas y que además su forma de expresión es codominante.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES.

Se emplearon un total de 192 ratones de 10 a 12 semanas de edad de las cepas singénicas BALB/cAnN (H-2^a), C57Bl/6J (H-2^b), e híbridos F₁ y F₂ de las cepas anteriores y animales resultado de la Rc entre los F₁ y la cepa progenitora resistente. Estos animales fueron obtenidos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., y durante el período de experimentación fueron criados y mantenidos con alimento y agua *ad-libitum*, bajo condiciones ambientales, de espacio e higiene de acuerdo con las necesidades de la especie.

LINEA CELULAR.

Se utilizó la clona celular LF.c1, la cual se mantiene como un tumor en líquido de ascitis en ratones de la cepa C.C3 H-2k, mediante la propagación de un millón de células vivas por mililitro (ml), por vía intraperitoneal (ip), en una sola dosis.

El tumor fue trasplantado cada tres semanas a nuevos ratones C.C3 H-2k para perpetuar así la línea tumoral.

PROPAGACION Y DESAFIO

1) La propagación *in vivo* de las células tumorales se llevó a cabo trasplantando un millón de células tumorales por ml., en ratones de la cepa congénica resistente C.C3 H-2k. Este procedimiento se realizó de la siguiente forma:

1.- Se sacrificó al ratón por dislocación cervical y se colocó sobre un soporte

sujetador en posición decúbito dorsal.

2.- Se desinfectó la piel de la región del epigastrio para realizar una incisión longitudinal de aproximadamente un centímetro de largo.

3.- Se colectó con una pipeta Pasteur el líquido de ascitis contenido en la cavidad abdominal, depositándolo en un tubo con solución amortiguadora de fosfatos (SAF).

4.- Posteriormente se lavaron las células por medio de centrifugación a 1500 rpm, durante 10 minutos. Este lavado se repitió tres veces.

5.- Teniendo las células limpias, se llevó a cabo una dilución conveniente para proceder a la cuantificación de las células con ayuda de un hematocitómetro, para lo cual fueron teñidas con un colorante vital (azul tripano al 0.02%), recordando que la tinción permite verificar la integridad de las membranas y por lo tanto la viabilidad celular.

6.- Con la cuantificación y considerando la viabilidad celular, se procedió a diluirlas en SAF hasta obtener un millón de células por ml., que es la cantidad de células tumorales que fueron inoculadas a los ratones receptores por vía ip.

II) Para el desafío, se siguió el mismo procedimiento que en el caso de la propagación, excepto que la cantidad a inocular a los ratones fue de cinco millones de células vivas por ml. (dosis única).

El registro de los pesos corporales y la mortalidad de cada ratón desafiado se

realizó diariamente en las cepas progenitoras y cada 10 días en las F1, F2 y Rc; durante un período de 50 días.

TRATAMIENTO ESTADISTICO.

La sobrevivencia de los distintos tipos genéticos se analizó por el método de Logrank, en donde se compara el número de fracasos observados en cada grupo con el número de fracasos que podrían esperarse de las pérdidas en los grupos combinados. Se empleó también una prueba de Ji-cuadrada para analizar el significado de las pérdidas observadas y las esperadas, teniendo como base el principio de Hardy-Weinberg (2, 3, 14).

RESULTADOS

Crecimiento de la línea celular en ratones singénicos, F1, F2 y Rc.

1) Cuando la línea celular LF.c1 fue inoculada en ratones de la cepa **C57Bl/6J (B6)**, se observó que a los 11 días postinoculación el tumor comenzó a crecer en una forma exponencial (**Fig. 4**). El tumor presentó un pico máximo decrecimiento en el día 20 postinoculación; en este día los ratones incrementaron en promedio 16.8 g., lo que correspondió a un 71.4% de incremento en el peso corporal con respecto al peso inicial. Posteriormente se observó una disminución

en el peso promedio de los animales lo cual se relacionó con la disminución en la cantidad de masa tumoral ocasionada por la respuesta inmune de rechazo al tumor. Aproximadamente a los 50 días postinoculación, el 100% de los ratones habían rechazado eficientemente el tumor. A pesar de que en este tiempo los ratones han disminuído su peso, nunca regresaron su peso inicial, probablemente debido a la maduración normal de los animales durante el tiempo que duro el experimento. La sobrevivencia fue del 100%, ya que ningún ratón murió durante el experimento (**Cuadro I**) (**Fig. 12**).

Los signos clínicos presentados por los ratones durante la fase experimental fueron los siguientes:

- a los 20 días postinoculación: distención de las paredes abdominales debido a el desarrollo tumoral en el líquido de ascítis, disnea, adinamia y anorexia.
- a los 40 días postinoculación: ligera distención de las paredes abdominales, ligera disnea y deshidratación moderada.
- a los 50 días postinoculación: no se observaron signos clínicos.

Las necropsias realizadas a los 30 ratones, al final de la fase experimental, no mostrarán evidencias de tumoración en la cavidad peritoneal.

2) El crecimiento de la línea celular LF.c1 en la cepa **BALB/cAnN (C)**, mostro diferencia con respecto al de la cepa anterior (**Fig. 5**). El tumor comenzó a crecer aproximadamente al día 12 postinoculación. La forma del crecimiento del

tumor no fué tan rápida como en los ratones de la cepa B6. A los 30 días postinoculación, se observó el máximo incremento en el peso corporal, equivalente a la ganancia promedio de 7.6 g. y correspondiente al 37% de incremento en peso con respecto al peso inicial. Después de este tiempo, los animales comenzaron a perder peso y a morir. A los 45 días postinoculación, todos los animales habían muerto como resultado del crecimiento del tumor por lo que el porcentaje de sobrevivencia fue de 0% (Cuadro I) (Fig. 12).

Los signos clínicos presentados por los ratones durante la fase de experimentación fueron los siguientes:

- a los 20 días postinoculación: ligera distención de las paredes abdominales debido a el desarrollo del tumor en el líquido de ascitis, ligera desnea y anorexia.
- a los 30 días postinoculación: distención de las paredes abdominales, disnea, anorexia, deshidratación moderada, adinamia, caquexia y muerte de algunos animales.
- a los 40 días postinoculación: disminución del peso corporal, disnea, anorexia, caquexia, deshidratación grave, postración y muerte.
- a los 45 días postinoculación: el 100% de los ratones habían muerto. (Figs. 5 y 12).

3) En los ratones **B6C F1**, producto de la cruce dialéctica entre las cepas parentales B6 y C, en donde la madre progenitora fué de la cepa B6, presentó un

tipo de crecimiento semejante al de la cepa parental B6 (Fig. 6). Los ratones comenzaron a incrementar su peso después del día 10 postinoculación. El aumento de peso de los animales fue en forma exponencial y alcanzó un máximo a los 20 días postinoculación, en donde los animales aumentaron en promedio 8.0 g. correspondiente a un 34.6 % de su peso inicial. Después de este día algunos de los animales comenzaron a morir debido a la carga tumoral presente como líquido de ascitis. Los animales que sobrevivieron comenzaron a rechazar el tumor y su peso corporal fué disminuyendo. Al día 50 postinoculación casi habían recobrado su peso inicial. El porcentaje de sobrevivencia alcanzado al final del experimento fué del 44 % (Cuadro 1) (Fig. 13).

Los signos clínicos presentados por los ratones durante la fase experimental fueron:

- a los 20 días postinoculación: los ratones presentaron gran distención de las paredes abdominales debido a el desarrollo del tumor en el líquido de ascitis además se presentó disnea, anorexia y postración en el 60 % de los ratones.
- a los 40 días postinoculación: el 60% de los ratones presentó ligera distención de las paredes abdominales y ligera disnea; el 40% restante presentó además deshidratación, anorexia y postración.
- a los 50 días postinoculación: la sobrevivencia fue de 44 % y éstos ratones no mostraron signos clínicos.

Los animales que sobrevivieron a la fase experimental fueron sacrificados y las necropsias realizadas no mostraron evidencias de tumoración así como tampoco se detectaron focos metastásicos en forma macroscópica.

4) En los ratones **CB6 F1**, producto de la cruce dialélica de B6 y C en donde la madre progenitora es de la cepa C, el crecimiento de la línea celular LF.c1 fue parecido al de la cepa progenitora C y comparable al de los animales de la cruce B6C F1 (Fig. 7). Aproximadamente a los 10 días postinoculación se comenzó a observar un incremento en el peso corporal de los animales. El incremento en peso alcanzó su máximo a los 20 días postinóculo, con un incremento promedio de 5.6 g. correspondiente al 66.9 % del peso inicial. Al igual que con los ratones de la cruce B6C; después del día 20 algunos animales comenzaron a morir. Los animales sobrevivientes rechazaron el tumor y disminuyeron gradualmente su peso. El porcentaje de sobrevivencia a los 50 días postinóculo fue del 47% (Cuadro I).

Los signos clínicos presentados durante la fase experimental fueron:

- a los 20 días postinoculación: los ratones presentaron una gran distensión abdominal, disnea, anorexia y adinamia.
- a los 40 días postinoculación: los ratones presentaron signos iguales a los presentados a los 20 días postinoculación.
- a los 50 días postinoculación: algunos de los ratones presentaron distensión

abdominal, anorexia, disnea y postración ; el resto, sólo presentaron ligera distención abdominal sin ningun otro signo. La sobrevivencia fue del 47%.

(Cuadro I).

En los ratones que sobrevivieron a la fase experimental las necropsias realizadas no mostraron evidencias de lesiones tumorales significativas así como tampoco se detectaron macroscopicamente focos metastásicos.

5) El crecimiento de la línea celular LF.c1 en los ratones de la intercruza **B6C/CB6 F2**, se muestra en la **Figura 8**. A los 20 días postinoculación se alcanzó el máximo incremento en el peso corporal con un aumento promedio de 7.0 g, correspondiente al 37.2% del peso inicial. Después de este día algunos animales de la crua comenzaron a morir, mientras que los animales sobrevivientes disminuyeron su peso. La disminución en peso fue muy asincrónica ya que al día 50 post-inoculación, algunos animales habían recobrado su peso inicial, mientras que otros conservaron un elevado peso por la gran cantidad de líquido de ascitis. La sobrevivencia de este grupo de ratones fue del 66 % **(Cuadro I) (Fig. 14)**.

Los signos clínicos presentados por los ratones durante la fase experimental fueron:

- a los 20 días postinoculación: los ratones presentaron distención abdominal, disnea, anorexia, actividad motriz disminuida, pero con un 100% de sobrevivencia.

- a los 40 días postinoculación: se presentó un ligero decremento en el peso corporal y los signos fuerón iguales a los anteriores .

- a los 50 días postinoculación: sólo algunos de los ratones presentaron lígera distención abdominal, lígera disnea, anorexia y deshidratación; el resto de los ratones no mostraron sígnos significativos. La mortalidad aumentó y la sobrevivencia solo alcanzó a ser del 66 %. (**Cuadro I**) (**Fig. 14**).

En los ratones que sobrevivieron a la fase experimental no se encontraron evidencias del lesiones ocasionadas el tumor así como tampoco evidencias de focos metastásicos.

6) En los ratones **CB6/B6C** la curvas de incremento en peso fueron semejantes a la intercruza anterior (**Fig. 9**). El mayor incremento en peso coporal fue alcanzado el día 20 postinoculación, en donde los animales incrementaron 6.6g., correspondiente a 34.3%. Posteriormente se presentó un lígero decremento en el peso corporal, en donde algunos animales recuperaron casi su peso inicial, sin embargo en este grupo también se observó la asincronia en la disminución en peso. La sobrevivencia en este grupo de ratones fue del 63 %. (**Cuadro I**) (**Fig. 14**). Signos clínicos presentados por los ratones durante la fase experimental:

- a los 20 días postinoculación: los ratones presentaron distención abdominal, disnea, anorexia, adinamia, pero con un 100% de sobrevivencia.

- a los 40 días postinoculación: algunos de los ratones presentaron ligera distensión abdominal, ligera disnea, anorexia y deshidratación; el resto de los ratones no presentó signos clínicos. La sobrevivencia disminuyó hasta el 83.4%.
- a los 50 días postinoculación: los signos clínicos presentados por los ratones fueron igual a los anteriores, pero la sobrevivencia bajo aún más, hasta ser del 63% (**Cuadro I**) (**Fig. 14**).

En los ratones que sobrevivieron a la fase experimental no se encontraron lesiones significativas ni tampoco se detectaron macroscópicamente focos metastásicos.

7) En los ratones **B6c/B6** producto de la retrocruza con la cepa parental **B6**, el incremento en el peso corporal no fue tan elevado como en los otros grupos de ratones (**Fig. 10**). A los 10 días postinoculación, se presentó el máximo incremento del peso corporal con una ganancia de 5.2 g. correspondiente al 25.6% del peso inicial. Posteriormente los animales que habían ganado más peso comenzaron a perderlo hasta que alcanzaron su peso inicial. En este grupo de ratones sólo un animal murió, por lo que el porcentaje de la sobrevivencia fue del 96.5% (**Cuadro I**) (**Fig. 15**).

La necropsia realizada en el animal muerto no mostró evidencias de lesiones causadas por el tumor, por lo que se desconoce la causa de la muerte.

8) Por otra parte, en los ratones de la retrocruza **cB6/B6**, la curva de crecimiento fue semejante a los animales del grupo anterior (**Fig. 11**). El incremento máximo de peso se presentó hasta los 20 días post-inoculación, en donde en promedio los animales incrementaron 6.7 g. correspondiente a un 34% de su peso inicial. Al igual que en el grupo anterior, los animales que desarrollaron más peso comenzaron a perderlo hasta casi alcanzar su peso inicial. En este grupo el 100% de los animales sobrevivieron al crecimiento del tumor. (**Cuadro I**) (**Fig. 15**).

Durante el tiempo de estudio, no se presentaron signos clínicos en los dos grupos de ratones producto de la retrocruza. Mientras que las necropsias realizadas a los ratones no mostrarán lesiones significativas y no se detectarán presencia de células tumorales ni focos metastásicos.

ANÁLISIS GENÉTICO DE LOS RESULTADOS.

Se propone que la respuesta inmune contra el tumor esta evocada por un antígeno que se expresa en la superficie de las células tumorales al cual denominamos antígeno **T** porque también se encontro en la superficie de los linfocitos T del timo de las cepas susceptibles al tumor. Se cree que este gen se presenta en dos formas alélicas: el alelo **Tr** presente en la cepa C57Bl/6J y el alelo **Ts** presente en todas las cepas susceptibles.

En una población grande bajo apareamiento aleatorio, sin selección, mutación o migración las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación a generación y además hay una relación simple entre ellas. La relación entre frecuencias genicas y genotípicas es (de acuerdo a la Ley de Hardy Weinberg (2,14): si las frecuencias de dos alelos en los progenitores son p y q , entonces las frecuencias genotípicas en la progenie son: p^2 , $2pq$ y q^2 .

Las frecuencias génicas del hipotetico locus T en la población en cuestión (en equilibrio) pueden ser determinadas del conocimiento de las frecuencias genotípicas. En el supuesto de que existan los alelos Tr y Ts , y que se clasificaran 100 individuos, al contar las cantidades de cada frecuencias génicas que se indican a continuación (de acuerdo a Falconer) (3).

Cada individuo tiene 2 genes, en esta forma hemos contado 200 representantes de los genes en este locus. Cada individuo Tr/Tr contiene dos genes Tr y cada individuo Tr/Ts contiene un gen Tr . En esta forma existen 120 genes Tr en la muestra y 80 genes Ts , por tanto la frecuencia de Tr es 60 % ó $p= 0.6$ y la frecuencia de Ts es 40% ó sea $q= 0.4$.

Si las frecuencias de dos alelos en los progenitores son p y q entonces las frecuencias genotípicas en la progenie son p^2 , $2pq$ y q^2 de esta forma: $p^2 = 0.36$, $2pq= 0.48$ y $q^2= 0.16$. En la población bajo estudio de 192 individuos se esperan:

69 individuos portadores de T_r (sobrevivientes o resistentes), se observaron 66 (10 de la endocruza + 56 de la retrocruza). De los 62 individuos susceptibles, la mitad o sea 31, presentan el genotipo T_s por lo tanto el valor de q^2 es igual a 31, por tanto $2pq$ es igual a (66 + 31)-192 es decir 95 individuos.

En el **Cuadro 2** se muestran los tipos de cruce y los genotipos propuestos para el gen T de las cepas progenitoras y su descendencia así como las frecuencias genotípicas y fenotípicas esperadas para el alelo T_r en la descendencia.

En una población en equilibrio cuando el fenómeno observado está gobernado por un sólo gen autosómico que se expresa en forma codominante, las proporciones esperadas se muestran en el **Cuadro 3**.

Aplicando la formula de Hardy Weinberg (3, 14) obtenemos que:

$$p^2=0.36$$

$$2pq=0.48$$

$$q^2=0.16$$

Como la población total bajo estudio consistió de 192 ratones, sustituyendo los valores en la formula anterior, encontramos que la frecuencia esperada es de:

$$p^2n=0.36 (192)= 69.12$$

$$2pqn=0.48 (192)= 92.16$$

$$q^2n=0.16 (192)= 30.72$$

Como se observa en el Cuadro 2, 66 ratones fueron portadores del alelo Tr (10 de la endocruza y 56 de la retrocruza) y corresponden a los valores p^2n . De los 62 ratones susceptibles, la mitad (31 ratones) presentaron el fenotipo Ts y por tanto corresponden al valor de q^2n . Finalmente, los 95 ratones restantes correspondieron a la frecuencia $2pqn$. El cuadro 4 muestra la prueba de bondad de ajuste de los valores observados contra los esperados.

DISCUSION

La clona LF.c1 es una línea tumoral deficiente en la expresión de las moléculas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad. Esta característica hace que esta célula tenga la capacidad de crecer en ratones de distinto haplotipo. En todos ellos crece y causa la muerte del 100% de los animales (1). Sin embargo la cepa singénica de ratones C57Bl/6J tiene la capacidad de permitir el desarrollo del tumor y posteriormente de rechazarlo. El fenómeno de rechazo al tumor es un mecanismo inmunológico complejo que involucra la generación de anticuerpos y la activación de células del sistema inmune (macrófagos y linfocitos T) (1) (Figura 1).

Estudios previos sobre la respuesta inmune humoral de los ratones C57Bl/6J que rechazaron LF.c1, mostraron que el suero hiperinmune anti-LF.c1 fue capaz de reconocer distintos antígenos presentes en la célula tumoral. Uno de los antígenos reconocidos por este antisuero fue importante, ya que se encontró presente tanto en la célula tumoral como en células T del timo de todas las cepas de ratones que fueron susceptibles a la muerte ocasionada por el tumor. Sin embargo, la cepa C57Bl/6J no lo presentó. Esta molécula fue denominada antígeno T. Experimentos de inmunización con el antígeno T, mostraron que este fue capaz de conferir protección contra el crecimiento de LF.c1 en los ratones singénicos C57Bl/6J y en la cepa congénica C.B6 (H-2^b). En esta última cepa, la inmunización con el antígeno T también causó la protección contra la muerte ocasionada por el tumor. (1).

Estas evidencias sugieren que el antígeno T, tiene una participación importante en la respuesta de protección contra el crecimiento y muerte ocasionada por el tumor. En las cepas de ratones que presentan el antígeno T, se presenta un fenotipo de susceptibilidad al tumor, mientras que en las cepas que no lo presentan, el fenotipo es de resistencia.

A nivel genético, el antígeno T puede estar codificado por dos versiones alélicas, una que confiere la característica de resistencia (*Tr*) y otra que confiere la característica de susceptibilidad (*Ts*).

Los resultados de crecimiento de la línea celular LF.c1 en los ratones híbridos F1 mostrarán que estos ratones heredarán las características de crecimiento de las cepas parentales dependiendo de la dirección de la cruce. En los híbridos CB6 el incremento fue de 15.6 g. este incremento se parece al de la cepa parental C57Bl/6J en donde, en promedio se observó un incremento de 16 g. Por otra parte, los híbridos B6C sólo incrementaron 8.0 g., siendo este incremento parecido al de la cepa progenitora BALB/cAnN.

Con respecto a los híbridos B6C/CB6 F2 y CB6/B6C F2, las características de crecimiento de la célula tumoral fueron semejantes a las de la cepa parental BALB/cAnN ya que en estos ratones sólo se encontró un incremento de aproximadamente 7.0 g. La dirección de la cruce en este grupo no influyó en las características de crecimiento del tumor.

En el caso de los animales producto de la retrocruza con la cepa parental C57Bl/6J, el crecimiento de la célula tumoral fue también más pequeño. Este grupo de ratones parece heredar las características de resistencia de la cepa parental, ya que controlan muy bien el crecimiento del tumor.

Para conocer si el hipotético gen T se encontraba localizado en los cromosomas somáticos o sexuales, se hicieron cruces dialélicas (en ambos sentidos) entre los individuos susceptibles y resistentes. Los resultados obtenidos mostraron que 44% y el 47% de ratones de ambas cruces sobrevivieron. Por lo tanto el hipotético gen

T es un gen somático que además se expresa en proporciones iguales ($\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{2}$) en ambas direcciones de la cruce.

Finalmente, los resultados obtenidos en el análisis de las frecuencias fenotípicas así como los resultados de las frecuencias genotípicas nos sugieren que este gen se hereda en forma codominante.

CONCLUSIONES.

- 1.- LF.c1 es una línea celular tumoral murina deficiente en la expresión de antígenos clase I del CMH.
- 2.- El hipotético antígeno T₁ parece ser generado en forma alélica, una de estas formas designada como Tr es compartida por antígenos presentes en la superficie de las células tímicas de las cepas susceptibles y no así en la cepa B6 a la cual le confiere la resistencia al trasplante tumoral.
- 3.- Se propone análisis complementarios posteriores para comprobar la hipótesis de acción codominante de los alelos.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Barrera Rodríguez R., Distintos mecanismos de respuesta inmune antitumoral generados por la cepa de ratones C57Bl/6J contra dos células tumorales de origen murino., Tesis de Maestría., Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México., D.F., 1990.
- 2.- Dawson Saunders B., Bioestadística Médica. 1a. ed. Manual Moderno. México, D.F., 1993.
- 3.- Falconer, D.S.: Introducción a la genética cuantitativa. 5a. ed. Cia. Ed. Continental. México, D.F., 1975.
- 4.- Festenstein H., Garrido F. : MHC antigens and malignancy. Nature. 322: 502-3. 1985.
- 5.- Flavell R.A., Allen H., Burkly L.C., Sherman D.H., Waneck G.I., Widera G.: Molecular biology of the H-2 histocompatibility complex. Science. 233:437 -43. 1986.
- 6.- Foster L.H., Small J.D., and Fox J.G.: The mouse in biomedical research. Vol. I. American College of Laboratory Animal. Academic Press., New York, 1981.
- 7.- Goodenow R.S., Vogel J.M., Linsk R.L.: Histocompatibility antigens on murine tumors. Science. 230: 777 -83. 1985.

- 8.- Hood L., Steinmetz M., Malissen B.: Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. Annu. Rev. Immunol. 1: 529- 68. 1983
- 9.- Hui K.M., Sim T.F., Oei A.A.: Tumor rejection mediated by transfection with allogenic class I histocompatibility gene. J. Immunol. 143:3835 -43. 1980.
- 10.- Klein J.: Natural History of the major histocompatibility complex. John Wiley & Sons. New York. 1983.
- 11.- Klein J.: Seeds of time: Fifty years ago Peter A. Gorer. Discovered the H-2 complex. Immunogenetics 24:331-338. 1986.
- 12.- Klein J., Figueroa F., Nagy Z.A.: Genetics of the major histocompatibility complex: The final act. Ann. Rev. Immunol. New York. 1983.
- 13.- Schrier P.I., Bernard S.R., Vaessen R.T., Houweling A., Van der Erd A.J.: Expression of the class I major histocompatibility antigens switched of by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cell. Nature 305: 771-5. 1983.
- 14.- Strickberger Monroe W., Genética., 2a. Edición., Ediciones Omega S.A. Barcelona España. 1978.
- 15.- Tanaka K., Hayashi H., Hamada C., Khoury G., Jay G.: Expression of major histocompatibility complex class I antigens as a strategy for the potentiation of immune recognition of the tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 8723- 7. U.S.A. 1986.

- 16.- Tanaka K., Isselbacher K.J., Khoury G., Jay G.: Reversal oncogenesis by expression of a major histocompatibility complex class I gene. Science. 228: 26-30. 1985
- 17.- Thomas C.E., Goldenberg G.J.: Virus-like particles in murine leukaemia L5178V. Science. 214: 1339-41. 1967
- 18.- Tizard I.: Inmunología Veterinaria. Ed. Interamericana. 2a. Ed. México, D.F., 1984.
- 19.- Villee Claude A., Pearl Solomon E., Martin Charles E., Martin Diana W., Berg Linda R., Davis P. William., 'Biología 2a. Edición., Ed. Interamericana Mc Graw-Hill. México. 1992.

Cuadro I . Numero total de animales desafiados con la linea tumoral LF.c1 y porcentaje de sobrevivencia.

Tipo de cruza	cepa	No. de ratones	No. de vivos	No. de muetros	% de sobrevivencia
endocruza	B6XB6	10	10	0	100
	CXC	10	0	10	0
cruza	B6XC	25	11	14	44
	CXB6	30	14	16	47
intercruza	B6CXC B6	30	19	11	66
	CB6XB6C	30	20	10	63
retrocruza	B6CXB6	29	28	1	96.5
	CB6XB6	28	28	0	100
total		192	130	62	

Cuadro 2. Frecuencias fenotípicas y genéticas esperadas para un gen codominante

TIPO DE APAREO	ASCENDIENTES				DESCENDENCIA				
	Cepa		Genotipo		Genotipo	Frecuencia Genotípica	Frecuencia Esperada	Fenotípica Observada	
Materna	Paterna	Materno	Paterno						
ENDOCRUZA	B8	X	B8	Tr/Tr	Tr/Tr	Tr/Tr	1	1	1
	C	X	C	Ts/Ts	Ts/Ts	Ts/Ts	1	0	0
CRUZA	C	X	B8	Ts/Ts	Tr/Tr	Ts/Tr	1	0.5	0.45
	B8	X	C	Tr/Tr	Ts/Ts	Tr/Ts	1	0.5	
INTERCRUZA	CB8	X	B8C	Ts/Tr	Tr/Ts	Ts/Tr	¼	0.25	
	B8C	X	CB8	Tr/Ts	Ts/Tr	Ts/Ts	¼	0	0.85
						Tr/Tr	¼	0.25	
						Tr/Ts	¼	0.25	
RETROCRUZA	CB8	X	B8	Ts/Tr	Tr/Tr	Ts/Tr	½	0.5	0.98
	B8C	X	B8	Tr/Ts	Tr/Tr	Tr/Tr	½	0.5	

Cuadro 3. Frecuencias fenotípicas esperadas en genes codominantes

Frecuencia	alelo	fenotipo
p-0.6	Tr	resistente
q-0.4	Ts	susceptible

Cuadro 4. Valores esperados y observados para la prueba de bondad de χ^2

esperados (E)	observados (O)	(O-E) ² /E	χ^2 $\Sigma(O-E)^2/E$	$\chi^2=0.05$
p ² n=69.12	66	0.1408		
2pqn=92.16	95	0.0875	0.2533	5.99
q ² n=30.72	31	0.025		

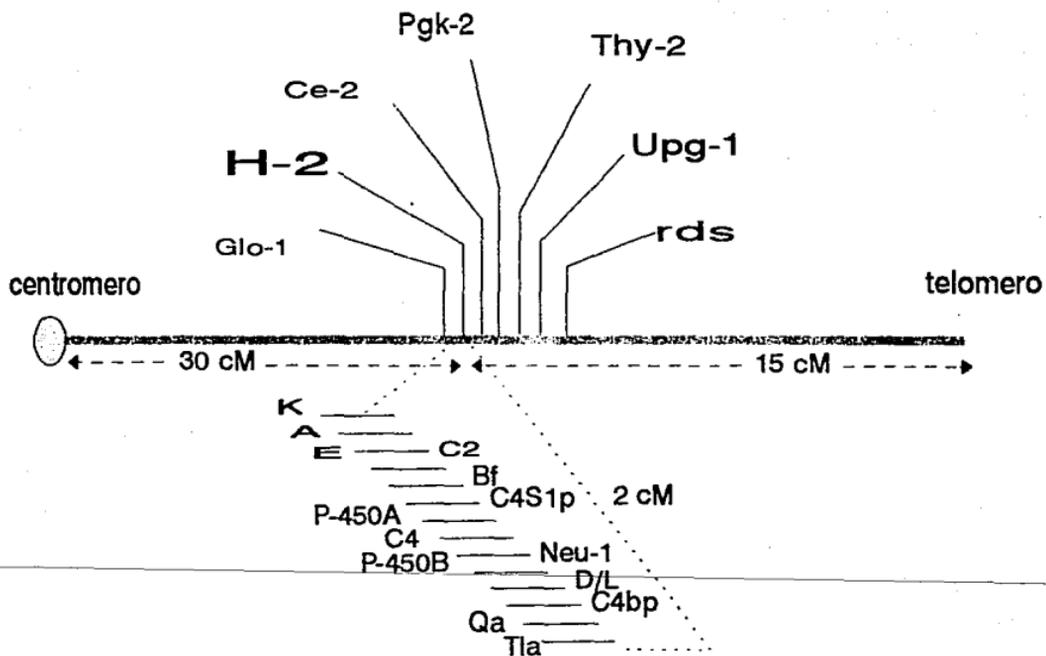


Fig.1 *COMPLEJO H-2*

CROMOSOMA 17 DEL RATON.

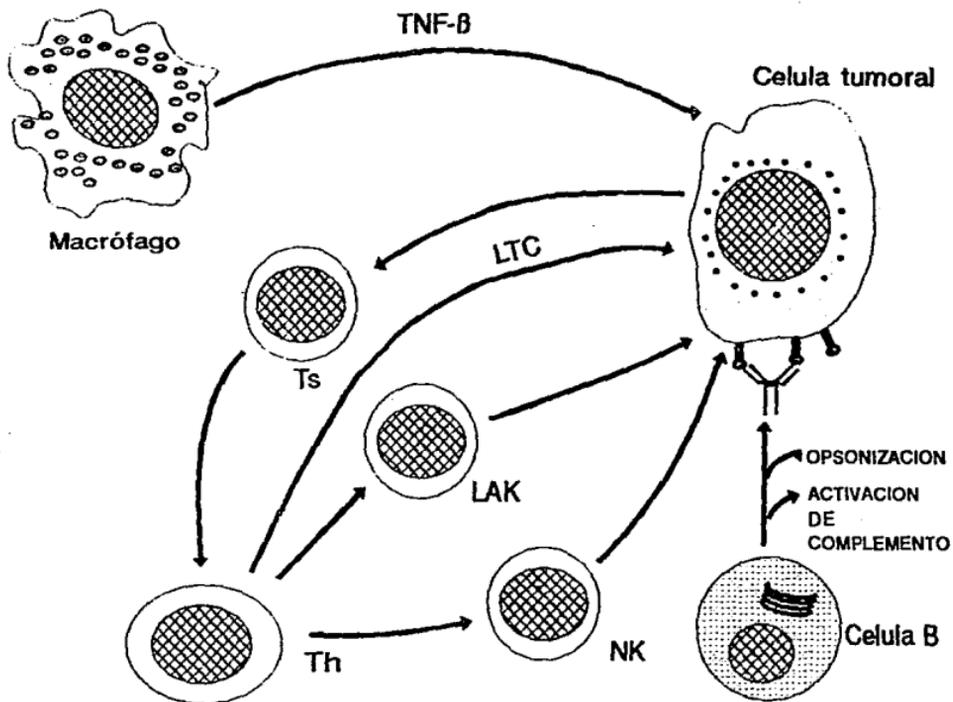


Fig. 2 RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL

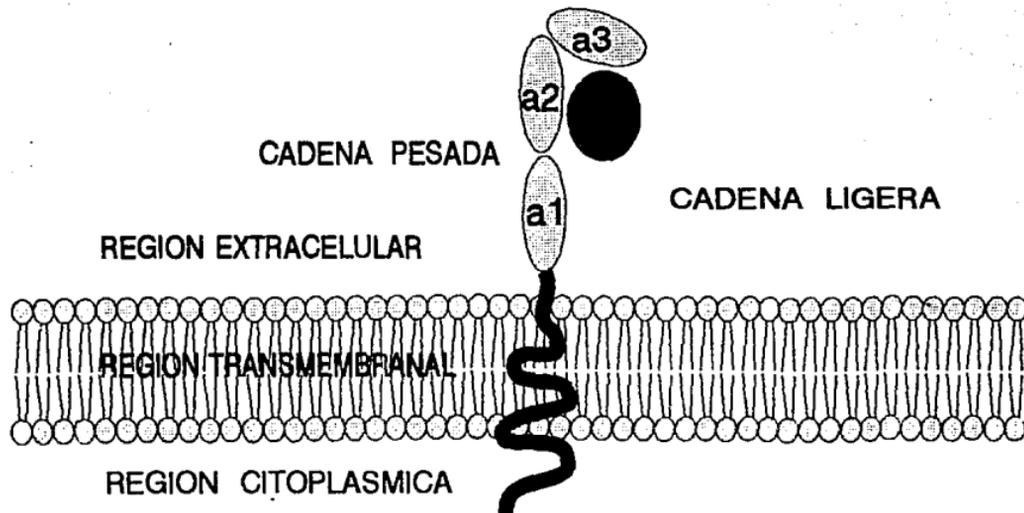


Fig. 3 ANTIGENOS CLASE I DEL CMH

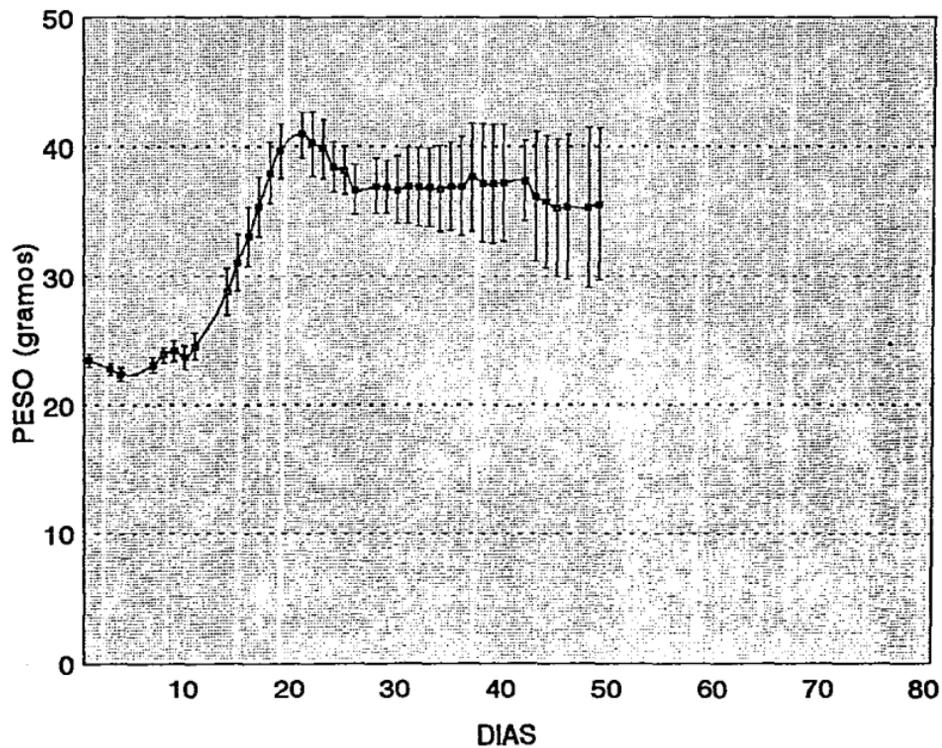


Fig. 4 CRECIMIENTO DE LF.c1 EN C57BI/6J.

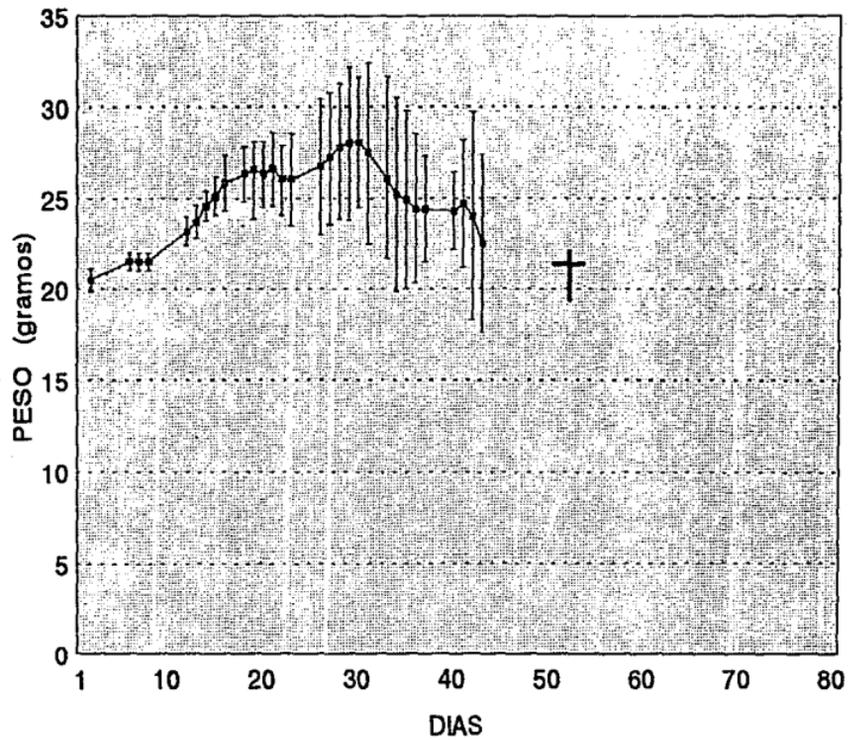


Fig. 5 CRECIMIENTO DE LF.c1 EN BALB/cAnN.

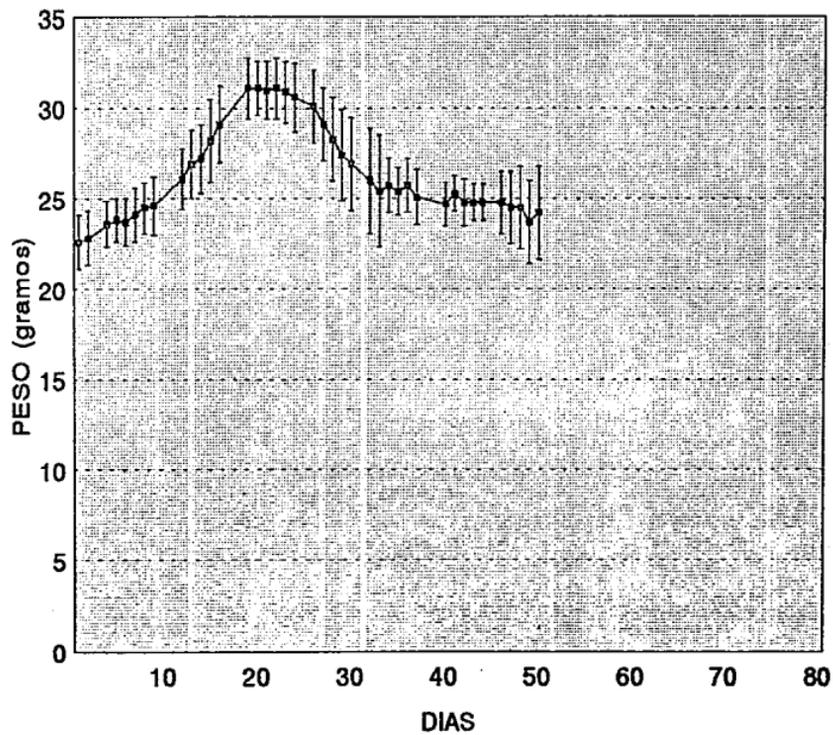


Fig. 6 CRECIMIENTO DE LF.c1 EN B6C

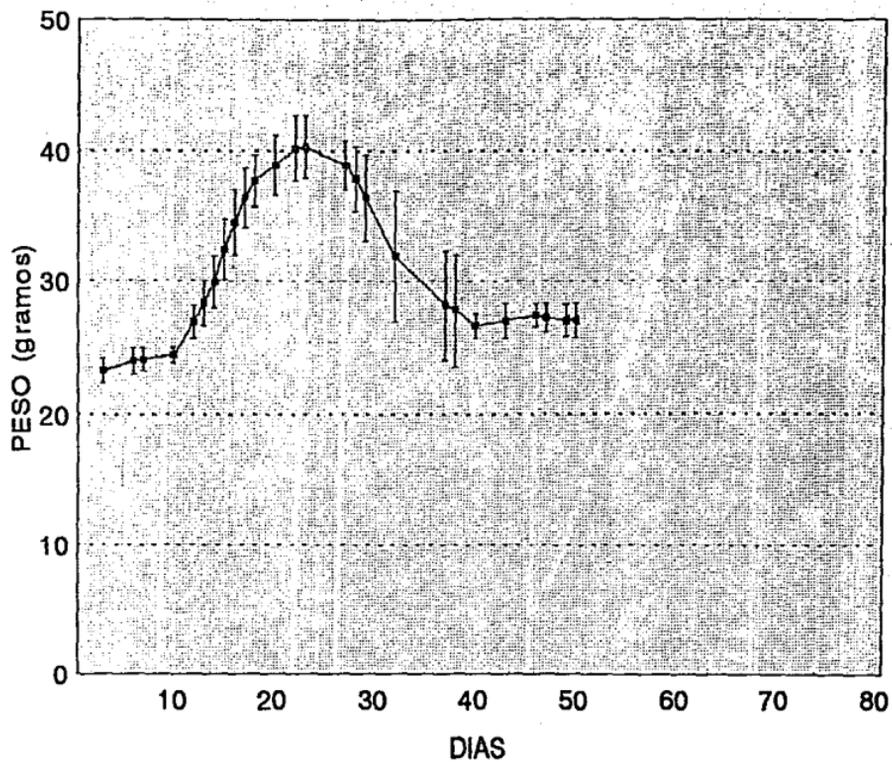


Fig. 7 CRECIMIENTO DE LF.c1 EN CB6

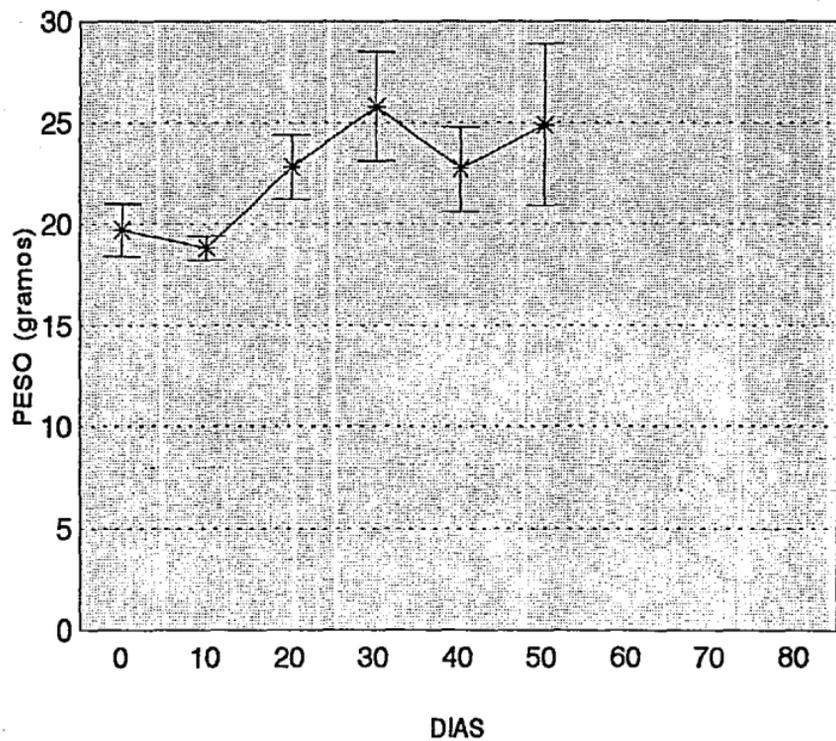


Fig. 8 CRECIMIENTO DE LF.c1 EN B6C/CB6

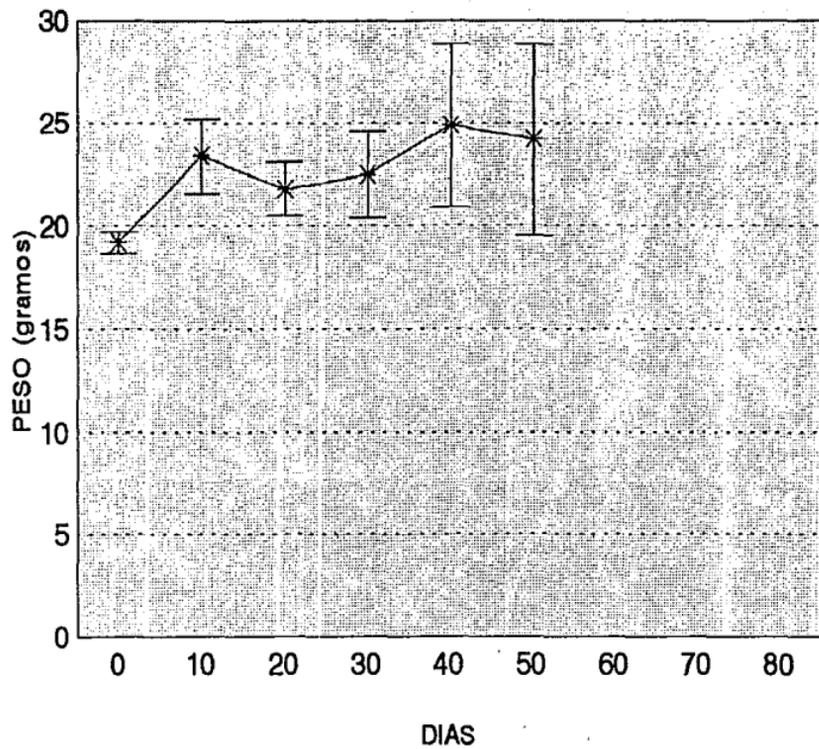


Fig. 9 CRECIMIENTO DE LF.c1 EN CB6/B6C

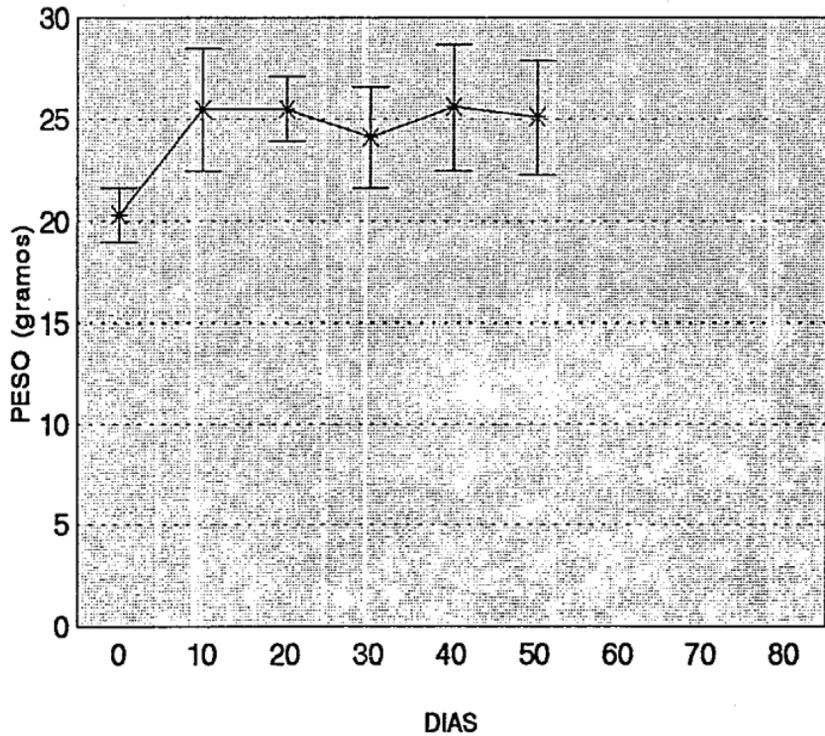


Fig. 10 CRECIMIENTO DE LF.c1 EN B6C/B6

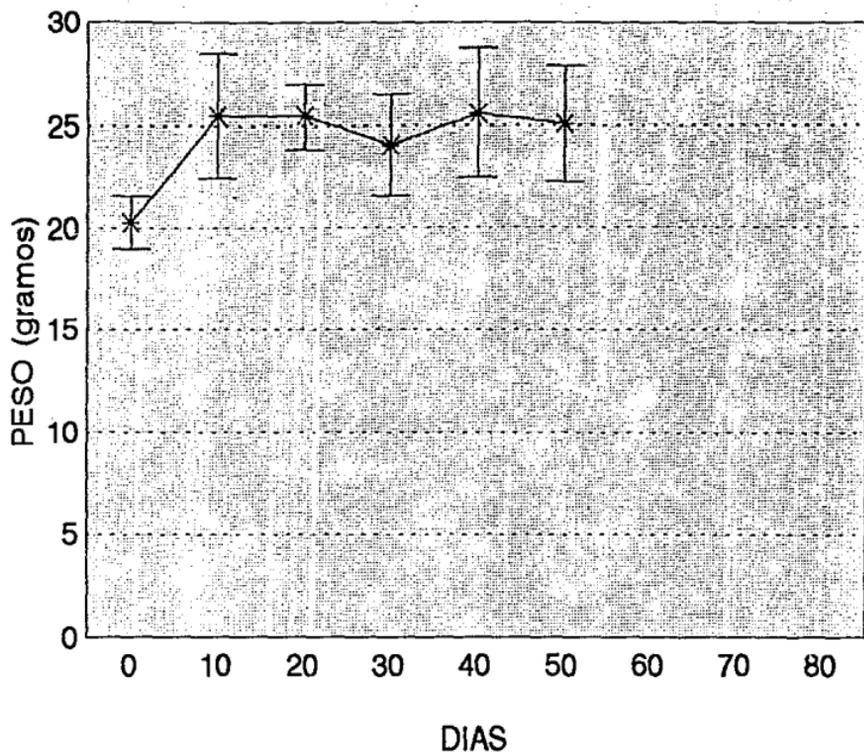


Fig. 11 CRECIMIENTO DE LF.c1 EN CB6/B6

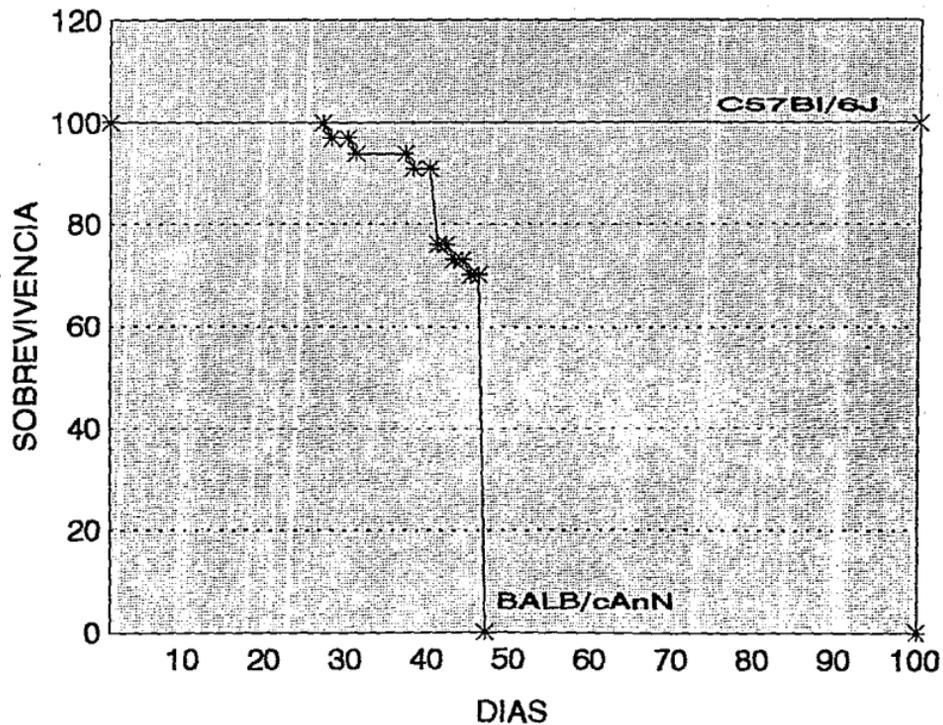


Fig. 12 PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE LAS CEPAS B6 Y C.

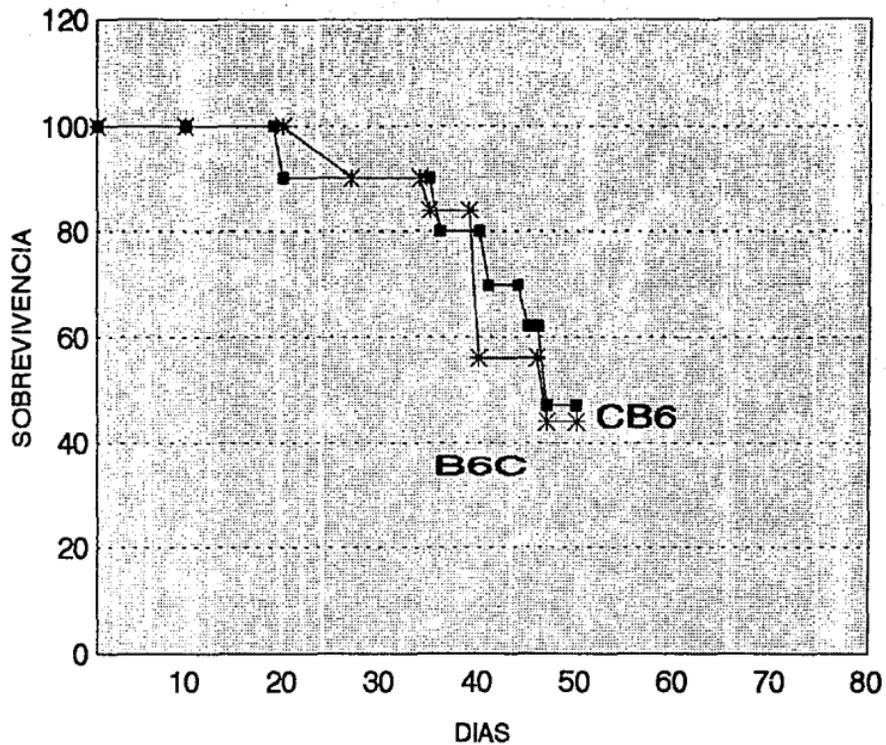


Fig. 13 PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE LAS CEPAS B6C Y CB6

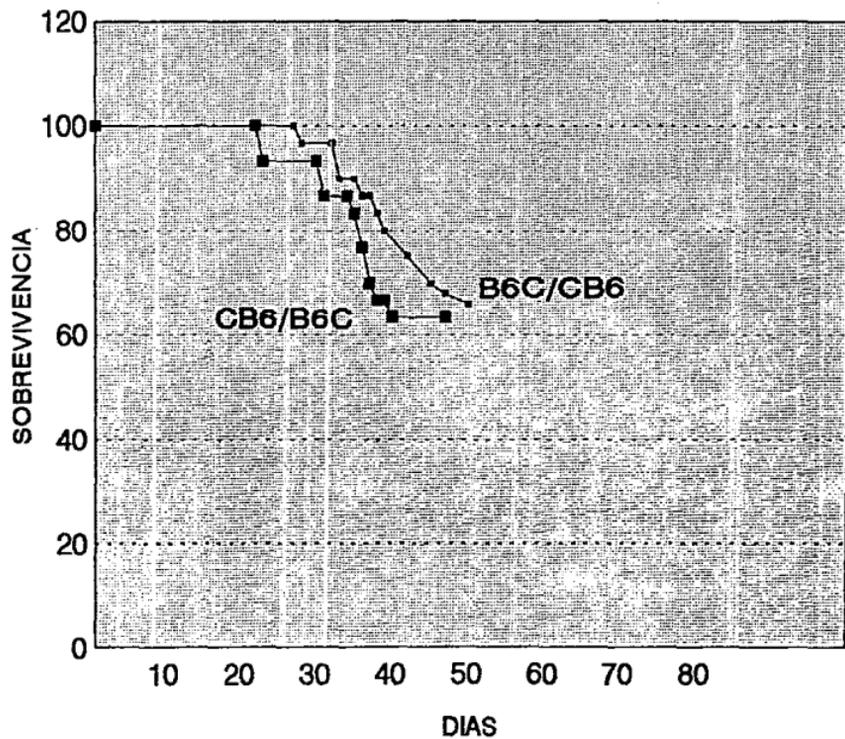


Fig.14 PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE LAS CEPAS B6C/CB6 y CB6/B6C

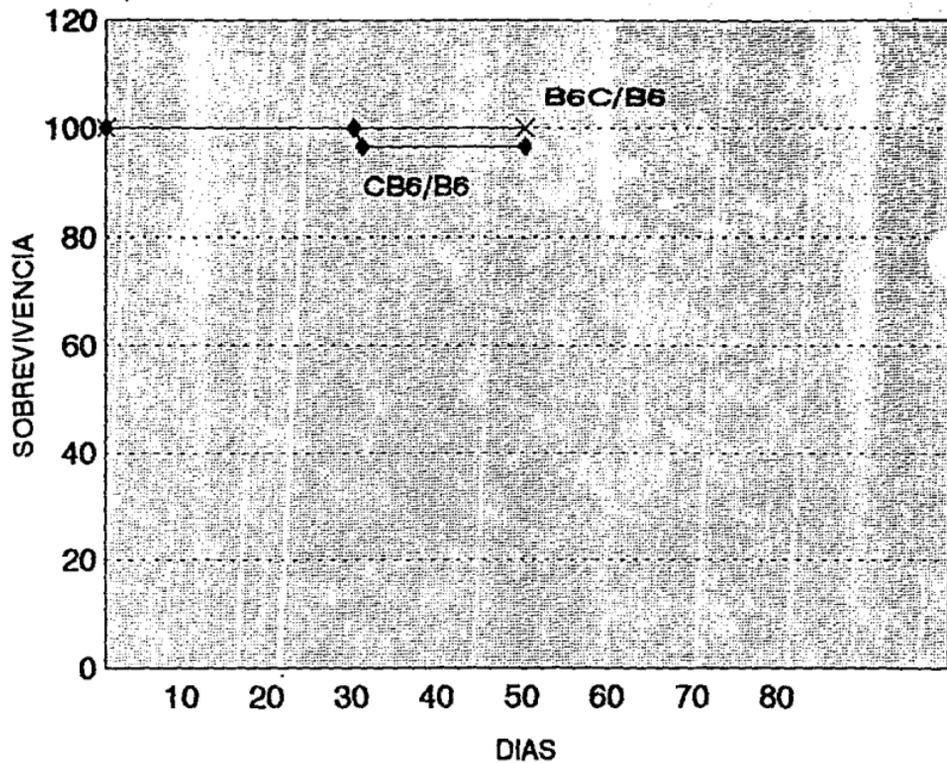


Fig. 15 PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE LAS CEPAS B6C/B6 Y CB6/B6.

GLOSARIO.

Alelo: Uno de un par o serie de genes alternativos que aparecen en un locus determinado de un cromosoma. existen en forma alternativa y codifican para una misma característica

Alelos múltiples: Tres o más alelos alternativos que representan un mismo locus en un determinado par de cromosomas.

Alogénico: Genéticamente diferentes, pero pertenecientes a la misma especie.

Antígeno: Sustancia, generalmente una proteína, que estimula la producción de anticuerpos al ser inducida en un organismo vivo.

Antígenos de Histocompatibilidad: Se encuentran en la superficie de las células nucleadas , son característicos de cada individuo; regulan las reacciones inmunitarias y además provocan el rechazo de aloinjertos.

Clona: Todos los individuos derivados por reproducción vegetativa de un solo individuo original.

Cromosoma: Cuerpos nucleoproteicos observables por microscopio durante la fase de la división celular, adquiriendo una coloración oscura al ser expuestos a tinciones básicas. Contienen a los genes que se encuentran dispuestos en una forma lineal.

Cruza dialéctica: Apareamiento genético a nivel molecular entre dos alelos.

Cruzamiento experimental: Cruzamiento retroactivo hacia el tipo progenitor recesivo o cruza entre individuos genéticamente desconocidos y un probador totalmente recesivo para determinar si el individuo en cuestión es heterocigoto u homocigoto para un determinado alelo.

Dominancia: Aplicase a un miembro de un par alélico de genes que tiene la capacidad de expresarse total o predominantemente sobre el otro. Carácter heredado que se expresa cuando el gen que lo gobierna se encuentra en estado homocigótico o heterocigótico.

Epistasia: Supresión de la acción de un gen o genes por otro gen o genes no alelos de los suprimidos. Los genes suprimidos son llamados hipostáticos; se distingue de la dominancia que se refiere a los miembros de un par alélico.

Gen: Unidad de herencia, unidad de DNA, situada en un lugar fijo en el cromosoma.

Genes Codominantes: Alelos, cada uno de los cuales produce un efecto independiente en individuos heterocigotos.

Genoma: Serie completa de cromosomas (por lo tanto de genes), transmitidos unicamente por un progenitor.

Linfocitos T citotóxico (LTc): Célula linfoide de la respuesta inmune que presenta el marcador CD8 y cuya función es la de destruir células tumorales.

Locus: Región del cromosoma donde se localiza un gen en particular (plural Loci).

Segregación Independiente: Distribución al azar de genes en los gametos cuando estos genes se encuentran en diferentes cromosomas. La distribución de un par de genes no es controlada por otros genes situados en cromosomas no homólogos.

Singénicos: Son animales genéticamente idénticos.