



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**FUSION CELULAR IN VIVO DE CELULAS TIROIDEAS
DE RATAS JOVENES EN LA GLANDULA TIROIDES DE
RATAS VIEJAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:**

ALEJANDRO TOVALIN AHUMADA

MEXICO, D.F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

INDICE

I	INTRODUCCION	I
1.-	Fisión Celular	1
1.1	Métodos Citológicos	
1.2	Métodos Histicos	
1.2.1	Microcirugía	
1.2.2	Corpo alóctico	
1.3	Métodos Químicos	
1.3.1	Soluciones Hipotónicas	
1.3.2	Compujos de Cadena Larga	
1.3.3	Monoclas	
2.-	Radioanálisis	5
2.1	Antecendentes	
2.2	Principio del Método	
2.3	Anticuerpo	
2.4	Muestreo del Suero	
2.5	Mediación	
2.6	Separación de la Fracción Libre y Unida	
2.7	Medición de la Radiactividad	
2.8	Cálculo de Resultados	
2.9	Control de Calidad	
3.-	Glándula Tiroidea	14
3.1	Anatomía	
3.2	Fisiología	
3.2.1	Regulación de la Tiroidea	
3.2.2	Enzimas Tiroideas	
3.2.3	Captación de Yodo	
3.2.4	Formación de Hormonas Tiroideas	
3.2.5	Secreción de Hormonas Tiroideas	
3.2.6	Características de las Hormonas Tiroideas	
3.2.6.1	T ₃	
3.2.6.2	T ₄	
3.2.7	Proteínas Unidas a Tiroxina	

	1.1.3. Características de los grupos de sujetos	14
	1.1.2. Características de los grupos de sujetos	15
	1.1.1. Características de los grupos de sujetos	16
	1.1.0. Características de los grupos de sujetos	17
3.-	Antecedentes	24
3.-	Clasificación	27
II	MATERIALES Y METODOS	30
1.-	Materiales	31
2.-	Metodología Experimental	
	2.1. Función Celular	
	2.2. Función Funcional	
	2.3. Caracterización Histológica	
III	RESULTADOS	33
1.-	Niveles de actividad de la T_4 en ratas jóvenes y adultas	33
2.-	Respuesta tiroidea en ratas jóvenes y adultas a la estimulación con T_4	39
3.-	Crecimiento Celular y Viabilidad de las células tiroideas inyectadas	34
4.-	Validación y Reproducibilidad del RIA empleado	35
5.-	Cuantificación de T_4 plasmática total por RIA. Grupos Testigo y Experimental	36
6.-	Estudio Histopatológico	44
7.-	Mortalidad en ratas mayores de 10 meses de edad	51
	ILUSTRACIONES	52
IV	DISCUSION	59

APUNTADE 1 (Soluciones y Técnicas) 2

V SISTEMAS 16

VI 28

1. INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como propósito general, el de estudiar el comportamiento de las células híbridas, en particular, las células híbridas de células somáticas, las células epiteliales híbridas, la hibridación somática y la hibridación de tejidos, así como, la hibridación de células híbridas, produciendo los tipos de hibridación somáticas y/o heterocarióticas, es decir, las hibridaciones somáticas y epiteliales del mismo género y especie de células de género, especie y reino respectivamente.

En el presente trabajo se han estudiado las células híbridas de células de diferente genotipo y con propiedades de especialidad para estudiar la hibridación celular de células híbridas (Kawano, 1974). Así mismo, se han estudiado las células híbridas de células híbridas, que se producen en la hibridación somática (Harris, 1977).

En 1970, se tuvo interés en la hibridación de células híbridas, lo cual culminó con la generación de una planta híbrida. En el presente trabajo se describe, por un lado, la hibridación somática y epitelial de células híbridas, después de cumplir los procedimientos de hibridación (Harris, 1977).

comparando la fusión de células de la misma especie que se fusionan espontáneamente en cultivo. La microrregla explota la capacidad de dos células para fusionarse en un momento específico del ciclo celular (punto del ciclo celular). El punto de fusión se controla por medio de placas de petri de células que se fusionan en cultivo, de tal manera que sólo una célula de cada par queda frente a frente. Con frecuencia, con una microrregla se logra la capacidad de controlar el momento de fusión, para formar una población específica de células. Una microrregla se inserta dentro de la otra célula, fusionándose con la célula de la otra especie celular.

Células en otras formas de la interfase difieren de la interfase, no se logran fusionar con este instrumento. La microrregla explota la capacidad de dos células para fusionarse en un momento específico del ciclo celular (punto del ciclo celular) (Zimmelman, 1981).

1.2.2. Campo eléctrico: Consiste en aplicar a las células un campo eléctrico de alta intensidad (10-200 V/cm) de alta frecuencia (4-50 MHz). Este tipo de fusión produce un porcentaje de fusión de la misma naturaleza celular, debido a una despolimerización de la misma. En el caso de hacer contacto entre membranas de células vecinas se produce la fusión celular (Zimmelman y Scherich, 1981).

1.3.1 *Computer-aided design* (CAD) is a process of designing a product using a computer. It involves the use of software to create a digital model of the product, which can be used to simulate the product's performance and to generate manufacturing instructions. CAD is used in a wide range of industries, including architecture, engineering, and product design.

1.3.2 *Computer-aided manufacturing* (CAM) is a process of manufacturing a product using a computer. It involves the use of software to control the manufacturing process, from the design of the product to the production of the final part. CAM is used in a wide range of industries, including metalworking, plastics, and electronics.

1.3.3 *Computer-aided engineering* (CAE) is a process of engineering a product using a computer. It involves the use of software to simulate the product's performance under various conditions, such as stress, vibration, and heat. CAE is used in a wide range of industries, including aerospace, automotive, and industrial machinery.

estas sustancias, sin embargo, el uso del dimetilsulfóxido, como medio de fusión de 10 a 20% (por volumen) (1/5), la cual es la suficiente para obtener un mayor porcentaje de fusiones (Davidson y Gould, 1977). Se han reportado algunos resultados que indican que las células, en presencia de ciertos ácidos, como son: Ácido Láctico, Ácido Clórico, Ácido Linoléico, Ácido Mítico, Ácido Glucónico, Ácido Mítico, entre otros.

1.3.3' Mezclas: La única mezcla reportada es la de FEG-DMSO (Dimetilsulfóxido) utilizada por primera vez en microorganismos por Hopwood y col. (1977), obteniendo un incremento en la fusión de casi un 100%.

En 1981, Gualano-Ruffalo (Gualano-Ruffalo, 1981) utilizó por vez primera la mezcla FEG-DMSO para fusionar células eucarióticas *in vitro*, reportando fusión en casi el 100% de las células y en algunos casos fusión de las células.

2.- ANÁLISIS ENQUANALISIS

2.1 Análisis enzimático:

El radioenzayoanálisis (RIA) es una técnica muy sensible y específica para medir cantidades extraordinariamente pequeñas de sustancias que no pueden ser determinadas por otros métodos.

Este método constituye uno de los más recientes en las -

estudios de los últimos años, que han permitido al organismo producir
la hormona de la diabetes, insulina, para la cual se
pueda producir en cantidad. Como resultado es posible en la actualidad
producir la insulina humana, que es la misma que la que produce el
organismo humano, en grandes cantidades. Esto es lo que permite
el tratamiento por la insulina y la especificidad de la acción de la
insulina en el organismo. De hecho, como resultado, se ha
desarrollado de nuevos métodos terapéuticos con fines de la insulina y
de otros.

Fue gracias al trabajo de Rosen y Yalow, iniciado hace 24
años, que se pudieron extraer las hormonas del RIA. Ellos identificaron anti-
cuerpos anti-insulina y desarrollaron un método muy ingenioso, con el
cual pequeñas cantidades de esta hormona eran medidas mediante el uso
de láminas celofánicas.

2.2 Principio del método:

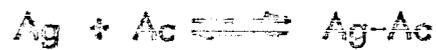
En el RIA se utiliza un anticuerpo que se une a la hormona, que se
usa para medir y a través de esto, se mide la cantidad de hormona en el or-
ganismo. El RIA depende de la unión específica de la hormona a la
anticuerpo que se utiliza. La especificidad de la unión de la hor-
mona al anticuerpo es fundamentalmente un fenómeno, que no es influenciado con
ninguna otra sustancia que se encuentra en el organismo humano.

equilibrio con el que al de la sustancia que se mide. De hecho, el uso de pequeñas cantidades de anticuerpo permite detectar grandes y pequeñas de desplazamiento de la unión por efecto de la sustancia que se mide. Por lo general, los anticuerpos se obtienen mediante la hipersensibilización de animales experimentales, aunque se pueden utilizar anticuerpos que ocurren en fetos de ratón. Independientemente de su origen, el anticuerpo debe tener una afinidad por la sustancia que se va a medir. Los métodos de análisis de este tipo frecuentemente son capaces de detectar la presencia de sustancias en concentraciones de 1^{-10} picogramas (10^{-12} g) por mililitro.

Los moléculas del anticuerpo no necesitan ser muy específicas si el detector es específico, por lo que es posible inmunizar con materiales más bien impuros. Por lo tanto, la sustancia marcada radioactivamente debe ser de alta actividad específica y pura; y debe existir un estándar que pueda ser utilizado para las comparaciones. El otro requisito importante que se necesita en el RIA, es un sistema que permita la separación del antígeno radioactivo.

El anticuerpo se diluye a tal grado que sólo se une en una cantidad limitada a pequeñas cantidades del antígeno marcado y la adición de antígeno no marcado reduce el grado de unión del antígeno marcado. La reacción es dosis-dependiente por la competencia del antígeno marcado por las sitios de unión del anticuerpo.

En el RIA, el antígeno y el anticuerpo específicos forman un complejo soluble antígeno-anticuerpo. Esto puede ser escrito:



donde Ag representa el antígeno, Ac el anticuerpo y Ag-Ac es el complejo antígeno-anticuerpo.

Una reacción similar es obtenida usando un antígeno marcado (Ag^*):



en este caso, el complejo Ag^*-Ac posee la radioactividad del antígeno marcado que está unido al anticuerpo. La adición de antígeno no marcado a esta última reacción, produce una competencia entre el antígeno no marcado y el marcado por los sitios de unión del anticuerpo, siempre y cuando el anticuerpo esté en una concentración limitada:



El principio del RIA es el de la competición por competitividad, de la unión entre antígeno marcado y no marcado por un anticuerpo específico. Una concentración elevada de antígeno no marcado, reducirá la cantidad de radioactividad del complejo antígeno-anticuerpo y elevará la del antígeno marcado libre.

2.3 Antisuero:

Cuando el material que se desea investigar es un suero, se absorbe conjugados a moléculas sueltas (albúmina) e inyecta el suero de la especie de donde se obtiene el suero anti suero del animal. Los animales recomendados son el conejo y el caballo.

El antisuero debe tener dos propiedades importantes: primero, debe unirse al antígeno mediante una fuerte reacción de alta energía; y segundo, debe ser altamente específico.

Una vez obtenido el antisuero se debe titular. Esto se realiza mediante una curva de titulación del anticuerpo, que se obtiene variando las diluciones del antisuero en el RIA, en presencia de una concentración constante de antígeno marcado y una cantidad de antígeno no marcado. El título se define como la dilución final requerida de un antisuero, para unir la cantidad equivalente de antígeno marcado en presencia de antígeno no marcado. Una alta sensibilidad se obtiene en el intervalo donde la dilución muestra de 20 a 70% de unión o la reactividad, el gráfico el porcentaje de unión total versus dilución del antisuero.

La especificidad de un antisuero es probado con estudios de reactividad cruzada de materiales relacionados. Un antisuero específico debe mostrar un desplazamiento total por el antígeno conocido y ninguno por otras sustancias.

2.4 Maraje Radiactivo:

Cuando el antígeno que se desea usar es de naturaleza proteica, es fácil sintetizarlo o incorporar la partícula radiactiva - (^{125}I o ^{14}C). Sin embargo, para los antígenos de naturaleza polisacáridica, lipídica, vírica, nucleoproteica y otras sustancias ya marcadas recientemente en el mercado. Cuando las sustancias por marcar tienen una molécula compleja, se utiliza la técnica de la peroxidación (Hunter, 1974).

2.5 Incubación:

En el RIA, los diferentes constituyentes son incubados juntos a una temperatura y tiempo escogido. Ambas, la dilución del antisuero y la concentración del antígeno marcado, son agregadas en forma idéntica en todos los tubos. La única variable es la concentración del antígeno no marcado, ya sea en los sueros estándares o en las muestras. La dilución del antisuero ha sido previamente seleccionada mediante una curva de diluciones (ver sección 2.3).

La concentración del antígeno marcado se escoge de tal manera que presente suficientes cuentas por minuto para permitir la detección y es de la misma magnitud que la mitad de la concentración del antígeno no marcado, para permitir la competencia por el anticuerpo.

Como regla general, todas las reactivas son ofrecidas cuasi

variedad a los tubos de ensayo e i sujeta de la misma dirección de tiempo. En los "Blancos" se hacen incubaciones para verificar la especificidad del antígeno no marcado. En los "Blancos", el antisuero es complementado con algunos tubos que contienen y se otros que no. Los componentes son agregados en el siguiente orden: (1) estándares o muestras desconocidas, (2) antisuero, y (3) antígeno marcado.

La incubación se prolonga hasta que se alcanza el equilibrio en la reacción Ag-Ac. En ocasiones el antígeno no marcado (estándares y muestras) es incubado previamente con el antisuero, para permitir un mayor contacto de los anticuerpos con el antígeno no marcado que con el marcado. Esto incrementa la sensibilidad del análisis.

La temperatura de incubación es importante. El equilibrio es alcanzado más rápido a temperatura ambiente o a 37°C que a 4°C. Sin embargo, altas temperaturas incrementan el daño a los antígenos -- marcados y no marcados durante la incubación, disminuyendo sus capacidades de enlace.

2.6 Separación de la fracción Libre y Unida:

La separación se realiza al final de la incubación. Es necesario separar el complejo antígeno-anticuerpo del antígeno marcado libre para medir su radiactividad por separado, con el fin de indicar la proporción del antígeno marcado unido al anticuerpo, como resultado -

del efecto competitivo de la adsorción de antígenos a las células. La actividad de anticuerpos precipitables (libre y unido) se compara con la obtenida en las estimaciones que forman la curva estándar.

En el método de doble inmunodifusión por difusión en gel, la muestra de dos antígenos, la primera es exponiendo el complejo Ag-Ac del -- Ag 112a (técnica del doble entrecruje, precipitación fraccional); y el segundo es separando el antígeno libre de la muestra de inmunización (mezcla carbón activo-diatórea, silicatos, resinas de intercambio iónico).

2.7 Medida de la Radioactividad:

Para la medición de antígenos marcados con ^{125}I o ^{131}I , generalmente se utiliza un contador de centelleos gamma, si el antígeno marcado con tritio o ^{14}C son cuantificados en emulsiones de centelleo líquido. Para antígenos radioiodinizados, el ensayo puede ser hecho directamente en los tubos de ensayo que han servido para la inmunización, cuando el precipitado es contado. Cuando el sobrenadante es contado, se transfiere previamente a otros tubos utilizados con este propósito. Los cuantos medidos en el sobrenadante son complementarias de los medidos en el precipitado, la suma de ambos representa la radioactividad total introducida en el análisis.

2.8 Cálculo de Resultados:

Los resultados son calculados comparando los valores de los --

muestras con las de la muestra estándar. Hay otros tipos de curvas de afinidad. El más simple es una curva de afinidad de la actividad en U/L (unidades por minuto) de la fracción unida al anticuerpo, U , de cada muestra sobre la radioactividad unida al anticuerpo, U_0 , de la muestra de la curva estándar, que está en la muestra. Las curvas por afinidad pueden ser isoplásticas, ya sea por el porcentaje de actividad unida a unígeno marcado, como en el 1976 la actividad total colocada en cada tubo, o por el porcentaje calculado de la unión máxima, utilizando como 100% la máxima actividad unida en el tubo con dosis cero de la curva estándar.

Algunos autores utilizan en la ordenada el porcentaje de actividad unida al anticuerpo sobre la libre (U/L). Usando una escala logarítmica para la concentración de antígeno no marcado; en papel semilog una curva en forma de S es obtenida.

La linealización de la curva estándar es posible utilizando la transformación logit, propuesta por Redford y col. (1974). El logit del ratio U/U_0 (ratio de la radioactividad unida al anticuerpo, U , de cada muestra sobre la radioactividad unida al anticuerpo de la dosis cero, U_0) es colocada sobre los ejes del eje cuando una escala logit, mientras que la concentración de antígeno no marcado es puesto sobre una escala logarítmica en las abscisas. Los valores tienen que ser primeramente corre-

gitud de los cristales, etc., y el uso de los métodos de -
- - - - -
plena a las muestras.

2.9 Control de Calidad:

El desarrollo de un sistema de control de calidad para evaluar la exactitud y reproducibilidad del sistema de ensayo de control. Está basado en el cominamiento de pocas masivas control por duplicado, triplicado, etc., en cada análisis. Estas muestras pueden ser placas de concentración desconocida del ensayo que será medido o pueden ser placas previamente tratada con células activas para eliminar el ensayo enérgico, y a las que se les ha añadido una cantidad conocida del ensayo. La verificación interensayo puede ser fácilmente calculada con la prueba de "t" de Student, o alternativamente se puede calcular la variación interensayo mediante el uso del coeficiente de variación (Redford, 1974).

3.- LA GLANDULA TIROIDES

3.1 Anatomía:

La glándula tiroidea está presente en todos los vertebrados. Una proliferación de células endodérmicas en la pared ventral de la faringe, entre la primera y segunda bolsa faríngeas, origina una tiróides pri-

nitiva. Esta agrupación celular se diferencia para formar los lóbulos primarios e irregulares, los cuales permanecen unidos por un istmo. Esto se alcanza hasta la séptima semana en el humano, en que la glándula ha asumido su forma y posición definitiva. Su crecimiento se acompaña de un aumento en la masa tiroidea proporcional al incremento de peso corporal. Alrededor de las semanas 11 a 12, se alcanza el estado final de la organización folicular y la concentración de yodo y la síntesis de hormonas pueden ser demostrados (Fisher, 1974).

Esta glándula se llamó *thyroides* (*thyros* = un líquido oval, -- *eidos* = forma) porque tiene forma de escudo. Se encuentra formada por dos lóbulos reunidos por un istmo de tejido tiroideo y se halla por encima -- del segundo y tercer arcos cartilagineos de la tráquea, y por debajo del cartilago cricoideo; los dos lóbulos en su mayor porción se adaptan a la parte inferior y lateral de la tráquea, inmediatamente por debajo de la laringe. La glándula se encuentra muy vascularizada y tiene una de las tasas más altas de flujo sanguíneo por gramo entre los órganos del cuerpo. También está inervada por fibras simpáticas y parasimpáticas. En el humano adulto pesa aproximadamente de 12 a 22 gramos, mientras que en la rata no excede de 60 mg.

La glándula está rodeada de dos cápsulas; la externa es continua con la cara pretracheal y la interna debe considerarse como la verdadera cápsula de la glándula, está formada de tejido conectivo y protege

de células al interior de la glándula, formando el parte interno y casi no a veces en algunas, formando a irregularidades.

Las unidades estructurales y funcionales de la tiroides son numerosos folículos o células, los cuales tienen forma esférica irregular y están revestidas de células epiteliales cuboidales. Los folículos están llenos de un material homogéneo llamado "coloide", el cual es el elemento cuando la glándula está inactiva, los folículos son grandes y el epitelio es plano; en cambio, cuando la glándula está activa, los folículos son pequeños, las células cuboidales y el borde del coloide está festonado - formando muchas pequeñas lagunas de reabsorción.

La cara de las células que está en contacto con el coloide, - presenta microvellosidades que se proyectan al interior del mismo. Hay un retículo endoplásmico prominente. Las células tiroideas individuales descansan sobre una lámina basal que las separa de las células adyacentes.

3.2 Fisiología:

La glándula tiroides produce hormonas que influyen en la velocidad del metabolismo celular; vgr., intervienen en el crecimiento, estimula el consumo de O_2 , son necesarios para la maduración normal, etc.

3.2.1 Control de la tiroides: La glándula tiroides está controlada directamente por la Hormona Estimulante del Tiroideo (HET), producida por la Hipófisis anterior, la cual a su turno es controlada por el Factor liberador de la Tirotropina (FT) del Hipotálamo.

La HET es producida por células beta de la hipófisis anterior, y es una glicoproteína con un peso molecular de 25,400 D. La HET es una hormona "trófica", significando que su función es regular la síntesis y liberación de otra hormona por medio de células "dianas". Se cree que la HET ejerce su acción combinándose con receptores específicos en la membrana de células dianas. Esta combinación causa la activación de la adenosil ciclasa y por lo tanto un aumento de AMPc. El incremento de AMPc intracelular produce un rápido incremento en la síntesis del colágeno y un aumento en la oxidación de la glucosa en la glándula. El incremento en la oxidación de la glucosa, aumenta la formación de NADHP y de otras enzimas necesarias para varias reacciones de síntesis y de secreción de la hormona. La HET también incrementa la síntesis de fibrinógeno.

El FLT es un triptófano compuesto de ácido glutámico, histidina y prolina. El FLT se produce en el área de la eminencia mediana del hipotálamo y se libera al sistema portal hipofisario, un sistema arterial que conecta a la hipófisis anterior.

Estos dos hormonas "reguladoras" están bajo la influencia de un mecanismo de retroalimentación que compromete a las hormonas T₄ y T₃ (tiroxina y triyodotiroxina) libres circulantes.

3.2.2. Enzimas tiroideas:

Se han localizado varias, las cuales son necesarias para la fabricación adecuada de las hormonas tiroideas. El nivel de estas enzimas está controlado generalmente por la TSH. Las enzimas son las siguientes:

- i Peroxidasa: Una enzima necesaria para oxidar el yoduro a yodo orgánico. Bloqueada por metimazol, yoduro y propiltiouracilo.
- ii Yodinada: Una enzima que es responsable del acoplamiento enzimático del yodo a la tirosina. Se bloquea igual que la peroxidasa.
- iii Proteasa: Es la responsable de la hidrólisis de la T_3 y T_4 a partir de proteína tiroglobulina, antes de liberarlas a la circulación. Se bloquea con yodo.
- iiii Desyodinasa (dehalogenasa): Es una enzima que hidroliza al yoduro de las moléculas de monoyodotirosina y diyodotirosina (MYT y DYT) no unidas. El yoduro liberado se reintegra a la fuente tiroidea correspondiente para ser utilizado nuevamente.

3.2.3 Captación del yoduro:

El yodo ingerido es reducido en el tracto intestinal a yoduro inorgánico antes de ser absorbido. Las células foliculares concentran el

yoduro de yodo yodo esivo, este de la circulación hacia el coloi-
 do. En la glándula el yodo es rápidamente oxidado y unido a la posición
 3 de los residuos de tirosina. El tiroideo humano normal presenta una dis-
 tribución promedio de la siguiente: 13% de I_2 , 20% de MYT, 37% de DYT,
 30% de T_4 y 7% de T_3 , sólo se encuentran trazas de T_3 reversa. En la -
 tiroides de un 13% de I_2 , 20% de MYT, 37% de DYT, 26% de T_4 y 3%
 de T_3 .

3.2.4 Formación de las hormonas tiroideas:

Las hormonas tiroideas se forman de la tiroglobulina de tiro -
 de la glándula. La tiroglobulina es una proteína de p.m. aproximado de
 650,000 D. La tiroglobulina contiene aproximadamente 140 residuos de -
 tirosina.

La tirosina presente en la tiroglobulina es yodinada cerca de
 la interfase célula-coloides, para formar la MYT y la DYT en una relación
 de 1 a 2 aproximadamente. Estas yodotirosinas se acoplan para formar la
 T_4 y la T_3 , en una relación aproximada de 3 a 1. Durante este proceso,
 las hormonas están aún unidas a la tiroglobulina que permanece en el co-
 loide.

3.2.5 Secreción de hormonas tiroideas:

Las células foliculares ingieren coloides por pinocitosis. Los
 pinosomas se fusionan con lisosomas, de manera que los aminoácidos y p -

ees sobre las unidades de tiroxina, yodida y la diiodotiroxina a su vez por las peroxidasas, formando T_3 , T_4 , MIT y DIT en el citoplasma. Las yodotiroxinas son desyodadas por una yodotiroxinas deshalogenasa; el yodo y la tirosina liberada se reutilizan para sintetizar la tiroxina de nueva hormona. La T_3 y la T_4 se liberan a la circulación sanguínea.

3.2.6 Características de las hormonas tiroideas en la sangre:

3.2.6.1 Triyodotironina (T_3): La T_3 constituye solamente un 5% de las hormonas tiroideas circulantes. De un 30 a un 50% de la T_3 presente en la sangre se deriva de la conversión celular periférica de T_4 a T_3 . La T_3 es la hormona tiroidea más activa, de 1 a 4 veces más potente que la T_4 . Está débilmente unida a TBG (Tiroxina unida a globulina).

La T_3 tiene una vida media más corta que la T_4 (día y medio). La concentración sérica de T_3 es de aproximadamente 0.1-0.2 ug/dl, variando el intervalo según el método de RIA utilizado. La producción de T_3 diaria es de 50 ug; el 99.7% está unido a proteína y el 0.3% está libre.

3.2.6.2 Tetrayodotironina / tiroxina o T_4 : Principal hormona circulante (75%). Se encuentra fuertemente unida a las proteínas del suero, 60-75% está unida a TBG, 30-13% unida a TBPA (tiroxina unida a prealbúmina) y 5-10% unida a albúmina. La afinidad de la TBG por la T_4 es de 2 a 6 veces mayor que por la T_3 . La T_4 es menos activa que la T_3 y su vida media es de 6 a 7 días. La producción total diaria es de 100 ug.

La T_4 sólo se encuentra en una proporción, ya que se convierte en T_3 por el β -oxidación del lípido (Fig. 1b, 1971). El intervalo normal de concentración sérica es de 4.7 a 10.7 $\mu\text{g}/\text{dl}$, variación de un 1% el RIA utilizado. Más o menos el 99.98% está unido y el 99.96% de la T_4 circulante está unida a proteínas. La porción libre es la que controla los procesos metabólicos del organismo.

3.2.7 Proteínas unidas a Tiroxina:

Son la TBG, la TBPA y la Albúmina. A pesar de que las concentraciones de TBPA y albúmina son mayores que la de TBG, la unión de T_3 y T_4 a las dos primeras es muy débil.

3.2.8 Metabolismo de las hormonas tiroideas:

Las hormonas tiroideas se encuentran en casi todos los tejidos del organismo. La mayoría de las hormonas son captadas por el músculo esquelético, pero es el hígado el que tiene la mayor capacidad para concentrar y metabolizar la tiroxina. El metabolismo de las hormonas tiroideas se produce de diferentes maneras; incluyendo la conjugación (como glucuronido la T_4 y sulfato la T_3), degradación (en hígado y músculo esquelético), desaminación o transaminación (hígado y riñón), la cual forma el ácido pirúvico o el citrato del ácido lático. La desaminación de los análogos del ácido pirúvico forma los análogos del ácido oxálico, el TETRAC y el TRIAC.

3.2.9 Efectos de las hormonas tiroideas:

La T_3 y la T_4 incrementan fuertemente el consumo de O_2 de casi todas las tejidos metabólicamente activos, con excepción del endotelio celular, la retina, el cerebro, las glándulas endocrinas, el hígado y la lipólisis anterior. Cuando la tasa metabólica es fuertemente perturbada por estas hormonas en los adultos, la excreción de N_2 aumenta.

Las hormonas tiroideas no estimulan el útero directamente, pero son esenciales para los ciclos normales de menstruación y fertilidad.

Las hormonas ejercen efectos sobre el sistema nervioso periférico. El tiempo de reacción de los reflejos mióclícos se acorta en el hipertiroidismo y se prolonga en el hipotiroidismo.

Las hormonas tiroideas incrementan la tasa de absorción de los carbohidratos en el aparato digestivo. También hay una estimulación de la síntesis de colesterol y de los mecanismos hepáticos que lo eliminan de la circulación. Estas hormonas son esenciales para el crecimiento y el buen estado del esqueleto.

3.2.10 Mecanismo de acción:

Una posible explicación del mecanismo de acción de la T_4 y sus derivados, es que hace disminuir la eficiencia de la transducción de la energía por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. El resultado sería: menos energía para fosfatos macroérgicos y

mayor energía disipada en forma de calor. La tiramina estimula la respiración mitocondrial, la fosforilación y la actividad de las enzimas respiratorias. Se une a los núcleos de las células y su efecto calorígeno es bloqueado por la Tiramicina y Antitiramicina D. Por lo tanto, parece ser posible que el efecto sobre la tasa metabólica sea consecutivo a un efecto sobre la síntesis de ARN. Parte del incremento en el consumo de O_2 se debe a la estimulación del transporte de SO_2 a través de las membranas celulares.

La activación de la síntesis de proteínas también parece intervenir en el mecanismo por el cual las hormonas tiroideas producen sus efectos favorecedores del crecimiento. Este efecto sobre la síntesis proteica parece ser llevado a cabo por incremento en la producción de ARN ribosómico y aumento en la fijación de éste al retículo endoplásmico.

4.- ANTECEDENTES

Brasbaugh y Schell (1976) describen la restauración de síntesis de pigmento en melanocitos anelánicos de pollo después de la fusión celular in vivo con melanocitos de piel de pollo. Este dato es interesante ya que se trataba de la ausencia genética de la síntesis de melanina, o sea, se obtuvo una complementación genética. En el hombre tal complementación ha sido descrita por De Weerd-Kestelein y col. (1972 y 1973), quienes lograron en híbridos de fibroblastos de Xeroderma pigmentosum y fibroblastos sanos en cultivo, la restauración en la reparación de ADN expuesto a radiación ultravioleta. También en células humanas, Galjaard y col. (1974) lograron complementación genética en la enfermedad de Tay-Sachs (falta de hexosaminidasa A) y en la enfermedad de Sandhoff (falta de hexosaminidasa A y B).

Keightley y col. (1975) describieron la curación de una inmunodeficiencia combinada, en un niño con deficiencia de adenosina desaminasa, por medio de trasplante de hepatocitos fetales. En este caso no hubo rechazo del injerto, lo cual puede explicarse por el bajísimo nivel que en dicho paciente se encontraban todos los mecanismos inmunitarios.

Sutherland y col. (1980) informaron del trasplante de células sanas de médula ósea y de células hepáticas en ratones acatalasémicos y en ratones con inmunidad humoral negativa por el timo. -

Las ratas fueron previamente radiadas subletralmente. Después del -
 transplante observaron una mejora en todos los niveles deficientes, sin
 embargo a largo plazo se presentó el rechazo inmunológico como un -
 problema muy grande.

García, A. (1980) señala la fusión celular in vitro de he-
 patocitos de rata con hepatocitos de otra rata donadora; entre otros eran -
 células senes, la fusión se realizó con PEG. En este trabajo se mencio-
 na la gran utilidad que acarrearía la posibilidad de complementación -
 genética al ser aplicada dicha técnica al hombre.

González-Pamírez y col. (1981) señalan la formación de -
 hemocariocitos hepáticos in vivo en la rata, utilizando PEG. La impor-
 tancia de este trabajo radica no sólo en la superación del rechazo histo-
 patológico, sino en la posible adquisición de genomas completos de cé-
 lulas de otro animal, lo que plantea la posibilidad de obtener genes que
 no existan desde el nacimiento y que sean causa de diversas enfermeda-
 des congénitas de tipo genético, así como la adquisición de genomas -
 juveniles que puedan corregir defectos metabólicos de genomas seniles.
 Se señala su posible utilización en casos humanos, por ejemplo la hemo-
 filia, la diabetes y en la senilidad entre otras.

El siguiente paso que se plantea es disminuir la frecuencia de
 rechazo histopatológico y la complementación genética, como resultado
 de la fusión celular, en un organismo vivo.

La rata es un animal idóneo para este tipo de experimentos, ya que es de fácil manejo y mantenimiento, además de ser altamente sensible a la respuesta inmunológica. Dada sin embargo, la dificultad de trabajar con una especie de ratas con alguna deficiencia genética, nosotros pensamos en alguna deficiencia glandular, en especial la mostrada en la tiroidea senil.

En los últimos años se han realizado estudios con el objeto de observar los cambios de concentración en las hormonas tiroideas relacionadas con la edad (Westgren, 1976). En el humano se ha encontrado una disminución en la concentración de T_4 / T_3 , con un aumento de T_3 reversa conforme se envejece. En la rata nosotros observamos una relación inversa en la concentración de T_4 con respecto a la edad (ver resultados), aunque Jang y Distefano (1982) señalan que existe una mayor transformación de la T_4 hacia T_3 reversa conforme envejecen las ratas. Nosotros pensamos que la disminución en la concentración de T_4 se deba a una falta de producción de la misma en la tiroidea.

Por otro lado, observamos que las ratas seniles (18 meses) -- muestran una baja respuesta a la estimulación con HET, en comparación con las ratas jóvenes (3 meses) (ver resultados), con lo cual se comprueba el bajo estado funcional de la tiroidea en la senectud de las ratas, dada su incapacidad para producir T_4 como respuesta a la estimulación.

Según lo planteado anteriormente, es probable que los híbridos producidos por la fusión celular entre células jóvenes tiroideas, que tienen un genoma en buen estado y potencialmente capaces de producir hormonas tiroideas, con células tiroideas de un organismo viejo, que contienen un genoma viejo e incapáz de producir suficientes hormonas tiroideas y de responder a la estimulación de la HET, puedan producir hormonas tiroideas como si fuera un organismo más joven, incrementando sus niveles en la sangre. Estos incrementos pueden ser medidos utilizando una técnica capaz de detectar pequeños cambios de estas hormonas en la sangre, como lo es el Radioinmunoanálisis.

La tiroxina se eligió como hormona a medir por las siguientes razones: 1) es la hormona tiroidea que se produce en mayor cantidad, 2) es la hormona tiroidea que principalmente se modifica con la edad y 3) la imposibilidad de contar con técnicas de RIA desarrolladas para cuantificación de T_3 y T_3 reversa en plasma.

5.- OBJETIVO

En el presente trabajo se intenta observar en ratas seniles, que tipos de manifestaciones histopatológicas y modificaciones en los niveles de concentración de Tiroxina plasmática, se expresan al formarse in vivo en la tiroidea senil, homocariocitos entre las células seniles de la glándula y células tiroideas jóvenes in situ.

II MATERIALES Y METODOS

1.- MATERIALES.

1.1 Material Biológico.

Las ratas empleadas fueron de la cepa Wistar Inbred (WI). Un lote (n=16) con una edad aproximada de tres a cuatro meses, y con un peso aproximado de 200 a 300 gramos. Otro lote (n=16) con una edad de dieciocho a treinta meses y peso de 400 a 500 gramos aproximadamente. Todas las ratas utilizadas fueron de sexo masculino.

1.2 Reactivos.

Los reactivos químicos utilizados se obtuvieron de fuentes comerciales (ver apéndice).

2.- METODOLOGIA EXPERIMENTAL.

2.1 Fusión Celular.

Las ratas jóvenes fueron inicialmente sacrificadas; los lóbulos extraídos se recibieron en portabjatos con godete, conteniendo Solución Salina de Hanks (SSH) (A1, 1). Los lóbulos se fragmentaron con navajas estériles y se lavaron con SSH tres veces, para eliminar la mayor cantidad de sangre. Posteriormente se colocaron en un recipiente conteniendo una mezcla enzimática de

Triptina y Celastrola (A1, 2) (Kawa, 1973). La digestión enzimática fue realizada a 37°C, con agitación durante 40 minutos y a un pH de 7.2. Posteriormente se lavó con SSH para eliminar el remanente de las enzimas en el medio y se centrifugó la suspensión celular a 1000 rpm durante 5 minutos, a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido fue eliminado y se agregó una gota de PEG (A1, 3) al botón celular, dejándolo actuar durante 30 segundos. Al término de este tiempo se agregaron 3 ml. de Medio de Eagle (A1, 4) para lavar el PEG; la suspensión celular se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones anteriores. Se eliminó el sobrenadante, quedando un botón de células tiroideas con una delgada capa de PEG en sus membranas, según Davidson (1976); el botón celular fue resuspendido en 0.1 ml. de Medio de Eagle aproximadamente.

Una vez obtenida esta suspensión de células se tomaron muestras para las pruebas de viabilidad y conteo celular. Se empleó la prueba de exclusión de Nigrosina para medir la viabilidad celular. La solución de Nigrosina (A1, 5) se agregó a la muestra, donde las células que permanecen claras (sin teñir) son las viables. El conteo celular se realizó en un hemocitómetro.

Paralelamente a las pruebas de viabilidad y conteo celular, las ratas vírgenes receptoras del grupo experimental (n=10) fueron anestesiadas con éter, se les colocó la región del cuello hasta dejar

expuesta la glándula Tiroidea. Cada bulto receptor fué inyectado con 12.5 μ l de la suspensión celular, utilizando para esto una jeringa de 50 μ l de capacidad y con aguja del #31 (Marca Hamilton). La herida fué suturada cuidadosa y se observó la recuperación postoperatoria de los animales. Todo el procedimiento descrito se efectuó en condiciones estériles.

Las ratas viejas receptoras del grupo testigo (n=6), fueron inyectadas con células sin FEG.

2.2 Evaluación Funcional.

A todas las ratas receptoras se les estimuló con Hormona Estimulante del Tiroidea bovina (HETb) (A1,6), en dosis de 333 mU/100 g. de peso, por vía intravenosa (iv), de acuerdo con el trabajo de Keffer et al. (1976), tomando una muestra sanguínea basal y otra después de tres horas de aplicar la inyección; la muestra sanguínea se obtuvo por punción de la vena caudal de la cola del animal. Este tratamiento se realizó antes de la operación y cada dos semanas después de la misma, hasta la octava semana (ver cuadro 1). Utilizando la técnica del Radioinmunoanálisis, desarrollada en la Clínica de Tiroidas del Instituto Nacional de la Nutrición -- Salvador Zubirán, se determinó la concentración de tiroxina plasmática en cada una de las muestras de plasma de ambos grupos, testigo y experimental (A1, 7).

2.3 Inclusión Histopatológica.

Para el estudio histopatológico se seleccionó una rata de cada grupo, desde la segunda hasta la séptima semana posterior a la exposición. Los glándulas del páncreas se fijaron en formol neutro al 10% en amortiguador de fosfatos, durante 48 horas. Posteriormente se colocaron en cápsulas etiquetadas para ser incluidas en parafina (según técnica convencional). Posteriormente se hicieron cortes en el microtomo, con un espesor de 5 micras. Los cortes se desparafinaron y tizaron con Hematoxilina-Eosina; finalmente se montaron sobre portacortes, utilizando resina sintética (Nazelof, 1976).

Se estudiaron aproximadamente 20 laminillas de cada fivoides y las zonas adecuadas se fotografiaron por medio del ULTRAPHOT (Marca Zeiss).

CUADRO 1

GRUPO EXPERIMENTAL

R A T A S

	No.8	No.9	No.5	No.12	No.16	No.11	No.6	No.1	No.7	No.15
0	E O	E P	E E	E R	E A	E C	E I	E O	E N	
2	E	MB	E	MB	MB	E	MB	E	-	E
3			MB	E	E	-	E	-	E	MB
4					MB	E	-	E	MB	-
5						-	E	MB	E	-
6						E	MB	E	MB	MB
7							E	-	E	-
8								E	-	-

GRUPO TESTIGO

R A T A S

	No.18	No.20	No.19	No.21	No.22	No.13			
0	E O	E P	E E	E R	E A	E C	E I	E O	E N
2	E	E	E	E	E	E	E	E	E
3		MB	-	-	-	-	-	-	-
4			E	E	E	E	E	E	E
5				-	-	-	-	-	-
6				E	E	E	E	E	E
7					MB	-	-	-	-
8						E	E	E	E

- TIROIDECTOMIA Y SACRIFICIO DE LA RATA
 MB MUESTRA SANGUINEA BASAL
 E ESTIMULACION CON HETb (MB y muestra a las tres horas)

III RESULTADOS

Los resultados obtenidos se pueden resumir de la siguiente manera:

1.- Nivel de circulación de T_4 en ratas jóvenes y seniles.

Utilizando la técnica del RIA, se determinó la concentración de T_4 total en plasma, en un lote de ratas jóvenes (3 a 4 meses de edad) y en otro de ratas viejas (18 a 30 meses), obteniéndose una marcada diferencia en los valores de ambos grupos (lotes de 15 ratas):

Jóvenes: $5.1 \pm 0.6 \mu\text{g } T_4/\text{dl.}$

Seniles: $2.4 \pm 0.7 \mu\text{g } T_4/\text{dl.}$

Los valores escritos representan la media aritmética de cada lote \pm la desviación estándar. Los valores son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0.001$).

2.- Respuesta tiroidea en ratas jóvenes y seniles a la estimulación con HÉTB.

Las ratas del lote joven y senil, del inciso 1, fueron estimuladas con HÉTB, mediante la administración intraperitoneal de una dosis de 333 mU/100 g de peso (Schieff, 1976). Se obtuvieron muestras sanguíneas al tiempo cero, una, dos y tres horas después de la administración de HÉTB.

Las ratas jóvenes (n = 5) mostraron una franca elevación a partir de la segunda hora, siendo ésta mayor a las tres horas. En la cuarta hora después de la estimulación, la elevación en ningún caso fué mayor de 3 µg T₄/dl (Gráfica 1).

Las ratas seniles (n = 4) mostraron en la primera y segunda hora una ligera elevación, siendo solamente a las tres horas significativamente diferente (p = 0.01) con respecto al valor del tiempo cero (Gráfica 2). En ningún caso la elevación fué mayor de 1.5 µg de T₄/dl.

3.- Conteo celular y Viabilidad de las células tiroideas inyectadas.

La cantidad de células inyectadas en cada una de las glándulas tiroideas receptoras, fué calculado mediante conteo celular usando un hemocitómetro, obteniéndose las siguientes cifras:

GRUPO EXPERIMENTAL		GRUPO TESTIGO	
Rata	No. células/25 µl.	Rata	No. células/25 µl.
1	2,500	13	4,100
5	4,325	18	3,125
6	17,600	19	20,000
7	12,812	20	21,750

Rata	No. células/25 µl.	Rata	No. células/25 µl.
8	12,500	21	19,500
9	3,000	22	30,875
11	63,000		
12	36,812		
15	95,750		
16	94,500		

Utilizando la prueba de exclusión de la Nigrosina, nosotros calculamos un promedio de 80% de células viables en las células inyectadas en las ratas sanas, tanto del grupo testigo como experimental.

4.- Validación y Reproducibilidad del RIA empleado.

La gráfica 3 muestra la curva estándar representativa en el radioinmunoanálisis de Tiroxina utilizado. Como medida de la reproducibilidad del RIA, se calcularon los coeficientes de variación intra-intercorrelación para el suero estándar empleado en la curva. Cada suero estándar se cuantificó por cuadruplicado durante siete análisis. Utilizamos la prueba de la "t" de Student para obtener los intervalos de confiabilidad para el suero estándar dentro de la curva representativa ($p \leq 0.05$). Para la curva estándar representativa obtuvimos los siguientes resultados:

Suero estándar ($\mu\text{g T}_4/\text{dl}$)	% U/Uo	d.e. (%)	err.est. (%)	% c.v.	"t" x err.est. (%) ≤ 0.05
0.43	87.6	2.2	0.8	2.8	1.9
0.87	78.7	4.5	1.7	5.6	3.0
1.75	67.6	4.4	1.6	6.5	4.0
3.50	50.1	3.8	1.4	7.6	3.3
7.00	27.9	4.5	1.7	5.1	4.1

Los coeficientes de variación intra-interanálisis (% c.v.) obtenidos para cada suero estándar son válidos para garantizar un RIA altamente reproducible y confiable.

5.- Cuantificación de T_4 total en plasma por RIA.

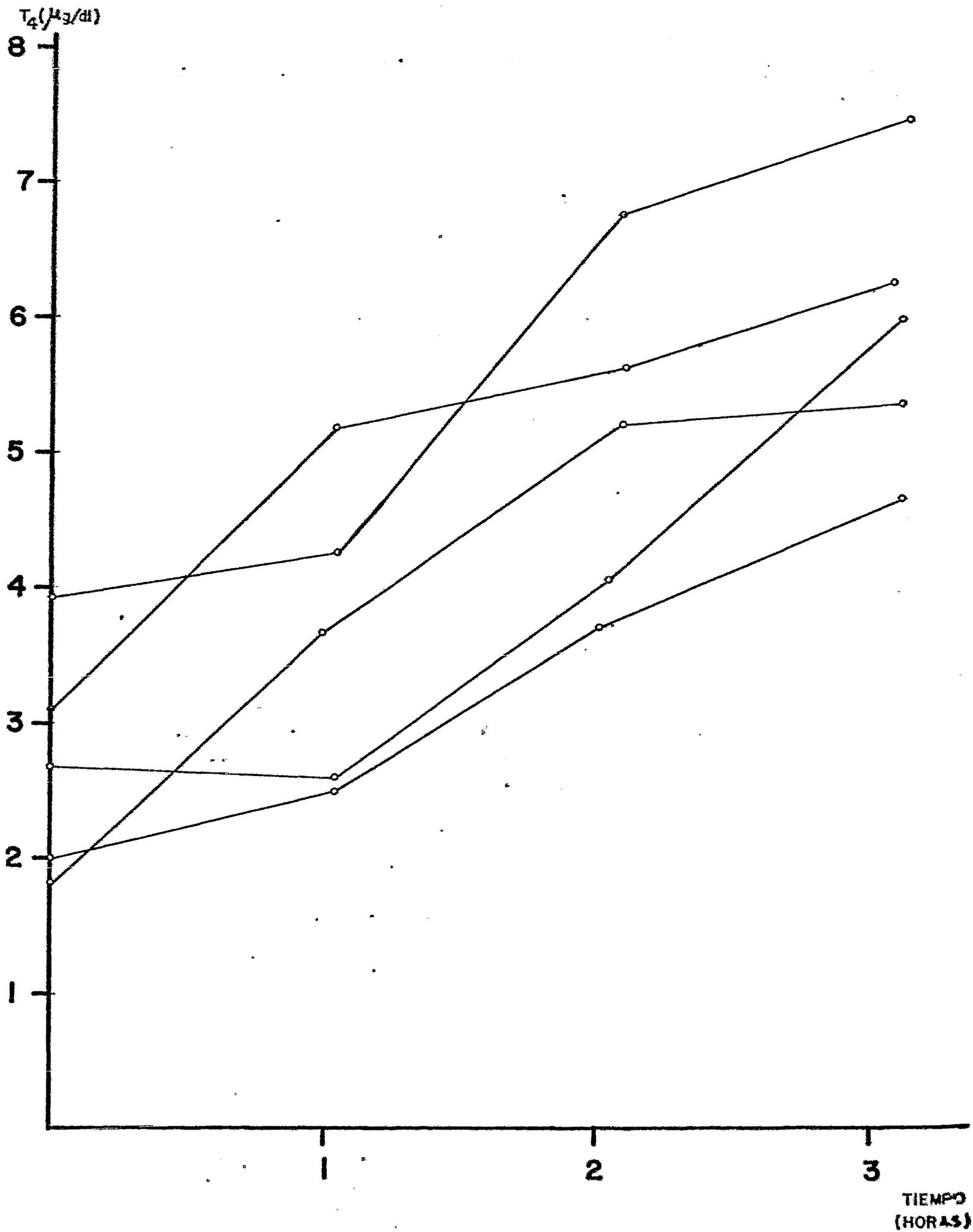
Grupos Testigo y Experimental.

Cada muestra de plasma, se analizó por cuádruplicado. Los % U/Uo obtenidos para cada muestra fueron interpolados en la curva estándar representativa (% U/Uo vs $\mu\text{g T}_4/\text{dl}$); se utilizaron las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y la de Tukey como análisis estadísticos, comparando en cada caso el valor basal inicial (semana cero) contra cada uno de los valores basales obtenidos en las semanas posteriores a la operación. Para los valores resultantes de la estimulación con HETb, se compararon estos contra su correspondiente valor basal.

GRAFICA 1

ESTIMULACION CON HET (333 mU/100g)

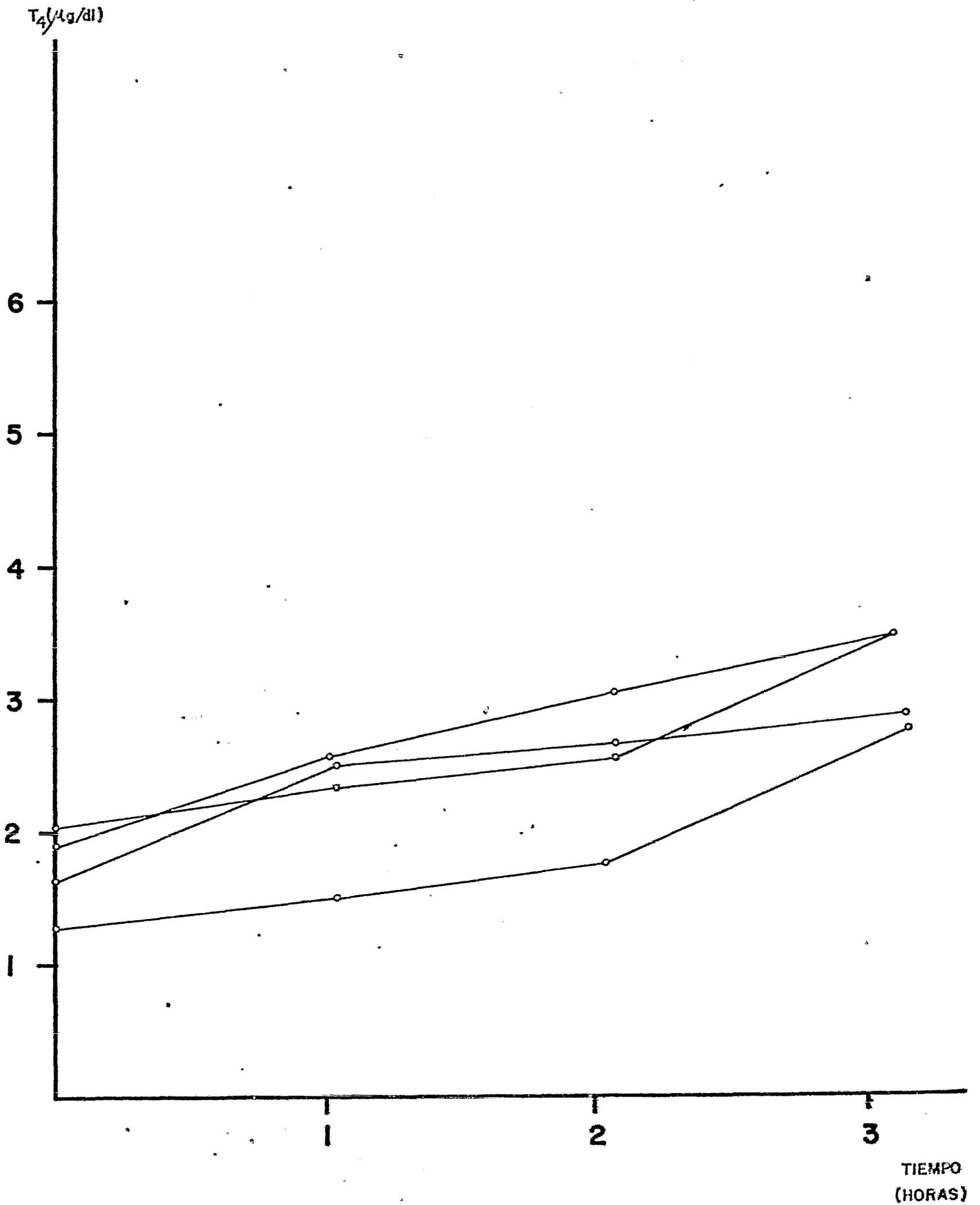
5 RATAS MACHO. 4 MESES.



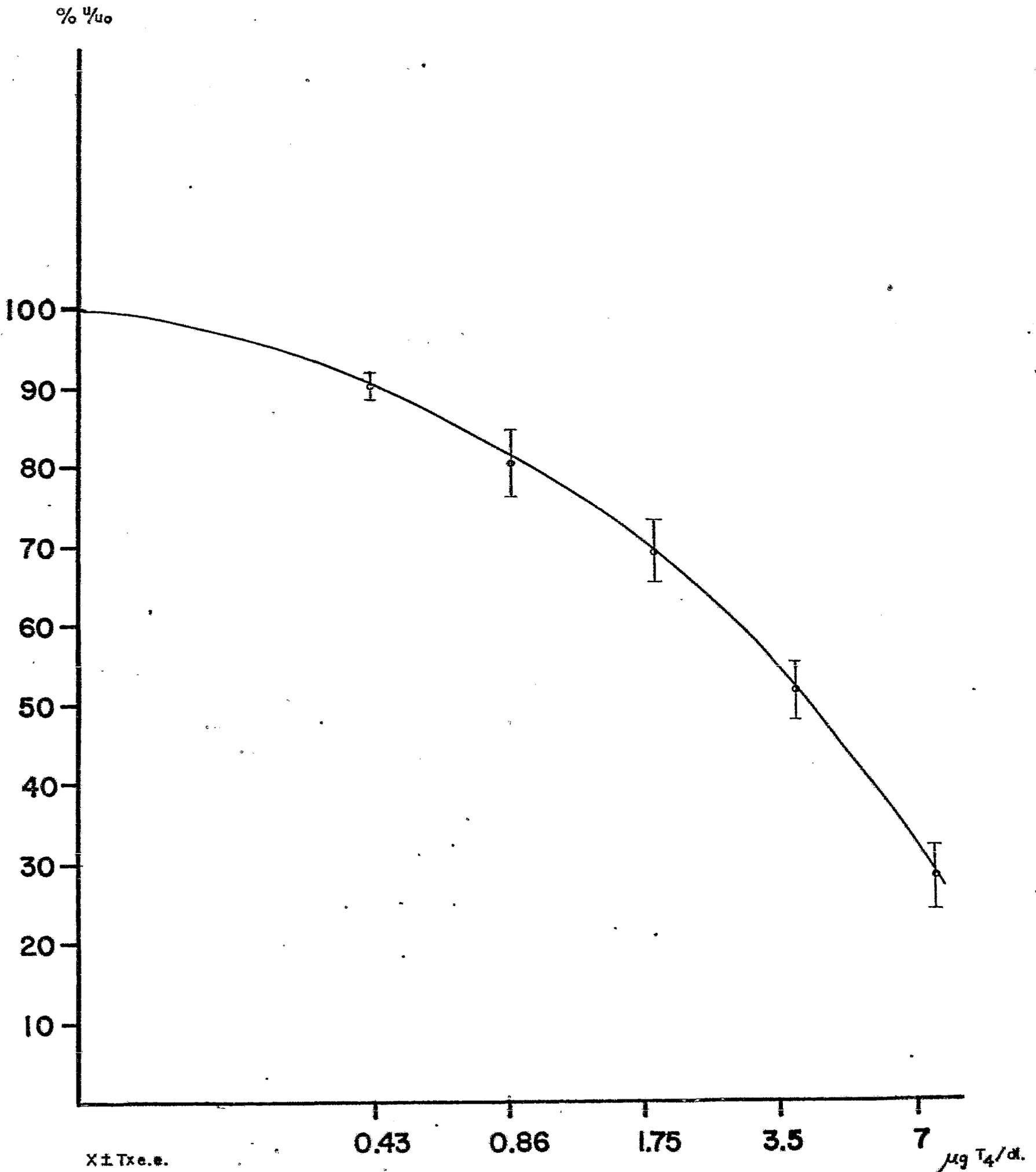
GRAFICA 2

ESTIMULACION CON HET (333 ml/100g)

4 RATAS MACHOS. 22 MESES



GRAFICA 3



CURVA ESTANDAR REPRESENTATIVA DEL RIA PARA TIROXINA
INTERVALOS DE CONFIANZA (CON LA PRUEBA DE "T" DE STUDENT) α 0.05

En estudios donde se cuenta con un número reducido de muestras y por lo tanto se manejan grados de libertad muy pequeños, la aplicación de pruebas estadísticas paramétricas, como la "t" de Student, aumenta mucho la posibilidad de cometer errores tipo 2. -

Nosotros empleamos dos pruebas no paramétricas, que son la prueba de ANOVA y la de Tukey. El objetivo del estudio de ANOVA, es comparar los promedios de dos o más poblaciones, $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_k$, para saber si son iguales entre sí, cuales lo son y cuales no lo son. -

Si al aplicar el ANOVA la hipótesis de igualdad de promedios poblacionales se rechaza, entonces se concluye que la igualdad de los -- promedios poblacionales no es cierta; queda por determinar cuales difieren entre sí y cuales no. Para la solución de este problema se -- realizó la prueba de Tukey, la cual consiste en investigar la magnitud relativa de cada diferencia entre promedios muestrales. Para decidir cuando una diferencia entre promedios muestrales es "grande" -- se calcula la "diferencia mínima significativa real" (DMSR), a partir de las denominadas tablas de valores studentizados que fueron cons-- truidas por Tukey. De manera que para que alguna diferencia entre -- promedios $\bar{X}_a - \bar{X}_b$, se pueda considerar como significativa, se re-- quiere que esa diferencia sea mayor que el valor de DMSR; en este ca-- so se considera que la hipótesis $\mu_a = \mu_b$ debe rechazarse (Cañedo, 1977).

La tabla 1, muestra los valores basales obtenidos en el grupo testigo. En todas las ratas estudiadas, excepto la #20 y 22, los niveles de T_4 encontrados al final del período experimental de cada una de ellas, se mantuvieron sin diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al valor basal inicial (semana cero) correspondiente a cada rata. En las ratas #20 y 22 las disminuciones encontradas son significativamente diferentes con respecto al valor inicial ($p \leq 0.05$). En la rata #19 encontramos una elevación en el valor correspondiente a la segunda semana, cuya diferencia con respecto a su valor inicial fue significativa ($p \leq 0.05$).

La última columna de la tabla 1 muestra los promedios (\bar{X}) de los valores de todas las ratas semana tras semana; ninguno de estos valores mostraron diferencias significativas con respecto al valor promedio de la semana cero.

La tabla 2, muestra los valores de T_4 en el grupo testigo, tres horas después de estimular a cada rata con HETb. Podemos apreciar que todas las ratas con excepción de la 13, respondieron a la estimulación con HETb, mostrando una elevación de concentración de T_4 con respecto al valor basal obtenido, correspondiente a esa rata en dicha semana ($p \leq 0.05$). Las ratas #13, 20 y 21, no respondieron inicialmente a la estimulación.

La columna \bar{X} de la tabla 2, muestra los promedios de los valores semana por semana; se observaron elevaciones significativas con respecto al valor promedio basal de la semana cero (tabla 1) sólo en la semana cero, 2 y 4.

La gráfica 4, muestra los promedios de los valores basales de T_4 (líneas continuas) y los valores después de la estimulación con HETb (líneas discontinuas) semana tras semana; estos valores corresponden al grupo testigo. Se graficó concentración de T_4 ($\mu\text{g}/\text{dl}$) en las ordenadas contra tiempo (semanas) en las abscisas. Observamos una tendencia a la disminución en el promedio de los valores basales de T_4 , mientras que la respuesta a la estimulación con HETb deja de ser significativa con respecto a su valor promedio basal, a partir de la sexta semana.

La tabla 3, muestra los valores basales obtenidos en el grupo experimental. Todas las ratas excepto la 12, muestran una elevación en la concentración de T_4 al final de su periodo experimental, con respecto a su valor basal inicial ($p \leq 0.05$). La rata #12 muestra elevaciones de concentración de T_4 en la segunda y tercera semana, los cuales no son significativamente diferentes a su valor basal inicial; el mismo fenómeno se presentó en la rata #6, sin embargo, los valores obtenidos en las semanas siguientes muestran elevaciones significativas ($p \leq 0.05$).

La columna de promedios (\bar{X}) de la tabla 3, muestra diferencias significativas en los promedios de todas las semanas - excepto en la tercera, con respecto al valor promedio de la semana cero.

En la tabla 4 se encuentran los valores de T_4 del grupo experimental, como resultado de la estimulación con HETb. - En este caso las ratas #8, 12 y 16, muestran al final de su periodo experimental un incremento de T_4 significativo ($p \leq 0.05$), con respecto al valor basal correspondiente a la misma rata en la tabla 3. La rata #15 mostró una ligera elevación que no es significativa, lo mismo que la encontrada en la #7 en su séptima semana. En las ratas #11 y 6 se observó un decremento de T_4 significativo en su última semana (semana 4 y 7 respectivamente). La rata #1, muestra a partir de la segunda semana incrementos y decrementos no significativos ($p > 0.05$).

La columna de promedios de la tabla 4, muestra que sólo los promedios de los valores basales de la semana cero y 2, comparados con los promedios de los valores de estimulación respectivos son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0.05$).

La gráfica 5, muestra los promedios de los valores basales de T_4 de cada semana (líneas continuas) y los promedios de los

valores de T_4 después de la estimulación con HETb (líneas discontinuas) del grupo experimental. Se graficó la concentración de T_4 vs tiempo. Observamos un incremento del valor promedio basal, - desde la segunda semana hasta la octava, y por otro lado se observa la ausencia de respuesta significativa a la estimulación con HETb, desde la cuarta semana en adelante.

6.- Estudio Histopatológico.

Al efectuar el estudio histopatológico, se encontró que en los testigos si hubo rechazo celular. En las figuras 1 y 2 se muestran algunos de los aspectos de la histología normal de la tiroides - en una rata joven; las figuras 3 y 4 muestran los mismos aspectos - en una rata senil. Las figuras 5 y 6 muestran algunos de los aspectos histológicos del rechazo. A partir de la segunda semana se localizan macrófagos en la zona donde se inyectó, que iniciaba la destrucción de la células transplantadas, así mismo se observó infiltrado linfocitario que aumentó en las semanas subsecuentes. De esta manera se formaron los nódulos de rechazo. Por otra parte, observamos una severa inflamación en la zona de la operación en cuatro de las seis ratas testigo; ésta apareció en el transcurso de la primera semana y desapareció aproximadamente quince días después.

En el grupo experimental constatamos la ausencia de -

TABLA I

GRUPO TESTIGO --- VALORES BASALES

RATAS	18	20	19	21	22	13	X
SEMANAS 0	2.8±0.1	2.4±0.4	1.3±0.1	2.6±0.2	2.5±0.6	2.06±0.1	2.3±0.5
2	2.6±0.1	1.7±0.3	2.7±0.5	2.0±0.3	1.1±0.2	2.5±0.4	2.1±0.4
3		1.3±0.04					1.3±0.04
4			1.6±0.4	1.9±0.2	1.4±0.4	2.4±0.2	1.8±0.4
5				1.7±0.1			1.7±0.1
6					1.1±0.2	1.7±0.2	1.4±0.3
7							
8						1.6±0.2	1.6±0.2

LAS CANTIDADES ESCRITAS SON LOS VALORES PROMEDIOS ± D.E. ($\mu\text{g T}_4/\text{dl}$)

LOS VALORES SON SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES DEL VALOR INICIAL EN SU RESPECTIVA FILA ($p < 0.05$).

LOS VALORES NO MUESTRAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.

GRUPO TESTIGO --- VALORES ESTIMULACION

RATAS	18	20	19	21	22	13	X
SEMANAS 0	3.2±0.2	1.5±0.3	5.7±0.6	2.2±0.2	4.9±0.3	1.8±0.2	3.2±1.7
2		2.6±0.2	5.0±0.3	2.8±0.2	2.8±0.6	3.1±0.2	3.3±0.9
3							
4			3.2±0.	3.6±0.2	3.2±0.1	1.5±0.2	2.9±0.8
5							
6					2.2±0.5	1.2±0.06	1.7±0.5
7							
8						1.3±0.2	1.3±0.2

LAS CANTIDADES ESCRITAS SON LOS VALORES PROMEDIO ± D.E. (194/11)
 LOS VALORES SON SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES DEL VALOR
 BASAL RESPECTO A LA TABLA 1 (p < 0.05).
 LOS VALORES NO SON SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES.

TABLA 3

GRUPO EXPERIMENTAL --- VALORES BASALES

RATAS 5 8 9 12 11 16 15 6 7 1 X

SEMANAS

0	3.4±0.2	2.7±0.2	2.1±0.02	2.07±0.2	1.4±0.1	1.3±0.1	2.0±0.2	2.1±0.2	2.6±0.3	1.1±0.1	2.1±0.7
2	4.4±0.2	3.9±0.2	3.1±0.2	2.4±0.4	1.7±0.02	2.2±0.2	2.5±0.4	2.3±0.1		6.9±0.2	3.2±0.9
3				2.09±0.1		1.7±0.1	2.4±0.1	1.9±0.2	3.4±0.1		2.3±0.6
4					2.2±0.3	2.7±0.3	2.5±0.2		3.4±0.1	3.9±0.5	3.0±0.6
5								3.8±0.3	3.2±0.01	3.2±0.6	3.4±0.4
6							3.1±0.2	4.2±0.6	3.4±0.1	3.1±0.2	3.4±0.4
7								5.2±0.3	3.1±0.04		4.2±1.1
8										4.4±0.4	4.4±0.4

LAS CANTIDADES ESCRITAS SON LOS VALORES PROMEDIO ± D.E. ($\mu\text{gTq/dl}$)
 LOS VALORES SON SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES DEL VALOR
 INICIAL EN SU RESPECTIVA FILA ($p < 0.05$).
 LOS VALORES NO SON SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES.

TABLA 4

GRUPO EXPERIMENTAL --- VALORES ESTIMULACION

RATAS **5** **8** **9** **12** **11** **16** **15** **6** **7** **1** **X**

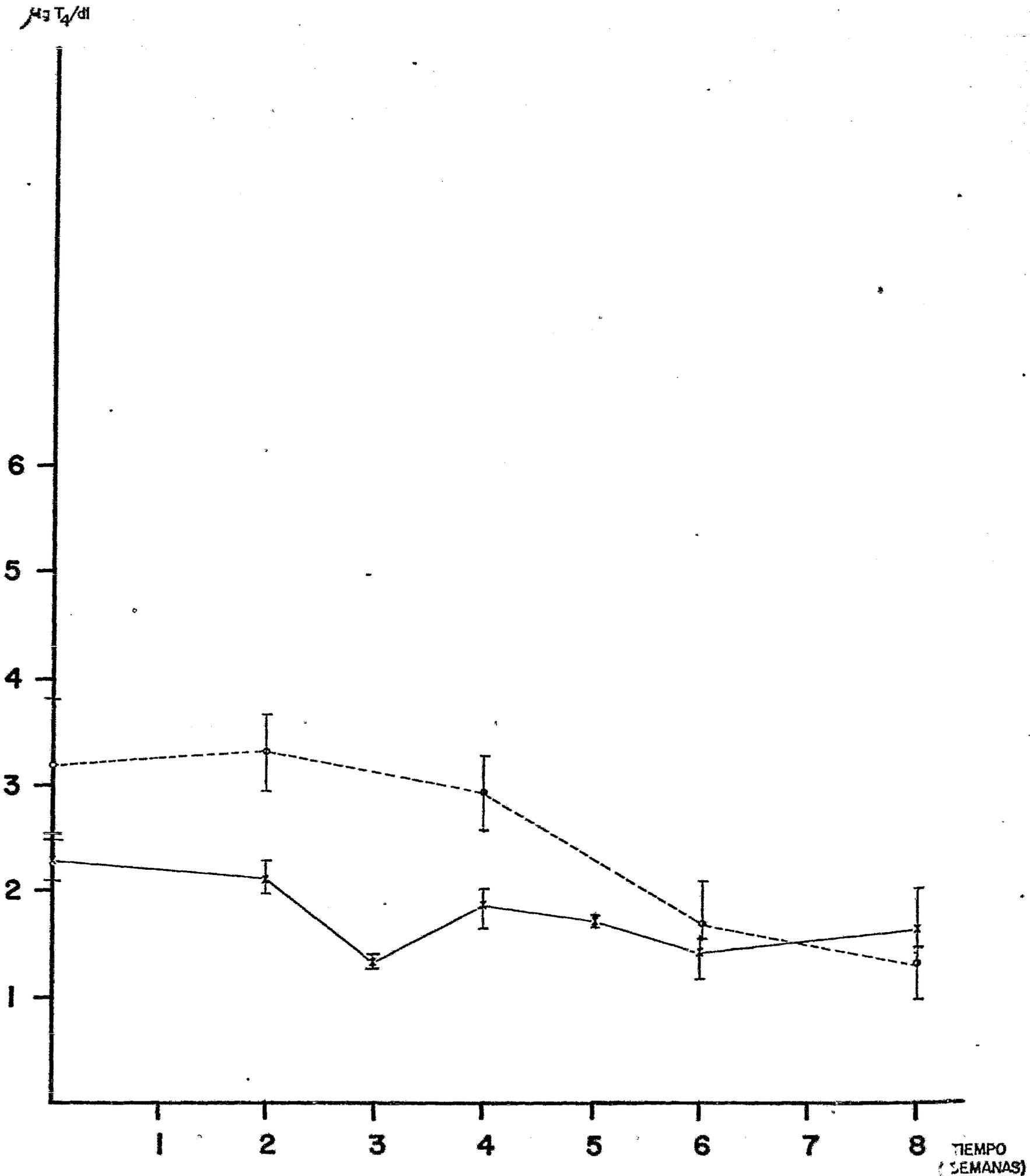
SEMANAS

0	47±0.5	47±0.1	39±0.2	3.6±0.3	1.8±0.1	2.4±0.2	3.8±0.2	4.2±0.2	27±0.05	4.1±0.4	3.6±0.9
2	5.5±0.4	4.3±0.2			1.5±0.1		3.6±0.3			2.9±0.2	3.6±0.1
3				3.5±0.1		2.4±0.1		2.9±0.4	3.6±0.01		3.1±0.5
4					1.8±0.1		3.0±0.4				2.4±0.6
5									3.6±0.2		3.6±0.2
6										3.4±0.01	3.4±0.01
7								2.5±0.1	3.3±0.1		2.9±0.4
8										4.3±0.3	4.3±0.3

LAS CANTIDADES ESCRITAS SON LOS VALORES PROMEDIO ± D.E. ($\mu\text{g T}_4/\text{dl}$)
 LOS VALORES SON SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES DEL VALOR
 BASAL RESPECTIVO EN LA TABLA 3 ($p < 0.05$).
 LOS VALORES NO SON SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES.

GRAFICA 4

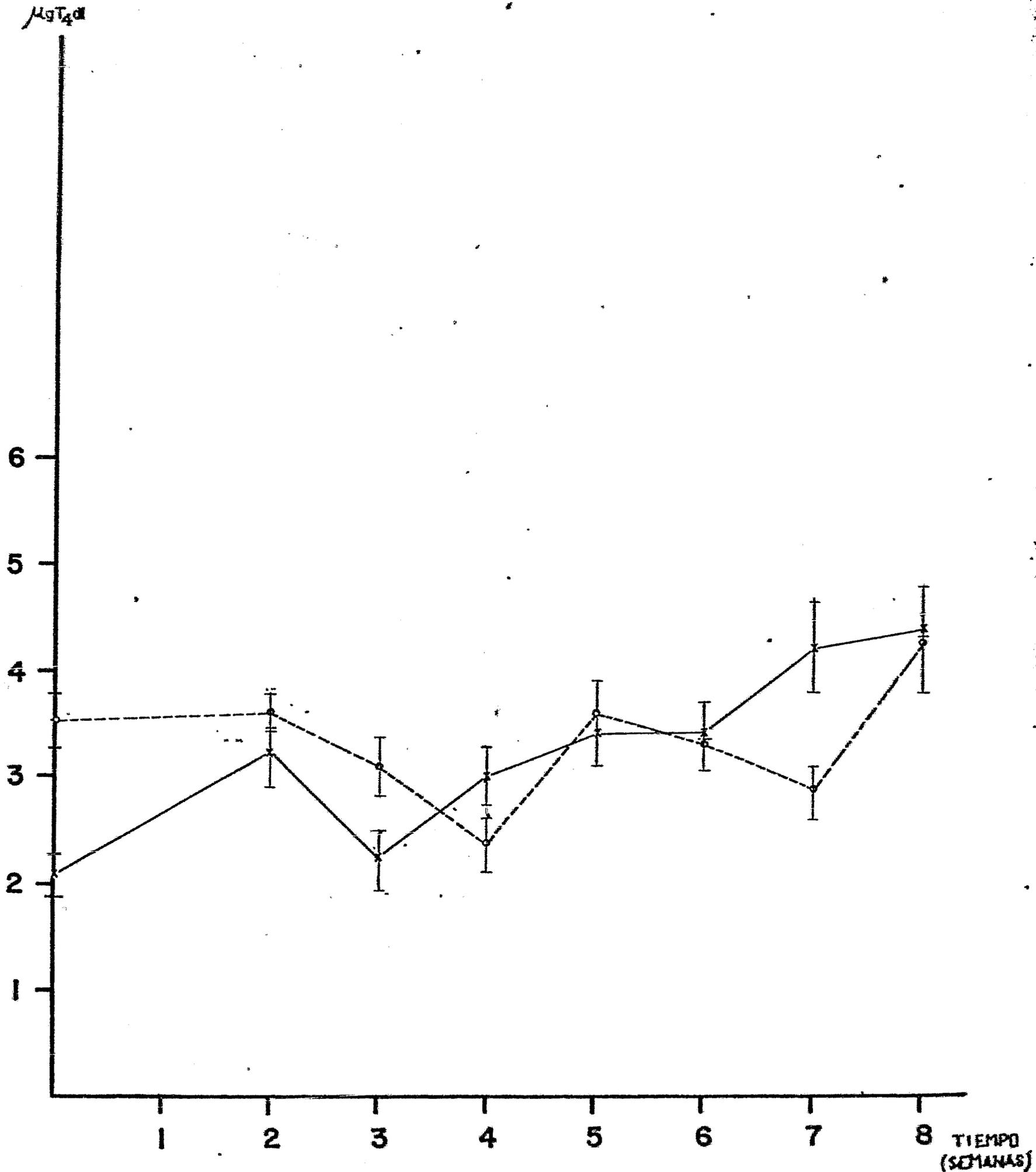
GRUPO TESTIGO
(CUANTIFICACION DE TIROXINA)



CADA PUNTO CORRESPONDE A X ± ERROR ESTANDAR
LA LINEA PUNTEADA CORRESPONDE AL VALOR DE TIROXINA DESPUES DE LA ESTIMULACION CON TET b.
LA LINEA CONTINUA CORRESPONDE AL VALOR DE TIROXINA EN ESTADO BASAL.

GRAFICA 5

GRUPO EXPERIMENTAL
(CUANTIFICACION DE TIROXINA)



CADA PUNTO CORRESPONDE A $\bar{x} \pm$ ERROR ESTANDAR.

LA LINEA PUNTEADA CORRESPONDE AL VALOR DE TIROXINA DESPUES DE LA ESTIMULACION CON HETA.
LA LINEA CONTINUA CORRESPONDE AL VALOR DE TIROXINA EN ESTADO BASAL.

nódulos de rechazo y observamos en los cortes histológicos, que las células inyectadas se fusionaron con las células tiroideas de la glándula receptora, como se muestran en las figuras 7 a 10, llegando al grado de producirse enormes sincitios, como se aprecia de forma muy clara en la figura 7, en la que los límites celulares han desaparecidos cediendo su lugar a grandes sincitios, en los cuales se puede apreciar núcleos con distintas afinidades tintoriales. Las células de los sincitios conservaron aspectos normales tanto en el núcleo como en el citoplasma.

El comportamiento clínico de las ratas experimentales fué completamente normal; con respecto a su actividad motora en la jaula, observamos un incremento notorio en comparación a las ratas testigo y ratas seniles normales.

7.- Mortalidad en ratas mayores de 18 meses.

Concomitantemente al desarrollo del experimento de fusión celular, se observó un lote de 30 ratas hembras seniles (18 meses), calculándose un 66% de mortalidad en 3 meses. Este resultado contrasta con el observado en el grupo de ratas experimentales y testigo, donde ninguna murió durante los mismos 3 meses por causas naturales.

ILUSTRACIONES

Fig.1 Fotomicrografía de corte de tiroides de rata joven. Técnica: Hematoxilina-Eosina. Observamos parte del tejido paratiroides (P) y del tiroideo (T); este último formado de numerosos folículos constituidos de un coloide (C), que está rodeado de células foliculares (F). Las zonas interfoliculares son escasas y de tamaño reducido (ZI). Campo claro 250 X.

Fig.2 Fotomicrografía de corte de tiroides de rata joven. Misma técnica que en 1. Se observan varios folículos tiroideos. La flecha (N) señala los núcleos de dos células foliculares y la letra C señala el coloide de un folículo. Campo claro 1562 X.

Fig.3 Fotomicrografía de corte de tiroides de rata vieja. Misma técnica que en 1. Observamos opaco el coloide de los folículos, así como también un incremento en el tamaño de las zonas interfoliculares. Campo claro 250 X.

Fig.4 Fotomicrografía de corte de tiroides de rata vieja. Misma técnica que en 1. En esta fotomicrografía se observan algunos folículos tiroideos en la parte superior. El incremento de tejido conectivo (C) y la destrucción de folículos (D) se pueden apreciar en la glándula senil. Campo claro 390 X.

Fig.5 Fotomicrografía de corte de tiroides de rata testigo, sin PEG. Misma técnica que en 1. Se observa en la zona de inyección (I) gran cantidad de infiltrado linfocitario (L), así como un gran nódulo de rechazo (R) con tejido necrótico en el interior. Campo claro 156 X.

Fig.6 Fotomicrografía de corte de tiroides de rata testigo, sin PEG. Misma técnica que en 1. Se observan gran cantidad de núcleos picnóticos (P) correspondientes a las células transplantadas, así como macrófagos (M) y células foliculares (F) propias del organismo. Campo claro 800 X.

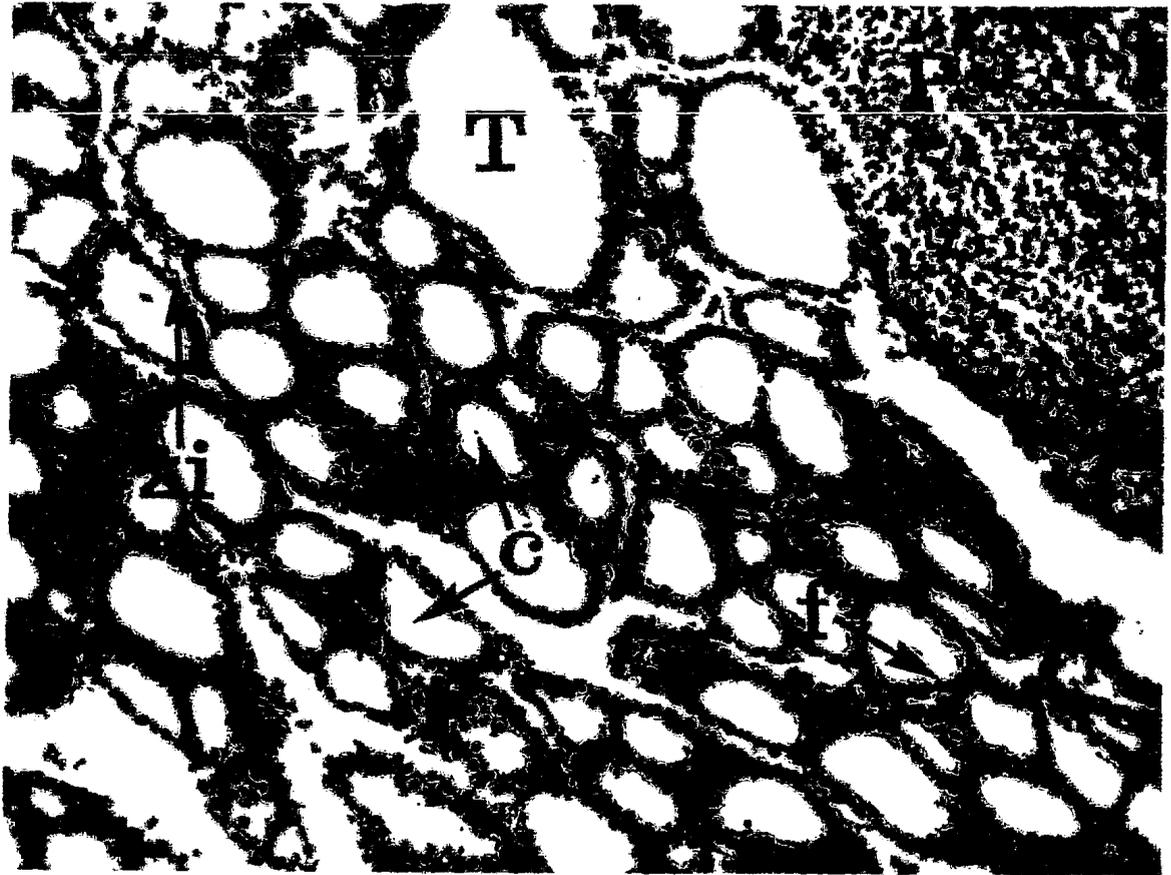
Fig.7 Fotomicrografía de corte de tiroides de rata experimental. Misma técnica que en 1. Podemos apreciar una gran zona interfolicular en donde las células se encuentran en algunas regiones sin límite aparente, formando sincitios (S). Núcleos bien conservados.

Campo claro 390 X.

Fig.8 Fotomicrografía de corte de tiroides de rata experimental. Misma técnica que en 1. Podemos observar la presencia de sincitios (S) con núcleos de tamaño variable y afinidad tintorial distinta - (T). Campo claro 625 X.

Fig.9 Fotomicrografía de corte de tiroides de rata experimental. Misma técnica que en 1. Columnas de células tiroideas fusionadas (F), con presencia de núcleos hipercromáticos. Campo claro 390 X.

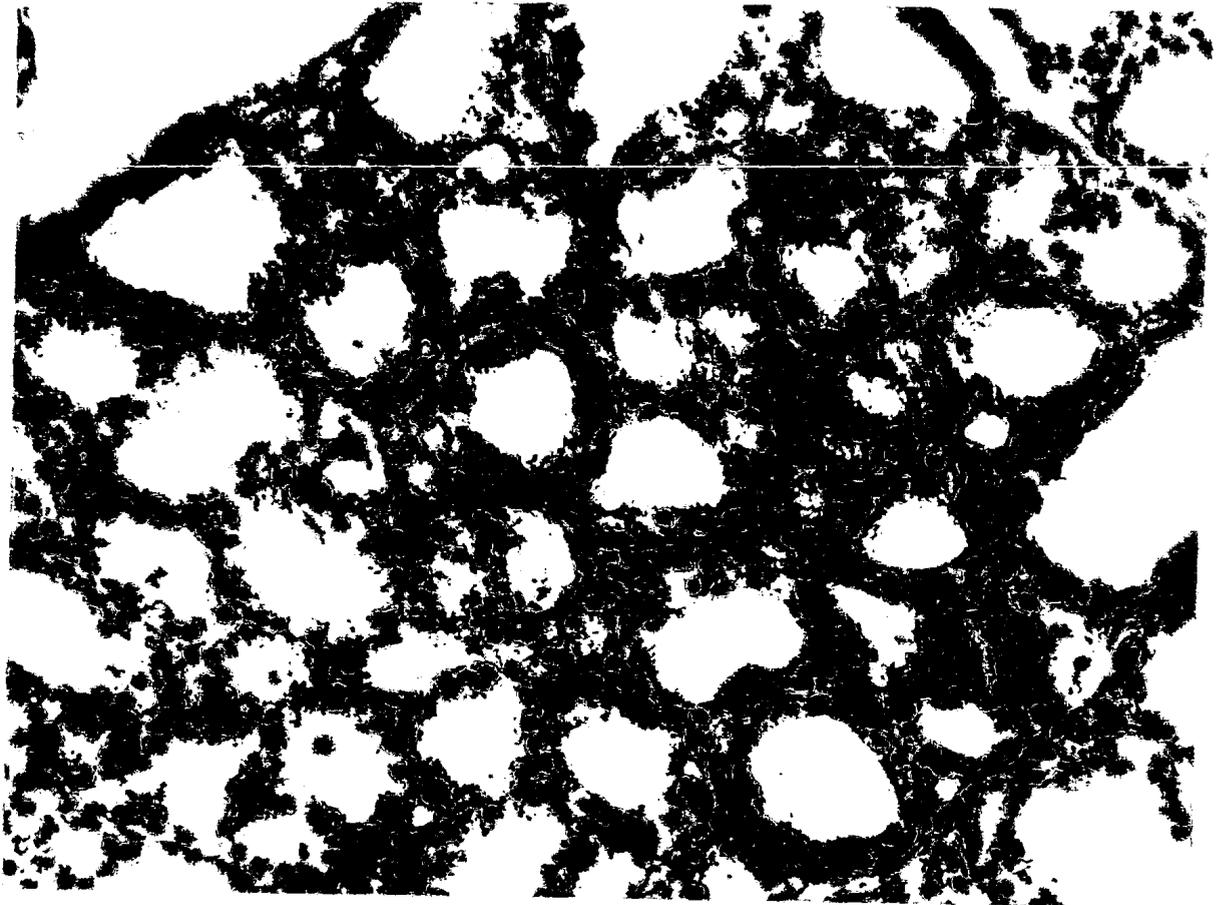
Fig.10 Fotomicrografía de corte de tiroides de rata experimental. Misma técnica que en 1. Corte sin límites celulares. En el interior del sincitio hay núcleos con distinta afinidad tintorial (T). Campo claro 1562 X.



①



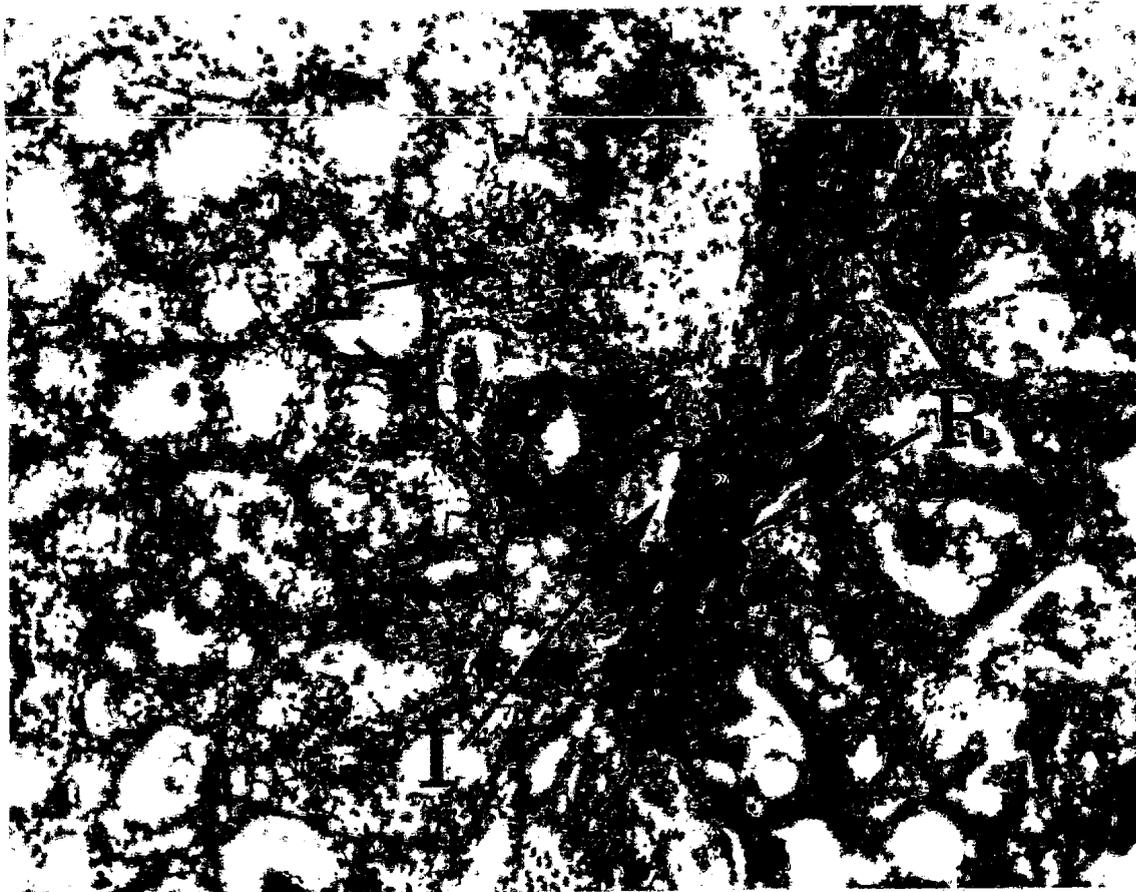
②



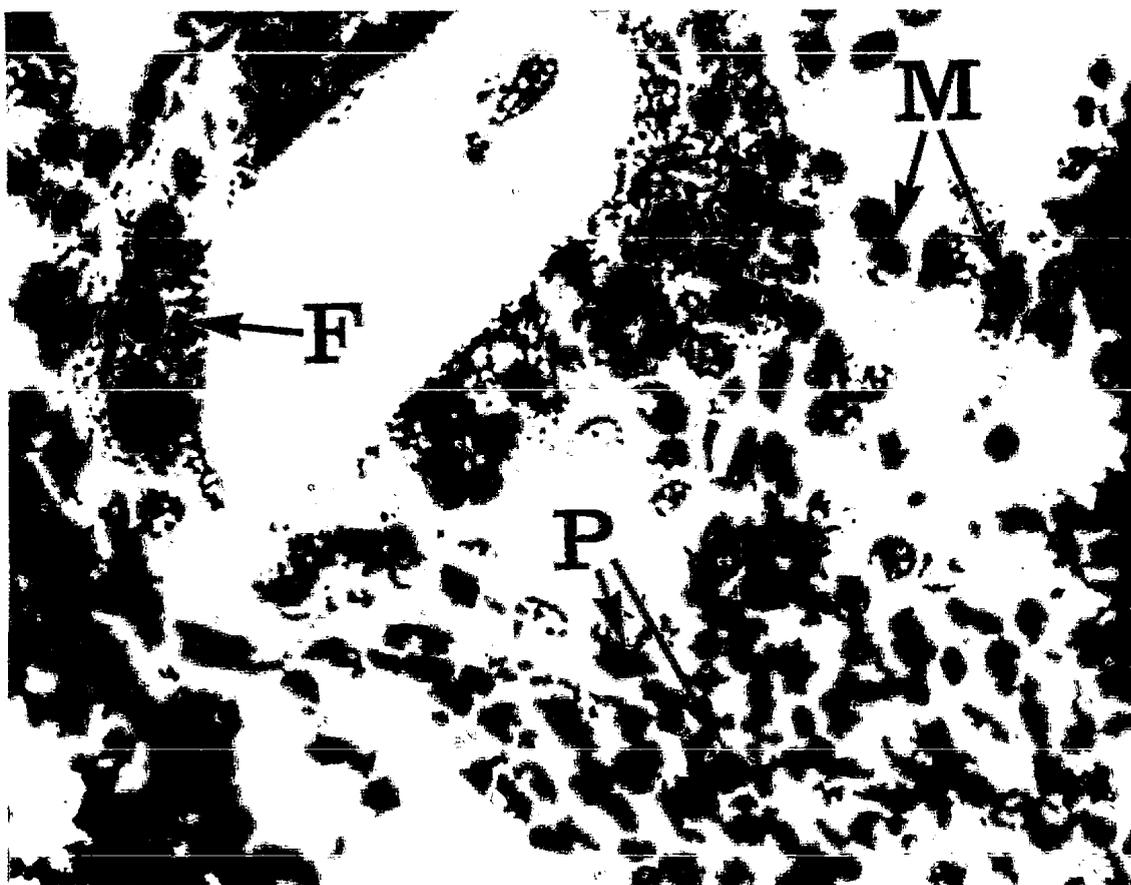
3



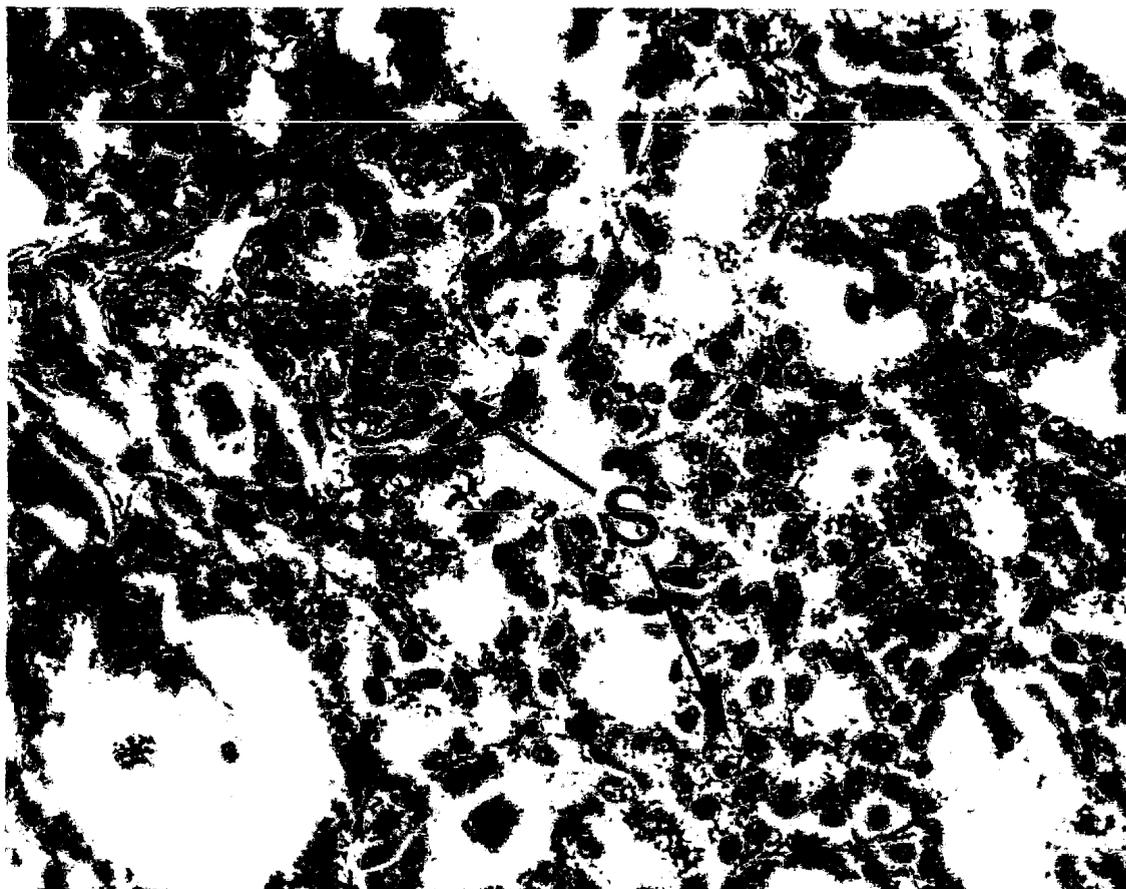
4



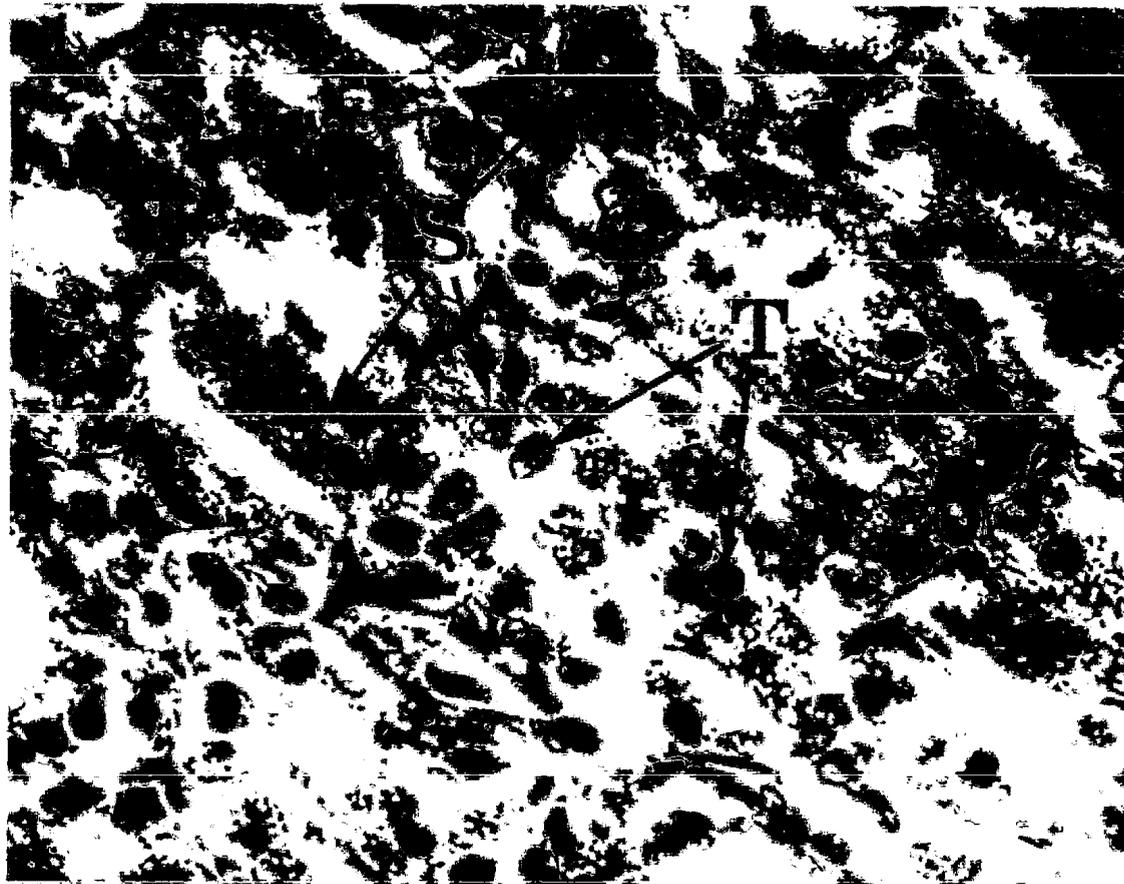
5



6



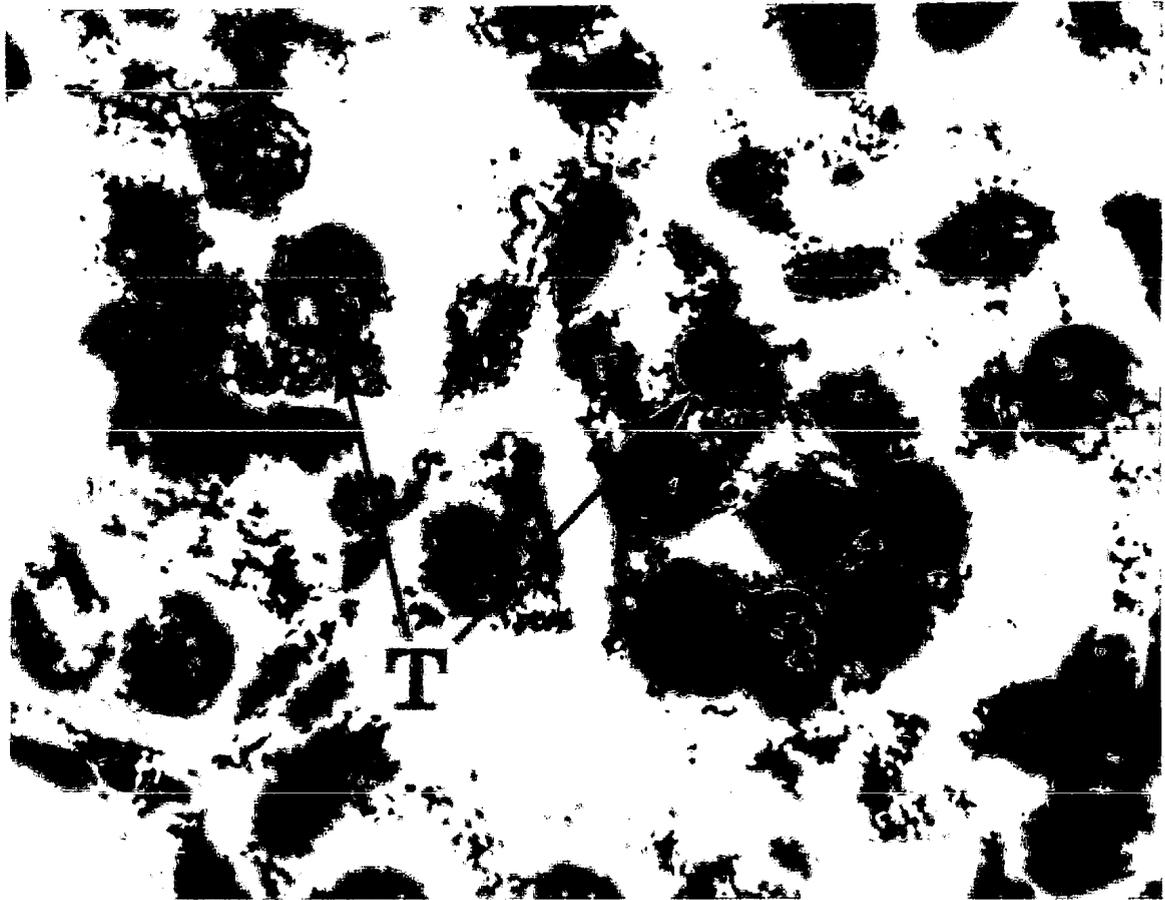
7



8



9



10

IV DISCUSION

Los resultados obtenidos del estudio histopatológico nos permiten corroborar los resultados obtenidos por González-Ramírez y col. (1982), en el sentido de que en la rata no se presenta el rechazo histopatológico que generalmente se observa al transplantar órganos completos, porciones de ellos o células aisladas de un animal a otro de la misma especie (Sell, 1981). Esta ausencia de rechazo se debe a la formación de homocariocitos tiroides, híbridos sinciciales, producidos por la acción fusionante del PEG.

El temor de que el híbrido produjese un mosaico antigénico en la membrana celular y que condujese a su destrucción desapareció completamente ya que a los dos meses de experimentación, las tiroides de las ratas tratadas con PEG nunca mostraron señales de ningún tipo de rechazo.

Las figuras 5 y 6 muestran como las células provenientes de otro organismo son rechazadas al no emplear ningún agente fusio nante. Consideramos a las células tiroideas, transplantadas como tejido extraño en el organismo receptor, lo cual provoca un estado de resistencia específica en el cuerpo del animal inyectado, relacionado con una reacción inmunológica y la posterior destrucción de las células extrañas, las cuales son fagocitadas por los

macrófagos. Ciertos componentes de las células extrañas son antígenicos al no estar presentes en el propio animal inyectado, lo cual despierta la respuesta del sistema inmunológico.

Los elementos que atacan y destruyen las células extrañas son los linfocitos, células blancas sanguíneas que emigran hacia la región de la inyección por vía sanguínea, linfática y dia
pédica.

Las figuras 7, 8, 9 y 10 nos muestran zonas sin límites celulares, pero los núcleos, nucléolos y citoplasmas están bien conservados y el hecho de que haya distintas afinidades tintoriales nos está señalando probablemente la diversidad de origen de los núcleos dentro de los sincitios formados por la fusión celular.

El mecanismo por el cual no se produce el rechazo histopatológico en un organismo con células híbridas es un fenómeno que no se ha estudiado todavía. Podríamos proponer algunas hipótesis sobre el hecho; probablemente las proteínas híbridas de la membrana celular producen un mosaico, provocándose una reduc
ción en el área de sitios receptores por lo cual al no ser alcanzados por los linfocitos, no hay un reconocimiento de las proteínas ajenas, evitándose el rechazo. También podríamos pensar que son vertidas a la circulación proteínas solubles ajenas al organis

mo, con la consecuente ausencia de estimulación al sistema inmunológico aunque el único criterio de verdad estará dado por la práctica de futuras investigaciones al respecto.

Los resultados de la cuantificación de T_4 en ambos grupos: testigo y experimental, los podemos atribuir al tratamiento dado en cada caso y son relacionables con los hallazgos histológicos encontrados en cada uno de los dos grupos.

Al analizar los resultados de la cuantificación de T_4 en el grupo testigo, podemos señalar que ninguna de las ratas que conforman dicho grupo, excepto las ratas #13 y 19, mostraron alguna elevación en la T_4 con respecto a su valor inicial (semana cero) durante el transcurso del experimento. Por lo demás, todas muestran una tendencia a la disminución en la concentración plasmática. Las ratas #13 y 19 lo muestran a partir de la segunda semana. Esta declinación en la producción de T_4 es explicable al relacionar estos resultados con los obtenidos en el estudio histopatológico. El proceso inmunológico del rechazo observado en los cortes histológicos de las tiroides testigo: macrófagos, infiltrado linfocitario, nódulos de rechazo y grandes zonas necróticas alteran la fisiología normal de la glándula, trayendo como consecuencia el estado decadente de la misma.

En las ratas #13 y 19 observamos un incremento de T_4 en la segunda semana posterior a la operación; esta elevación la podemos atribuir al injerto celular, ya que estas células transplantadas son jóvenes y en buen estado funcional, de la manera que producen hormonas tiroideas en mayor cantidad que las células seniles de la glándula, y esto ocasiona la elevación observada en estas ratas; sin embargo con el tiempo comenzaron a ser destruidas, encontrándose una disminución de T_4 en las semanas posteriores.

Los valores de T_4 obtenidos después de la estimulación con HETb, muestran que todas las ratas testigo, excepto la #13, responden a la estimulación, encontrándose una elevación en la T_4 , sin embargo la intensidad de la respuesta al estímulo fué disminuyendo semana con semana. Este hecho probablemente se ha debido al rechazo producido en las glándulas seniles.

La intensidad de la respuesta a la estimulación con HETb en las ratas experimentales, muestran un fenómeno semejante al presentado por las ratas testigo, siendo más aguda la disminución de la respuesta semana con semana. Hay que tomar en cuenta sin embargo, la elevación mostrada en los mismos períodos de tiempo en los valores basales de todas las ratas experimentales; esto es,

al alcanzarse cierto nivel basal de T_4 por arriba del valor encontrado al inicio del experimento, parecería que las ratas no responden a la estimulación. Por otra parte, podemos pensar que los nuevos valores basales alcanzados en estas ratas, son niveles fisiológicos óptimos para que el organismo senil pueda desarrollar su actividad metabólica sin problemas, los cuales podrían presentarse si los niveles de hormonas tiroideas se elevaran demasiado. Probablemente la "no respuesta" a la estimulación con HETb en un organismo senil, con homocariocitos formados en su tiroides, puede explicarse en la posible existencia de un mecanismo intratiroideo autorregulador, que evita incrementos excesivos de hormonas tiroideas en la sangre (Gafni, 1977). Nosotros pensamos que un incremento en el nivel sanguíneo de T_4 , como resultado de la estimulación con HETb acarrearía al animal senil problemas metabólicos.

El análisis de los resultados obtenidos de T_4 en el grupo experimental, nos muestran que todas las ratas elevaron sus niveles de tiroxina plasmática al final del período experimental correspondiente. La rata #12, a pesar de mostrar una elevación en la segunda y tercera semanas, no son significativamente diferentes con respecto a su valor inicial, según el estudio estadístico. Este mismo fenómeno lo presentó la rata #6 en las mismas semanas, sin

embargo su nivel basal de T_4 se incrementa en las semanas subse--
cuentes, por lo que podríamos pensar que en la rata 12 posiblemente
ocurriría la misma elevación en el caso de haber prolongado su --
periodo experimental. Nosotros atribuimos los incrementos en los
niveles basales de T_4 en las ratas experimentales, a los híbridos --
producidos por la fusión celular de las células tiroideas seniles con
las células jóvenes inyectadas, fenómeno cuya presencia demostra--
mos en los cortes histopatológicos.

Con el objeto de estudiar la relación que existe entre el --
número de células inyectadas y el efecto fisiológico producido, --
se inyectaron cantidades diferentes de células a cada rata experimenta
l y testigo. Las cantidades varían desde las 2,500 células inyecta
das en la rata 1, hasta las 95,750 células inyectadas en la rata --
15. Los incrementos de T_4 detectados en el estado basal de las --
ratas experimentales, nos indican que no se requiere inyectar una
gran cantidad de células para producirse un efecto fisiológico signi
ficativo. En las ratas testigo, la inyección de un número pe--
queño de células (3,000) también produce cambios significativos
como son el rechazo, la disminución en los valores basales de T_4
y el decremento en la respuesta a la estimulación con HETb. ---
Estos datos demuestran la eficiencia de nuestro método.

La posibilidad de encontrar en un organismo senil una producción baja o nula de HET en la hipófisis o de FLT en el hipotálamo, y que esto a su vez nos impidiera observar el efecto de la complementación genética al no existir una estimulación suficiente en la tiroides con híbridos, fué un problema que pensamos se resolvería inyectando HET b por vía intradérmica. Estudios en humanos parecen indicar que la hipófisis con la edad no sufre alteraciones en su capacidad para producir sus hormonas, sin embargo esto sigue en discusión. En la rata, lo mas indicado para demostrar lo anterior hubiera sido la cuantificación de HET por RIA, pero el hacerlo hubiera implicado muchos problemas, principalmente la alta tasa de mortalidad de ratas seniles, la dificultad para obtener nuevos lotes de las mismas, el tiempo y reactivos necesarios para el montaje y estandarización del RIA, por lo cual nos vimos obligados a no cuantificar la HET y a comenzar el experimento con la menor brevedad.

El objetivo de inyectar HETb fué el de proporcionar la hormona necesaria de forma exógena, para poder satisfacer la nueva potencialidad tiroidea después de la fusión celular, siempre y cuando existiera una baja funcionalidad de la hipófisis. Previamente al experimento, estimulamos a un lote de ratas jóvenes y otro de ratas seniles, encontrando a las tres horas después de la estimulación un incremento

de más de 3 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de T_4 plasmático en las ratas jóvenes y de menos de 1.5 en las seniles. Supusimos que este pequeño incremento de T_4 como respuesta a la estimulación de la HETb, debería aumentar en las ratas experimentales después de la operación, ya que la complementación genética producto de la formación de homocariocitos en la tiroides senil, elevaría el nivel basal de T_4 acercándose a los niveles basales presentados en ratas jóvenes, y por lo tanto el incremento inicial de 1.5 aumentaría en las semanas posteriores a la operación, pareciéndose cada vez más a lo mostrado por las ratas jóvenes estimuladas. Sin embargo, como ya mencionamos anteriormente, se observó el fenómeno contrario al propuesto. Tal parece que mientras el valor basal de T_4 de las ratas experimentales se incrementaba cada semana, por otro lado se producía el proceso inverso en la respuesta a la estimulación con HETb, hasta observarse una nula respuesta a la estimulación al final del periodo experimental de cada rata.

Podríamos pensar que niveles mayores a los alcanzados por las ratas experimentales, serían perjudiciales para un organismo viejo, en donde hay que tomar en cuenta que los demás órganos son seniles también. La respuesta nula a la estimulación probablemente se debe como ya mencionamos, a un mecanismo intratiroideo autoregula

dor, el cual evita altos niveles de hormonas tiroideas en la sangre, --
 lo cual es debido a una disminución en el número de receptores de --
 membrana para la HET en las células tiroideas, de tal manera que aun
 que exista una elevada cantidad de HET no se producirán mas hormo--
 nas tiroideas en un organismo que tenga niveles sanguíneos elevados
 de las mismas. Pensamos que los niveles de T_4 alcanzados no son per--
 judiciales, ya que el comportamiento clínico de las ratas experimen--
 tales fué normal durante todo el transcurso del experimento, pero --
 sin embargo probablemente se encuentran cerca del límite soportable
 para el organismo viejo, ya que no hay una respuesta a la estimula--
 ción con HETb.

Hay que señalar la gran dificultad que tuvimos para man--
 tener un lote de ratas viejas, ya que el índice de mortalidad es muy --
 alta a esa edad. Esta dificultad desapareció al dar el tratamiento de
 fusión celular a las ratas, ya que ninguna murió durante el experimen--
 to por causas naturales. Tres de las ratas experimentales y dos testi--
 gos no fueron sacrificadas, con el objeto de mantenerlas en observa--
 ción; las ratas experimentales nueve meses después de la operación
 y con una edad de tres años y diez meses, muestran un comportamien--
 to normal, semejante al de ratas adultas normales, mientras que una de
 las ratas testigo murió cinco meses después de la operación y la segun--
 da muestra un comportamiento de rata senil.

Los resultados de esta investigación nos permiten demostrar tanto la ausencia de rechazo histopatológico como la complementación genética en la tiroides de la rata, como consecuencia de la formación de híbridos in vivo dentro de la glándula senil.

La complementación genética podrá dotar de genes faltantes a aquellos organismos que congénitamente no los posean y que padezcan de enfermedades que en la mayoría de los casos suelen ser mortales. El procedimiento que utilizamos encierra la posibilidad de tratamiento para una gran cantidad de padecimientos, que como la hemofilia y la diabetes han constituido azotes fatales para la humanidad. -- La decadencia glandular y de otros tejidos en la vejez, encontrarán alivio al inyectarse las células adecuadas, las cuales donarán genomas sanos y jóvenes que podrán complementar a aquellos que ya se encuentran en decadencia.

Los primeros pasos están dados al demostrar en la rata la ausencia de rechazo y la complementación genética, por lo cual consideramos que la aplicación de éste método en el hombre es un hecho factible hoy en día, que intentaremos hacerlo una realidad.

APENDICE 1

1.- Solución Salina de Hanks (SSH):

NaCl _____	8.00 g.
KCl _____	0.40 g.
CaCl ₂ _____	0.14 g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O _____	0.10 g.
MgCl ₂ ·6H ₂ O _____	0.10 g.
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O _____	0.06 g.
KH ₂ PO ₄ _____	0.06 g.
Glucosa _____	1.00 g.
NaHCO ₃ _____	0.35 g.
Rojo fenol _____	0.02 g.

Ajustar el pH a 7.2, completar a un litro con agua destilada

y esterilizar por filtración con poro de 0.22 micras.

2.- Mezcla enzimática:

Tripsina _____	0.125 g.
Colagenasa _____	0.25 g.

Completar con SSH sin Calcio y Magnesio hasta 100 ml. Ajustar pH a 7.2 y esterilizar por filtración con poro de 0.45 micras.

3.- Solución de Polietilenglicol (50% p/v):

En un matr az de 25 ml. se colocan 5 g. de PEG (p.m. 6000), - se cubre el matr az con tapón de gasa y se esteriliza en autoclave a 121  C durante 15 min. a 15 lb. de presión. Posteriormente se agrega SSH estéril hasta un volumen de 10 ml. y se mezcla.

4.- Medio de Eagle:

Medio Basal de Eagle en Base de Hanks (10x)

(sin Carbonato de Sodio ni Glutamina)	100 ml.
NaHCO ₃	0.35 g.
Glutamina	0.292 g.
Suero fetal de ternera	110 ml.
Penicilina	0.88 ml.

Ajustar el pH a 7.2, completar a un litro con agua destilada y esterilizar por filtración con poro de 0.45 micras.

5.- Solución para la prueba de viabilidad:

Preparar una solución 0.05% de Nigrosina, utilizando SSH.

6.- Hormona Estimulante del Tiroides:

Thytropar (liofilizado)	10 U.I.
Solución Salina Estéril	2 ml.

Injectar por vía subcutánea 333 mU / 100 g. de peso.

7.- Determinación de Tiroxina plasmática (T₄) empleando RIA:

Reactivos:

Tris (hidroximetil) aminometano (Tris), R.A.

Sal disódica del ácido (Etilendinitrilo) tetracético (Na₂EDTA).

Tiroxina (sal sódica).

Acido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS).

HCl conc.

Carbón activado (norit-A).

Dextrán (p.m. 83,300), G.C.

Etanol absoluto, G.E.

Hidróxido de Amonio, R.A.

^{125}I -Tiroxina (a.e. 900-1000 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$).

Suero hipotiroideo de rata .

Suero inmune antitiroxina .

Suero estándar humano (T_4): 14 $\mu\text{g}/\text{dl}$.

Sueros estándares de rata : 7, 3.5, 1.7, 0.8, 0.4 $\mu\text{g}/\text{dl}$.

Solución amortiguadora de Tris-HCl 0.05 M., pH 8.6 .

Solución 0.6% Na_2EDTA , en amortiguador de Tris-HCl .

Solución de ^{125}I -Tiroxina (aproximadamente de 40 a 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$)
en Tris-HCl .

Suspensión de Dextrán-Carbón activado, 0.5% y 0.5% respec-
tivamente, en amortiguador de Tris-HCl .

Procedimiento:

a) Preparación de muestras:

Tomar por punción venosa o arterial 1 ml. de sangre y obtener el plasma o el suero . Guardar a 4 °C .

b) Preparación de sueros estándares:

Tomar 150 μl del suero estándar humano de 14 $\mu\text{g}/\text{dl}$ y añadir 150 μl de suero hipotiroideo de rata (SHR); de esta manera se

obtiene una concentración de $7 \mu\text{g}$ de T_4/dl . Tomar $150 \mu\text{l}$ de este nuevo suero y añadir $150 \mu\text{l}$ de SHR para obtener un suero de concentración de $3.5 \mu\text{g}/\text{dl}$. Seguir con este proceso hasta obtener los sueros de concentración 1.7 , 0.8 y $0.4 \mu\text{g}/\text{dl}$. Se conservan a -20°C .

c) Preparación de la solución de ^{125}I -Tiroxina:

Conociendo la actividad específica y la concentración del isótopo radiactivo, se toma un volumen determinado de éste, añorándolo con amortiguador Tris-HCl para obtener una concentración de $40-60 \text{ pg}/0.1 \text{ ml}$ del isótopo.

Al momento de usarse se le adicionan 30 mg de ANS por cada 10 ml de la solución del radioisótopo. El ANS actúa como agente bloqueador de las proteínas séricas con afinidad por T_4 .

d) Realización del Radioinmunoanálisis:

Llevar todas las muestras y soluciones estándares a temperatura ambiente, así como también los siguientes reactivos: solución de trabajo de Tris-HCl, solución de ^{125}I -Tiroxina-ANS, solución de suero inmune antitiroxina a la disolución apropiada (1:300), sueros estándares de rata.

Una vez realizado esto, se colocan los estándares y las muestras por cuadruplicado en tubos de $12 \times 75 \text{ mm}$, numerados --

y adicionar los reactivos con pipetas Oxford o micropipeta automática, de acuerdo a la siguiente tabla:

TUBO	1-4	5-8	9-12	13-16	17-20	21-24	25-28	29-32
ESTANDAR	—	---	10 μ l (0.4)	10 μ l (0.8)	10 μ l (1.7)	10 μ l (3.5)	10 μ l (7.0)	---
SHR	10 μ l	10 μ l	---	---	---	---	---	---
PROBLEMA	---	---	---	---	---	---	---	10 μ l
Anti T ₄	---	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
TRIS-HCl	400 μ l	300 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
¹²⁵ I-T ₄ -ANS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l

Los tubos 1 a 4 representan la unión no específica (UNE) del ¹²⁵I-Tiroxina.

Los tubos 4 a 8 representan la unión máxima del isótopo en ausencia de T₄ no marcada (unión cero masa).

La adición del suero hipotiroideo a los tubos de UNE, unión cero masa y estándares, se realiza para mantener las condiciones del análisis constantes, tanto en la curva como en los problemas.

Una vez adicionados los reactivos, se agitan los tubos en el vortex de 2 a 3 seg. y se dejan incubando toda la noche a 4 °C.

e) Separación de las fracciones unida (U) y libre (L):

Llevada a cabo la reacción inmunológica se separan las fracciones U y L mediante la adsorción de la fracción L con una

una mezcla de Dextrán-Carbón activado (D-CA).

Se añade a todos los tubos 1 ml. de la mezcla D-CA, agitando los posteriormente en el vórtex por 2-3 seg. Luego se reposan 20 min. a 4 °C.

Centrifugar a 2500 rpm. durante 30 min. Se decanta el sobrenadante (fracción U) de cada uno de los tubos, dejando escurrir el precipitado (fracción L). Posteriormente se colocan los tubos en el contador de centelleo, ajustándolo al voltaje de máxima eficiencia de detección para ^{125}I , colocando primero primero el sobrenadante (U) y después el precipitado (L) de cada uno de los tubos iniciales. El tiempo de conteo se selecciona de tal manera que se obtengan por lo menos 10,000 cuentas por minuto en el tiempo es cogido.

f) Cálculos:

Primero se calcula el porcentaje de unión no específica de ^{125}I -Tiroxina (UNE) que posteriormente será descontado del porcentaje de unión de los tubos de unión cero masa, curva estándar y muestras.

$$\frac{\text{cpm en U (sobrenadante)}}{\text{cpm en U + cpm en L (precipitado)}} = \% \text{ UNE}$$

Para el porcentaje de unión de la curva estándar y problemas, se realiza el cálculo de radiactividad unida, como un por-

centaje de la total (unida / total):

$$\% U/T = \frac{\text{cpm U}}{\text{cpm U} + \text{cpm L}} - \% \text{UNE}$$

o

$$\% U/T = \frac{\text{cpm U} - \text{cpm UNE (sobrenadante)}}{(\text{cpm U} + \text{cpm L}) - \text{cpm UNE (sobrenadante)}}$$

g) Graficado

Una vez obtenidos los porcentajes de unión para la curva estándar y problemas, estos se grafican en papel semilog., colocando en las ordenadas el porcentaje de unión y en las abscisas la concentración de los controles ($\mu\text{g T}_4/\text{dl}$). El resultado se informa como microgramos de Tiroxina en 100 ml. de suero.

V RESUMEN

El propósito de este trabajo, fué el de observar en ratas seniles, que tipos de manifestaciones histopatológicas y modificaciones en los niveles de concentración de Tiroxina plasmática, se expresan al formarse en la tiroides senil, homocariocitos in vivo - de células seniles y células tiroideas jóvenes.

Se dispuso de dos grupos de ratas viejas (Wistar Inbred, WI de 18-24 meses): Grupo testigo (n=6), y Grupo experimental (n=10). Las células tiroideas por fusionar fueron obtenidas por tiroidectomía de ratas jóvenes (WI, 3 meses), sometiendo las glándulas a digestión enzimática con tripsina y colagenasa. El digerido - fué centrifugado y el paquete celular se trató con Polietilenglicol (PEG, p.m. 6000), como agente fusionante. Se inyectó un volumen de 12.5 μ l de células tratadas en cada lóbulo tiroideo, en las ratas del grupo experimental. El grupo testigo fué inyectado con células no tratadas con PEG. Los dos grupos se mantuvieron en experimentación durante dos meses, efectuándose las determinaciones periódicas de T_4 (empleando RIA), en estado basal y posterior a su estimulación con Hormona Estimulante del Tiroides (HET). Semanalmente, a partir de la segunda semana posterior a la operación y hasta la octava, se realizó la tiroidectomía total de una rata de cada grupo para su estudio histopatológico.

Nosotros obtuvimos los siguientes resultados: La concentración de T_4 plasmática durante el período experimental, mostró en el grupo experimental elevaciones significativamente diferentes con respecto al valor obtenido antes de la operación ($p=0.05$, efectuando las pruebas de análisis de varianza y de Tukey). En el grupo testigo no hubo aumento significativo de T_4 . Los hallazgos histopatológicos en el grupo testigo, mostraron nódulos de rechazo e infiltración linfocitaria, contrastando con lo encontrado en el grupo experimental, en donde no se observaron los fenómenos anteriores, y sí la presencia de sincicios atribuibles a la fusión celular. Estos resultados nos permiten demostrar la ausencia de rechazo inmunológico y la complementación genética in vivo, como producto de la formación de híbridos mediante la fusión celular de células genéticamente deficientes y células genéticamente normales. Esto implica la posible restauración de una función biológica disminuida o ausente, y su aplicación al hombre proporcionaría curación a muchas enfermedades que en la mayor parte de los casos son mortales, como son la diabetes, la enfermedad de Tay-Sachs, la de Sandhoff, inmunodeficiencias, la hemofilia, etc.

VI BIBLIOGRAFIA

- 1.- AHKONG, Q.F., et al., Studies on chemically-induced cell fusion. *J. Cell Sci.*, 10: 769-787, 1972.
- 2.- BARSKI, G., Cell association and somatic cell hybridization. -- Acad. Press. N.Y., 1970.
- 3.- BARSKI, G., BLANCHARD, M.G., YOUNG, J.K and LEON, B., Expression of malignancy in interspecies Chinese hamster x mouse cell hybrids. *J. Natl., Cancer Inst.*, 51: 781-792, 1973.
- 4.- BELTRAN, M., NIETO, L., CUELAS, L., RUIZ, E. y VALVERDE R., C., Cuantificación directa de tiroxina sérica total por RIA. *Rev. Invest. Clín. (Méx)* 26: 125-131, 1974.
- 5.- BRUMBAUGH, J.A. and SCHALL, D.G., Restoration of pigment synthesis in mutant melanocytes after fusion with chick embryo -- erythrocytes. *J. Cell Biol. Abstracts. The first internal. Cong. - on Cell Biol. Boston, Mass. number 667*, 1976.
- 6.- CAÑEDO, L., GARCIA, H. y MENDEZ, I., Principios de investigación clínica. México: Los autores, 1977.
- 7.- CARLSSON, S.A., LUGER, O., RINGERTZ, N.R. and SAVAGE, R.E., Phenotypic expression in chick erythrocyte x rat myoblast hybrids and in chick myoblast x rat myoblast hybrids. *Exp. Cell Res.* 84:47-55, 1974.
- 8.- CROCE et al., Induction of homokaryons, heterokaryons and hybrids formation by lysolecithin. *Exp. Cell Res.*, 67: 427-435, 1971.
- 9.- CHOPRA, I.J., A RIA for measurement of thyroxina in unextracted serum. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 34: 938-947, 1972.
- 10.- DAVIDSON, R.L., et al., Regulation of melanin synthesis in mammalian cell as studied by somatic hybridization. *Exp. Cell Res.* 55: 426-430, 1969.
- 11.- DAVIDSON, R.L., et al., Improved techniques for mammalian cell hybridization by polyethylenglycol. *Somatic cell Genetics*,

- 2: 165-176, 1976.
- 12.- DAVIDSON, R.L. and GERALD, P.S., Induction of mammalian somatic cell hybridization by polyethylenglycol. David M. Prescott, in: Methods in cell Biology. Acad. Press. N.Y., 18: 325-338, 1977.
 - 13.- DE GROOT, M.D., LESLIE, J., Current views on formation of thyroid hormones. The New England Journal of Medicine, 272: 243-362, 1965.
 - 14.- DE WEERD-KASTELEIN, E.A., KLEIJER, W.J., SLUYTER, M. L. and KEIJZER, W., Repair replication in heterokaryons derived from different repair-deficient Xeroderma pigmentosum strains. Mutant. Res., 19: 237-243, 1973.
 - 15.- DIACUMAKUS, E.G., and TATUM, E.L., Fusion of mammalian somatic cells by microsurgery. Proc. Nat. Acad. Sci., 69: 2959-2962, 1972.
 - 16.- EAGLE, H., Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science, 122: 501-503, 1955.
 - 17.- FELBER, J.P., RIA in the clinical chemistry laboratory. Advances in Clinical Chemistry, 130-180, 1977.
 - 18.- FISHER, D. and DUSSAULT, J., Development of the mammalian thyroid gland. In: Handbook of Physiology, American Physiological Society, Washington, D.C., 19: 21-38, 1974.
 - 19.- GANONG, F.W., La glándula Tiroides. Fisiología Médica, El manual Moderno, Sn. Fco. Cal., 18: 273-289, 1974.
 - 20.- GANBORG, O.L. and BOTTINO, P.J., Protoplast in genetic modifications of plants advances in Biochem. Engin. 19: 239-260, 1981.
 - 21.- GARCIA-SANCHEZ, A., Fusión de células animales y su posible aplicación a problemas de deficiencia genética, utilizando la sustancia química Polietilanglicol. Tesis de Licenciatura para Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Autónoma de Puebla, 1980.
 - 22.- GHARIB, C., JAMA 227, No. 3, 1974.

- 23.- GONZALES-RAMIREZ, J., NUÑEZ, A., GUERRERO-PADILLA, E. y MARTINEZ, T., Ausencia de rechazo histopatológico. Formación de homocariocitos hepáticos producidos con Polietilenglicol. Boletín del Instituto de Investigaciones Biomédicas, México (En prensa).
- 24.- GREGERMAN, R.I., GAFNEY, G.W., SHOCK, N.W., Thyroxine turnover in euthyroid man with special reference to changes with age. J. Clin. Invest., 41: 2065-2070, 1962.
- 25.- GUERRERO-PADILLA, E., Fusión celular de ovocito de coneja y célula somática de riñón del mismo animal, utilizando Myxovirus Sendai inactivados. U.N.A.M. Facultad de Ciencias, Méx., - 1976.
- 26.- GUERRERO-PADILLA, E., Efecto de la mezcla Polietilenglicol-Dimetilsulfóxido sobre células HeLa. Anales del V Congreso Nacional de Farmacología, Puebla, Pue., México, Agosto 1981.
- 27.- GURDON, S., Cell fusion and some subcellular properties of heterokaryons and hybrids. J. Cell Biol., 67: 257-280, 1975.
- 28.- GURDON, S. and COHN, Z., Macrophage-melanocyte heterokaryons. I. Preparation and properties. J. Exper. Med. 131: --- 981-1003, 1970.
- 29.- HAM, A.W., Sistema Endócrino, Glándula Tiroides. Tratado de Histología, Interamericana S.A. de C.V., México. Cap.25: 749-761, 1975.
- 30.- HARRIS, H., The expression of genetic information. A study with hybrid animal cells. Edited by Wolsnholma and Julieknigh. Reprinted from Ciba fundation Symposium on Control Processes in -- Multicellular Organism, Published by A. Churchill Ltd. 104 Gloucester Place, London. pp 52-58, 1970.
- 31.- HARRIS, H., Nucleus and cytoplasm, 1968 Oxford. Clarendon - Press.
- 32.- HERMAN, J., RUSCHE, H.J., KROLL, H.J., HILGER, P., -- KRUSKEMPER, H.L., Free T₃ and T₄ serum levels in old age. --

- Horm. Metab. Res. 6: 233, 1974.
- 33.- HOPWOOD, D.A., WRIGHT, H.M., BIBB, M. and COHEN, S.N., Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. *Nature* 268: 171-174, July 1977.
- 34.- HUNTER, *Brit. Med. Bull.* 30: 18, 1974.
- 35.- JANG, M. and DISTEFANO, J.? Production of triiodotyrosine - from thyroxine is increased with aging in rats. 64th ann. Met. Endocrine Society, pp. 108 (Poster 116), 1982.
- 36.- KEIGHTLEY, R.G., LAWTON, A.R., WU, L.Y.F. and COOPER, M.D., Correction of combined immunodeficiency by liver transplantation in a patient with adenosine deaminase deficiency. In: Combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency. A molecular defect, 1975.
- 37.- KIEFFER, J.D., MOYER, H., FEDERICO, P. and MALOOF, F., Pituitary-Thyroid Axis in neonatal and adult rats: comparison of the sexes. *Endo.* 98: 295-303, 1976.
- 38.- KRUSE, P., Tissue culture methods and applications. Acad. Press. - Inc., N.Y., 1973.
- 39.- LIPSON, A., NOCOLOFF, E., HSU, T.H., KASECAMP, W.R., DREW, H.M., SHAKIR, R., WAGNER Jr., H.N., A study of age dependent changes in thyroid function test in adults. *J. Nucl. Med.* 20: 1124, 1979.
- 40.- MANUAL PARA EL USO DE PRUEBAS DE DIAGNOSTICO DE LA -- FUNCION TIROIDEA. X Congreso Internacional de Química Clínica, Instituto Nacional de la Nutrición, Méx., D.F., Febrero-Marzo, 1978.
- 41.- NISHIKAWA, M., INADA, M., NAITO, K., ISHII, H., TANKA, K., MASHIO, Y. and IMURA, H., Age related changes of serum - 3,3'-diiodothyronine, 3',5'-diiodothyronine and 3,5-diiodothyronine concentration in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52: 517-522, 1981.
- 42.- OKADA, Y., Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells III-Relationship between cell condition and fusion reaction of cell degeneration reaction. - *Exp. Cell Res.*, 26: 119-128, 1962.

- 43.- PONTECORVO, G., Production of indefinitely multiplying mammalian somatic cell hybrids by polyethylenglycol (PEG) treatment. *Somatic Cell Genet.*, 1: 397-400, 1975.
- 44.- POOLE, A.R., HOWELL, J.I., LUCY, J.A., Lysolecithin and cell fusion, *Nature* 227, August 22, 1970
- 45.- RAO, P.N. and JOHNSON, R.T., Cell fusion and application - to studies on the regulation of the cycle. David M. Prescott, In: *Methods in Cell Biology*. Vol. 5; Acad. Press. N.Y. Cap. III: - 76-122, 1972.
- 46.- RINGERTZ, N.R. and SAVAGE, R.E., Mechanisms of cell fusion. Acad. Press., *Cell Hybrids*, N.Y., Cap. V: 46-63, 1976.
- 47.- RINGERTZ, N.R. and SAVAGE, R.E., Analysis of malignancy - by cell hybridization. Acad. Press., N.Y., Cap. XIV: 245-270, 1976.
- 48.- RODBARD, D., Statistical Quality Control and Routine Data Processing for Radioimmunoassay and Immunoradiometric Assay. *Clin. Chem.* 20: 1255-1270, 1974.
- 49.- STEPLEWSKI, Z. and KOPROWSKI, H., Somatic cell fusion and hybridization. In: *Methods in cancer research*, Acad. Press., 5: 155-191, 1970.
- 50.- STUDER, H., FORSTER, R., CONTI, A., KHOLER, H., HAE--BERLI, A. and ENGLER, H., Transformation of normal follicles - into thyrotropin-refractory "cold" follicles in the aging mouse - thyroid gland. *Endo.* 102: 1576-1584, 1978.
- 51.- SUTHERLAND, D., HONG, C. and NAJARIAN, J., Cellular - transplantation for enzymatic and metabolic deficiencies, In: *Enzyme Therapy in Genetic Disease: 2*, Alan R. Liss and Robert Des--nick, vol. XVI: 207-218, 1980.
- 52.- WATKIN, J.F. and GRACE, D.M., Studies on the surface anti--gens of interspecific mammalian cell heterokaryons. *J. Cell Sci.*, 2: 193-204, 1967.
- 53.- WEISS, M.S. and GREEN, H., Human-mouse hybrids lines con-

taining partial complement of human chromosomes and functioning human genes. *Genetics*, 58: 1104-1111, 1967.

- 54.- WEISS, M.S., Reexpression of liver specific enzymes in hepatomes cell hybrids. In: *Somatic cell hybridization*, edited by Richard L. Davidson and Félix de la Cruz. Raven Press., N.Y., 1974.
- 55.- WESTGREN, V., BURGER, A., IGEMANSSON, S., MELANDER, A., TIBBLIN, S., WHALIN, E., Blood levels of 3,5,3'-triiodo--thyronine and thyroxine: differences between children, adults and elderly subjects. *Acta. Med. Scand.*, 200: 493, 1976.
- 56.- ZIMMERMAN, V., SCHEURICH, P., PIWAT, G.Z. and BENZ, R., Cells with manipulated functions: New perspectives for cell biology, Medicine and Technology. *Angewandte Chemie*, 20: 325-344, No. 4, April 1981.