

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



FUSION CELULAR DE OVOCITO DE CONEJA Y CELULA
SOMATICA DE RIÑON DEL MISMO ANIMAL,
UTILIZANDO MYXOVIRUS SENDAI INACTIVADOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
BIOLOGO
PRESENTAN
MARIA GENOVEVA GONZALEZ MORAN
ERNESTO GUERRERO PADILLA

MEXICO, D. F.

1976



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.

A MIS PADRES.

A quienes debo la meta lograda,
con eterno cariño.

A MIS HERMANOS: Tomás y Miguel.

que siempre me han ayudado,
con el mayor afecto.

A TODOS MIS TIOS Y PRIMOS.

GENOVEVA.

A la memoria de mi abuelita

MAMACUCA

Para la compañera de mi vida

OLI

ERNESTO

No debo olvidar mi origen
para ayudar a todos mis -
semejantes.

Agradecemos al Dr. Jorge González Ramírez sus enseñanzas, ayuda y dirección en la elaboración de este trabajo. Así como a la Dra. Angelina Núñez G., por la orientación y — conocimientos que siempre estuvo dispuesta a dar.

También queremos agradecer al Dr. Jesús Manuel León Cázares y a la M. en C. Judith Márquez G., por las sugerencias para mejorar el trabajo escrito. Así mismo a todos los — compañeros que de alguna manera cooperaron para la elaboración de este trabajo.

FUSION CELULAR DE OVOCITO DE CONEJA Y CELULA SOMATICA
DE RIÑON DEL MISMO ANIMAL, UTILIZANDO MYXOVIRUS SENDAI
INACTIVADOS.

I N D I C E.

RESUMEN. - - - - -	1
INTRODUCCION. - - - - -	3
1.- FUSION CELULAR. - - - - -	3
Métodos para producir la fusión celular. - - - - -	3
a) Fusión celular por medio de virus. - - - - -	4
b) Fusión celular por inducción química. - - - - -	5
c) Fusión celular por microcirugía. - - - - -	7
Acción del virus en la fusión celular. - - - - -	7
Naturaleza del factor de fusión celular. - - - - -	8
Mecanismo de la fusión celular. - - - - -	9
Importancia de la fusión celular. - - - - -	13
Reactivación de los núcleos. - - - - -	10
Aplicación de la fusión celular a problemas de embriología de mamíferos. - - - - -	11
Enucleación. - - - - -	12
2.- METODOS: - - - - -	15
a) Cultivo de tejidos de riñón. - - - - -	15
b) Obtención y limpieza de ovocitos. - - - - -	17
c) Irradiación y dilución del virus Sendai. - - - - -	17
d) Fusión de células de riñón y ovocitos. - - - - -	18
3.- RESULTADOS. - - - - -	23
4.- DISCUSION. - - - - -	27
5.- REFERENCIAS. - - - - -	32

RESUMEN.

El propósito de este trabajo fué el de fusionar el núcleo de una célula somática de conejo con un ovocito de coneja, mediante virus Sendai inactivados previamente por irradiación ultravioleta. Gracias al estímulo que representó la introducción del núcleo de la célula somática se logró la división celular del ovocito.

Una vez extirpados los ovarios de coneja, se extrajeron los folículos y de éstos los ovocitos, que inmediatamente fueron remojados en una solución de pronasa, para poder eliminar la zona pelúcida, ayudados por microagujas adecuadas para el tamaño del ovocito, que es aproximadamente de 140 μ .

Se realizó un cultivo de tejidos de riñón de conejo para tener las células de este órgano como donadoras de núcleos. Para poder fusionar las células somáticas con los ovocitos, se utilizaron virus HVJ (Sendai) inactivados.

Una vez puestos en contacto el ovocito y la célula somática en la solución viral se observó lo siguiente: Durante las primeras veinticuatro horas hay fusión de la célula somática con el ovocito; a las cuarenta y ocho y setenta y dos horas se presentan dos divisiones mitóticas sucesivas.

Este huevo, resultante de la fusión del ovocito con una célula somática, tiene toda la información genética

necesaria para poder desarrollarse en un organismo completo, --
si se trasladara a las trompas uterinas de una coneja preñada.

Este experimento implica el control genético total del --
producto y abre un campo de estudio ilimitado.

INTRODUCCION.

1.- FUSION CELULAR.

La fusión celular es el proceso de formación de células híbridas: homocarióticas o heterocarióticas. O sea, células híbridas con núcleo y citoplasmas de un mismo tipo o células híbridas con núcleo y citoplasmas de diferentes especies - - (Watson, 1974).

La fusión celular citoplásmica es fundamental para la - formación de estos policariontes y representa un paso esencial en la fusión celular e hibridación (Barski, 1970). La fusión celular y la formación de células polinucleadas es un fenómeno poco frecuente en condiciones normales. Las células polinucleadas aparecen frecuentemente en condiciones patológicas - (Steplewski et al. 1970), las cuales fueron primeramente descritas en observaciones de tumores y más tarde en lesiones in inflamatorias, tal vez causadas por virus (Harris, 1970; Scheeneberger y Harris, 1966).

Gracias a los métodos de cultivo de tejidos, introducidos por Harrison (Harris, 1970), se hicieron numerosas observaciones de fusión celular en cultivo de tejidos en animales.

Métodos para producir la fusión celular.

Existen tres métodos para fusionar células somáticas:

- a) Por inducción de la actividad con virus inactivados.
 - b) Por compuestos químicos como la lisolecitina.
 - c) Por microcirugía.
-
- a) Fusión celular por medio de virus.

Es enigmático como los virus de diferentes familias son capaces de inducir la fusión celular y, consecuentemente, la formación de policariontes. Los policariontes han sido descritos en tumores inducidos por el virus del sarcoma de Roux, virus del polioma, el SV40. Los virus que inducen policariontes sin daño celular aparente pertenecen a los grupos de los Herpesvirus, Poxvirus, Myxovirus y Paramyxovirus.

La fusión de dos diferentes tipos de células en presencia del virus Sendai da como resultado la formación de heterocariocitos. Este hecho fué primeramente comunicado por Okada y Harris en 1970 (Steplewski, 1970).

En 1962 Okada y, mas tarde, Murayama en 1975, demostraron que la radiación ultravioleta reduce o suprime la multiplicación del virus Sendai en las células sobre las cuales son adsorbidos, pero no suprime su acción fusionante (Watkins, 1971). Con la incorporación de los marcadores timidina y uridina tritadas, los mismos autores han demostrado que la síntesis de ADN y ARN no es afectada en los núcleos de las células fusionadas por el virus inactivado.

Se han obtenido resultados similares utilizando virus de

Herpes simplex, inactivados por radiación ultravioleta, fusionándose células humanas KB suspendidas con células de Cricetus cricetus (Hamster) BHK21. Se formaron los heterocariotes humanos-hamster en los cuales la incorporación de timidina -tritiada continúa después de la fusión. Se obtuvieron policariotes artificiales mediante la fusión con myxovirus, inactivado por radiación ultravioleta utilizándose en particular cepas de virus Sendai, exhaustivamente estudiadas por Harris, y por - - Watkins y su grupo (Barski, 1970; Rao et al. 1972).

b) Fusión celular por inducción química.

Por su bien conocida acción hemolítica, la lisolecitina ha sido reportada como una sustancia que induce la fagocitosis e incrementa la permeabilidad de las membranas celulares y causa prelisis esférica en los eritrocitos. La lisolecitina ha sido usada en varios procedimientos de fusión de las membranas in vitro. Los tratamientos con lisolecitina de estos sistemas de membranas dan lugar a elongaciones de formas irregulares - - (Ahkong et al., 1972; Rao et al. 1972). La lisolecitina puede inducir la fusión de células in vitro formando homo y heterocariotes (Gledhill, 1972). La fusión celular, por lo tanto, va acompañada de una degradación de las células tratadas, sin daños extensos en las membranas de las mismas.

La posibilidad de que la lisolecitina y otras sustancias químicas puedan ser usadas para la formación de células híbridas, en vez de usar virus, es de considerable interés; este método químico ofrecería particularmente varias ventajas aparen-

tes como ahorrar el tiempo empleado en cultivar los virus y hallar la concentración adecuada del factor de fusión que se necesita para cada tipo de virus, además de evitar la búsqueda de un lugar de almacenaje adecuado. La lisolecitina ha sido usada también en la formación de híbridos entre dos células mutantes, una de ellas con deficiencias enzimáticas. La concentración de la solución de lisolecitina y el pH en que se lleva a cabo la fusión es de gran importancia para la formación afortunada de células híbridas. Croce et al. (1971), observó que el número de colonias de células híbridas, después del tratamiento con virus Sendai, fue dos veces más grande que las tratadas con lisolecitina. Puede ser que, en contraste con los virus Sendai, la lisolecitina a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. (Croce et al. 1971), sea excesivamente citotóxica reduciendo el total del número de células útiles para la fusión celular. Por lo tanto, es importante determinar la citotoxicidad de la lisolecitina para cada tipo celular usado en experimentos de hibridización (Croce et al. 1971; Koprowski et al. 1973).

La eficiencia en la formación de homocariotes depende del origen de la línea celular y de la técnica de inducción de la fusión: lisolecitina o virus Sendai. Aparte de la lisolecitina han sido encontrados otros compuestos químicos que producen fusión celular en diferentes grados: Retinol, ácido oleico, ácido linolénico, ácido láurico, ácido glicocerosol monoláurico, monooleato de glicerol y alcohol selachylico (Eter α -oleil-glicérfico). Observándose que el más efectivo es el mono-oleato de glicerol y también menos dañino que la lisolecitina (Lucy et al. 1971; Diacumakos et al. 1972).

c) Fusión celular por microcirugía.

Los híbridos de células somáticas de mamíferos pueden ser formados por el camino más directo y preciso de la fusión celular: la microcirugía (Gordon, 1975; Dicumakos et al. 1972). Inicialmente Dicumakos y col. (1972) fusionaron células de una misma población, aunque también es posible fusionar células de dos diferentes poblaciones o especies. La fusión de células por microcirugía puede realizarse en cualquier etapa del ciclo celular. Se observa que el mayor índice de fusión se lleva a cabo cuando las células se encuentran en telofase.

Acción del virus en la fusión.

Los mecanismos de la inducción por virus de la fusión celular han sido estudiados por Barski, (1970). El primer paso parece ser una adsorción masiva del virus sobre las superficies celulares. Los procesos de fusión principian por la formación de puentes citoplásmicos entre las células, los cuales se alargan rápidamente, permitiendo fluir libremente el citoplasma de célula a célula. Schneeberger y Harris (1966) fallaron en sus intentos de detectar partículas virales en el sitio donde los puentes citoplásmicos son formados. Admitiendo que los virus pueden actuar por inducción de algunos cambios generales en la célula, especialmente en su membrana.

En 1968, Hosaka y Koshi, (Barski, 1970), informaron que después de transferir a 37°C las células del tumor ascítico de -

Ehrlich con virus Sendai, previamente adsorbidos en el frío; la alteración local de membranas en células vecinas y la formación de puentes citoplásmicos entre ellas, es directamente inducida por el contacto del virus con las membranas celulares. Kohn en 1965, (Barski, 1970) intenta identificar los componentes del virus de la enfermedad del Newcastle, responsables de la fusión celular. En algunos tratamientos se observó, que solamente -- agentes que hidrolizan lípidos en la envoltura viral, suprimen la facultad del virus Newcastle para provocar la fusión celular y la formación de sincicios.

Los avances rápidos en el desarrollo de las técnicas de -- fusión celular fueron posibles a través del uso de los virus -- (Steplewski, 1970). Cuando algunas células son mezcladas en -- presencia de virus Sendai, sus membranas se unen, el citoplasma llega a mezclarse y se forman células multinucleadas homo y heterocariontes por fusión celular (Gordon, 1975; Scheid y Choppin, 1973). Los receptores para los virus se encuentran distribuí-- dos ampliamente en las membranas celulares (Steplewski, 1970; -- Gordon, 1975).

Naturaleza del factor de fusión.

El factor de fusión producido por el virus de la enfermedad de Newcastle y el virus Sendai, consiste como en otros para myxovirus de una envoltura lipoproteica. La superficie del virus presenta proyecciones de mucopolisacáridos hemaglutinantes-- así como neuraminidasa activa, que en los virus es probable que que se encuentra entre las proyecciones.

La actividad de la fusión celular parece estar asociada con la presencia de una glicoproteína⁺ con peso molecular de 53,000 formada por una molécula precursora grande (f_0) por división proteolítica; la facultad de fusionar células también puede depender de la presencia de otros componentes de la envoltura viral. El grado de fusión es posible promoverlo por contacto celular, en suspensión o sobre una superficie, y variando la proporción de cada tipo celular (Gordon, 1975; Scheid et al. 1973; Steplewski, 1970). La susceptibilidad de células diferentes para fusionarse, varía por la presencia en la membrana plasmática de la célula, de zonas de distinta composición química (Haywood, 1973).

La actividad de la fusión no está asociada con la infectividad, porque los virus retienen su facultad de fusión después de inactivarlos; la integridad de los fosfolípidos de la membrana viral parece estar unida con la facultad del virus para causar la fusión celular, ya que los tratamientos con lipasas fosfolipasas y detergentes destruyen el factor de fusión (Steplewski, 1970).

Mecanismo de la fusión

El posible papel de los componentes específicos virales en la fusión celular ya han sido mencionados. La hemaglutinina y neuraminidasa viral pueden contribuir a un funcionamiento adicional para promover el contacto celular y modificar la membrana plasmática (Gordon, 1975). Pueden distinguirse varios pasos en el proceso de la fusión celular, basados en la fusión

⁺ Denominada glicoproteína (F).

de células del tumor ascítico de Ehrlich:

- a) Aglutinación de las células por el virus en el frío.
Todos los pasos subsecuentes se realizan a 37°C.
- b) Se establece el contacto de membranas celulares adyacentes de las células aglutinadas, cercanas a los virus adsorbidos.
- c) Alteración de las membranas celulares que están en contacto con el virus, de células adyacentes.
- d) Conexión de las membranas celulares rotas, de células adyacentes y formación de puentes citoplásmicos.
- e) Alargamiento de los puentes citoplásmicos y englobamiento del virus dentro de vesículas.
- f) Redondeamiento de células fusionadas y formación de vesículas conteniendo virus y alteraciones de algunos de ellos — (Steplewski, 1970).

La fusión es independiente de la síntesis proteica celular, así como de la síntesis de ADN o ARN. La inducción o proceso — de fusión, requiere de la presencia de cationes divalentes como Ca^{++} y Mg^{++} que son críticos para el proceso de fusión celular, ya que juegan un papel importante en la estabilización de la — membrana o en los procesos reparadores; pues en su ausencia sobreviene la lisis celular. El pH debe ser entre 7.3 y 8.0 — (Steplewski, 1970, Gordon, 1975; Okada et al. 1968).

Reactivación de los núcleos.

En muchas células altamente especializadas el núcleo generalmente no se divide; sin embargo, esta propiedad no repre-

senta una diferenciación nuclear irreversible, ya que tales núcleos se activan si son introducidos en un citoplasma menos diferenciado, ya sea utilizando microcirugía o fusión celular por virus (Watson, 1974).

Cuando se fusiona un eritrocito nucleado de gallina con una célula humana de cultivo de tejido canceroso (la cepa HeLa), el núcleo del eritrocito reanuda la síntesis tanto del ADN como del ARN. La reactivación se inicia con un aumento del volumen nuclear que permite a los cromosomas del eritrocito de gallina, antes estrechamente compactos, expandirse y controlar la síntesis del ARN. Mediante este experimento se han podido aclarar algunos aspectos de interrelaciones celulares. En alguna forma desconocida, el citoplasma de la célula HeLa debe aportar al núcleo del eritrocito de gallina componentes que le permiten funcionar (Watson, 1974; Barski, 1970).

Aplicación de la fusión celular a problemas de la embriología de mamíferos.

El papel del núcleo en la diferenciación embrionaria ha estado sujeto a datos experimentales que se iniciaron con investigaciones sobre embriología. En las primeras experiencias realizadas, algunos autores creían que la diferenciación es el resultado de divisiones nucleares cualitativas (Watson, 1974). Es decir la diferencia de los blastómeros al recibir diferentes partes del núcleo es lo que determinaría su subsecuente diferenciación (Briggs y King, 1952).

Se ha postulado la posibilidad de que los núcleos célula—

res puedan diferenciarse en respuesta a las distintas regiones en el citoplasma y que tales cambios nucleares puedan tener efectos recíprocos sobre él mismo durante la diferenciación celular (Grant, 1972). Experimentos de este tipo se realizan trasplantando núcleos de células diferenciadas a ovocitos enucleados; tomando en consideración que el citoplasma de un ovocito normal es capaz de dar origen a toda una gama de tipos celulares diferenciados. La realización de experimentos en mamíferos es mucho más complicada, pero las técnicas de fusión celular conocidas nos ayudan para que se lleven a cabo (Briggs and King, 1952; Steplwski et al. 1970).

Enucleación.

Uno de los problemas más interesantes en biología es el estudio de las interrelaciones citoplásmicas en células eucariotes. Los núcleos son trasplantados en otros citoplasmas enucleados (Goldman et al. 1974). Las primeras enucleaciones fueron realizadas en amibas (Kopac, 1959), y en algas (Haemmerling, 1953). Posteriormente se realizó en ovocitos de rana, inyectándole un núcleo de célula somática del mismo animal (Briggs and King, 1952), finalmente se obtiene como resultado el desarrollo exitoso de un anfibio normal (Gurdon, 1963, 1968). La enucleación de los ovocitos de rana puede ser lograda por medio de succión o por exposición del huevo a radiación ultravioleta (Gurdon, 1960).

Algunos trabajos anteriores mencionan que Graham en 1968, (Steplwski et al. 1970), logran transferir núcleos de células-

somáticas de médula ósea, a huevos no fertilizados de ratas y ratones, por medio de virus Sendai inactivados, y se obtienen huevos de dos células, los cultivan tres días in vitro y los transfieren al útero de animales pseudopreñados; sin embargo no hubo un desarrollo más allá de dos células in vivo.

Las técnicas de micromanipulación pueden causar daños irreparables a la célula, cosa que se reduce casi al mínimo si se introducen los núcleos por fusión celular o logrando la enucleación con tratamientos de citochalasin B (Prescott and Kirkpatrick, - 1973; Wrigh, 1973; Poste, 1973). Esta droga es obtenida a partir de cultivos de hongos, e inhiben la citocinesis sin detener la división celular (Croce, 1974; Prescott, 1972). Los métodos de enucleación han abierto nuevos horizontes en el estudio de la genética, de manera que se pueden intencionadamente tomar una estructura subcelular y colocarla en otra célula (Loyter, 1975).

Importancia de la fusión celular.

Los estudios sobre la fusión celular han incrementado las investigaciones para obtener células híbridas y estudiar su comportamiento genético ulterior que, seguramente, ayudarán a aclarar fenómenos que hasta la fecha se encuentran desconocidos. A partir de 1960, la hibridización celular ha desarrollado una nueva área de estudio de biología en células somáticas y en genética. Se han edificado nuevos conceptos concernientes a la herencia, diferenciación, mecanismos de la expresión genética y transformación de células malignas (Barski, 1970).

Las técnicas de fusión celular tienen muchas aplicaciones, gracias a ellas es posible obtener híbridos entre células de diferentes genotipos; dando la oportunidad de estudiar relaciones núcleo-citoplasmáticas en células de mamíferos por caminos similares a las investigaciones de técnicas de trasplantes nucleares en protozoarios y ovocitos de anfibios (Rao and Johnson, 1972). Las técnicas de fusión celular tienen también aplicaciones en estudios sobre la regulación de la síntesis de ADN e iniciación de la mitosis, ya que la latencia de muchos núcleos desaparece cuando sus células respectivas se conjugan con otros tipos celulares.

Una aplicación muy importante de la fusión celular, es la del control genético. Al reactivarse los núcleos de células somáticas, introducidos a ovocitos enucleados, se puede obtener un organismo con toda la información genética de la célula somática, dándonos la posibilidad de escoger las características de tal organismo.

2.- METODOS

El método seguido en este trabajo consiste de cuatro etapas:

- a) Cultivo de tejido de riñón
- b) Obtención y limpieza de ovocitos.
- c) Irradiación y dilución del virus Sendai.
- d) Fusión de células de riñón con ovocitos.

a) Cultivo de tejido de riñón.

El cultivo de tejidos de riñón fué obtenido por el método de tripsinización (Kruse, 1973).

Se sacrifica un conejo de 4 a 9 semanas de edad, se abre ventralmente haciendo tres incisiones: una sobre el costado izquierdo o derecho, otra en la parte anterior un poco arriba del diafragma y la tercera hacia la parte posterior cerca de la región genital. Hechos estos cortes, se levanta la piel como si fuera una hoja de libro, se localizan los riñones y se extraen. Se colocan en una caja de petri estéril que contiene 10 ml. de solución salina balanceada de Hanks (HBSS), para eliminar de los órganos los excesos de sangre y grasa. Se decapsulan y se pasan a otra caja de petri con solución de Hanks. Después se cortan longitudinalmente, descartando la parte medular. Posteriormente, se fragmentan en secciones pequeñas utilizando tijeras; se pasan a un vaso de vidrio grueso en donde se trituran lo más fino que sea posible y se lavan diez veces en solución salina de Hanks, para eliminar completamente la sangre. Ya limpios los fragmentos-

de riñón, se colocan en un matraz con "mosca magnética" en 150 ml. de solución salina amortiguadora libre de Ca^{++} y Mg^{++} (CMF/PBS), con tripsina al 0.25%.

El matraz es colocado durante 20 minutos, en una estufa con una temperatura controlada de $37^{\circ}C$, en donde se encuentra un agitador magnético con el fin de disociar las células. Pasado el tiempo señalado, se retira el matraz del agitador, se deja reposar un poco, se descarta suavemente el sobrenadante, para eliminar factores tóxicos que podrían afectar el cultivo y se agrega nuevamente solución fresca, se repite el paso anterior. A partir de éste los sobrenadantes de las tripsinizaciones se filtran a través de una malla de gasa y se incuban en hielo. Se repite el proceso hasta que las células han sido disociadas y queden solamente grumos de tejido conectivo.

Los sobrenadantes recolectados se colocan en tubos de centrifuga; se centrifugan a 600 g durante diez minutos y se decanta el sobrenadante de los tubos, se resuspenden los "botones" de cada uno de los tubos en medio de cultivo de Eagle, con el fin de detener la acción de la tripsina. Se juntan los "botones" y se vuelve a centrifugar durante el mismo tiempo a las mismas revoluciones; se descarta el sobrenadante. El "botón" obtenido es nuevamente resuspendido en 100 ml. de medio de Eagle fresco, se toma 1.5 ml. de la suspensión celular, cuya concentración es de 2×10^5 células/ml., se agrega a los tubos de Leighton que contienen laminillas de vidrio y se incuban en una estufa a $37^{\circ}C$. Periódicamente se revisan y si es necesario se les cambia el medio.

b) Obtención y limpieza de ovocitos.

Se sacrificaron conejos de seis semanas de edad, que ya habían tenido gazapos, se abren de igual manera que se hizo para obtener los riñones; se localizan y extraen los ovarios colocándolos en cajas de petri que contienen solución amortiguadora (CMF/PBS).

Para realizar la extracción de los folículos del ovario, se utilizaron agujas de sutura y pinzas de relojero (fig. 2), - que permiten sujetar y rasgar el tejido ovárico para separar los folículos (fig. 3). Todo el proceso se lleva a cabo bajo un microscopio de disección. A continuación y utilizando también las agujas de sutura, se procede a obtener los óvulos de los folículos que salen expulsados por el líquido folicular. Los ovocitos (fig. 4) se colocan por medio de micropipetas en una solución de pronasa con una concentración de 0.0125%, para limpiarlos de células foliculares (fig. 5) y de la zona pelúcida (fig. 6). Se lavan con solución amortiguadora y se tienen listos para trabajar.

c) Irradiación y dilución del virus Sendai.

Los virus Sendai fueron inactivados utilizando radiación ultravioleta. Uno o dos ml. del concentrado viral se coloca en una caja de petri, se exponen a la luz de una lámpara de arco de mercurio de 30 watts a una distancia de 15 cm. durante 5 minutos (Gurdon, 1968; Rao, et al. 1972). La suspensión viral debe ser agitada suavemente a intervalos aproximados de un minuto para asegurar que todo el concentrado viral sea inactivado. Después

de diluir éste en solución de Hanks sin glucosa (se encontró como concentración adecuada 200 UHA/ml); se toma un mililitro de la dilución viral para su uso inmediato y se almacena el resto en el congelador.

d) Fusión de células de riñón con ovocitos.

Al encontrarse las células del cultivo de riñón en condiciones óptimas, se procedió a realizar el experimento objeto de este trabajo: La fusión de un ovocito con una célula somática por medio de virus Sendai inactivados. Para tal efecto se fabricó una cámara de cultivo, con un portaobjetos y tiras delgadas de vidrio (fig. 1 (A)); se escoge el largo y ancho de la cámara de acuerdo con las dimensiones de la laminilla donde están las células de riñón en cultivo. Dentro del recinto, formado con las laminillas, se colocan los ovocitos y se esparcen a todo lo largo del mismo, se pone sobre ellos la laminilla con las células de riñón fig. 1 (B y C) y se busca el campo adecuado de células (fig. 7) para que queden estas sobre los ovocitos.

Hecho esto se agrega la dilución viral, previamente inactivada, hasta cubrir todo el volumen del recinto construido, se coloca un cubreobjetos encima y se sella la preparación con parafina (fig. 1 (d)). La cámara se incuba a una temperatura de 4°C durante 10 minutos y se mete después en una estufa a 37°C por un lapso de 30 minutos. Al término de este período, la preparación se lleva a un microscopio con termostato y cámara fotográfica adaptada para su observación y toma de fotogra-

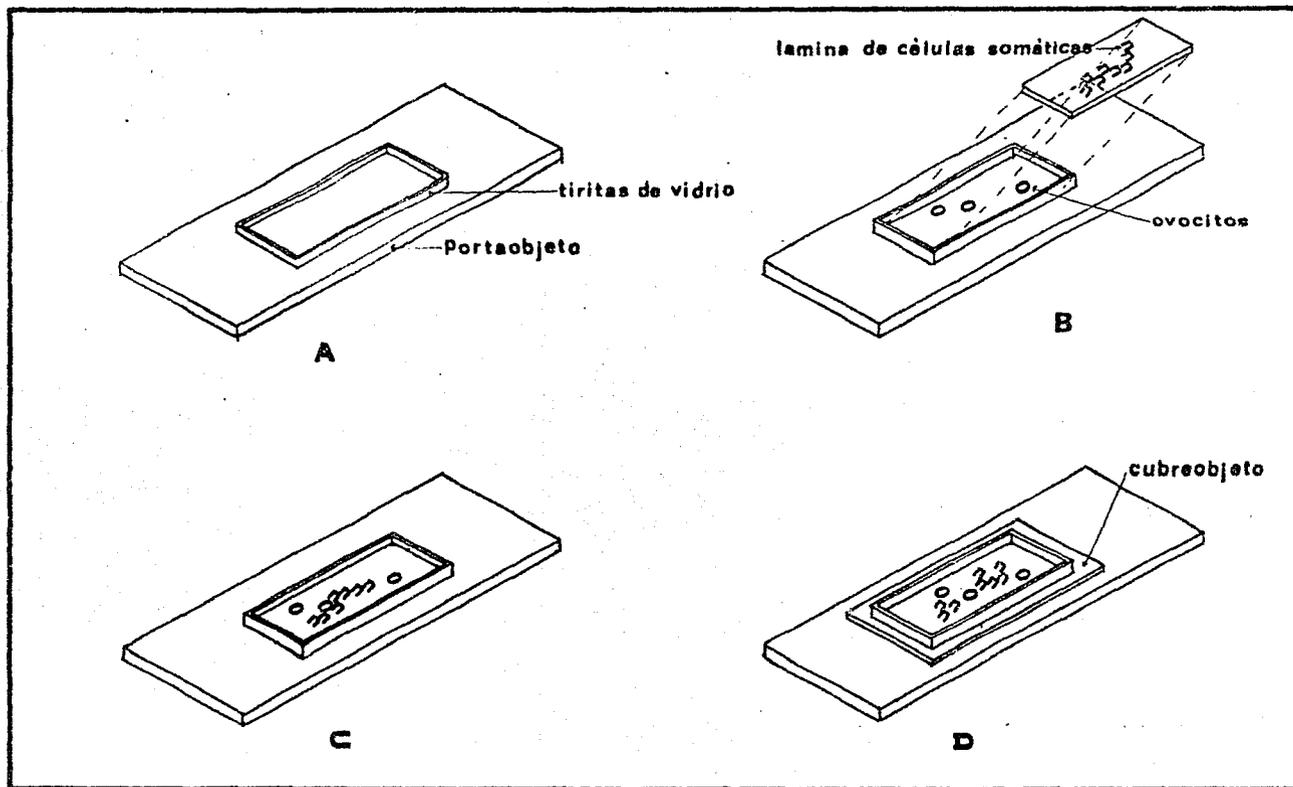


Figura -1 Etapas en la construcción de una cámara para fusionar ovocitos y células somáticas.



Fig. 1.- Ovario completo de coneja con folículos (F). (Película polaroid, 7x campo claro).

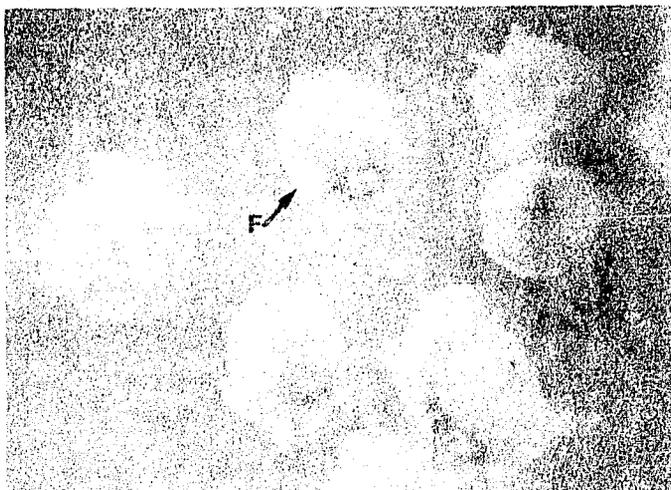


Fig. 2.- Folículos aislados de coneja (F) (Película polaroid, 10x campo claro).

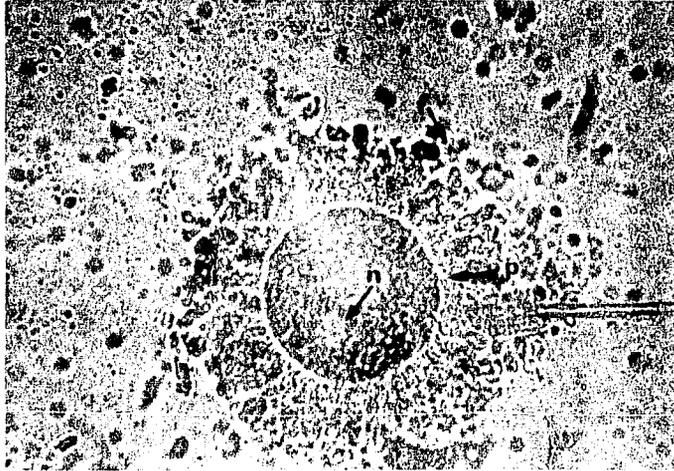


Fig. 3.- Ovocito de coneja mostrando su núcleo (n), zona pelúcida (p) y células foliculares (f). (Película polaroid, 200x contraste de fase).

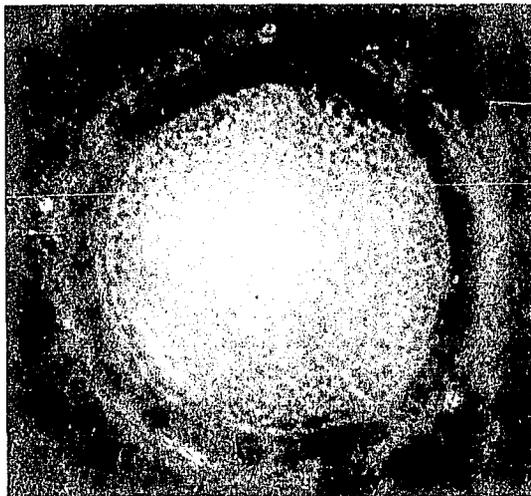


Fig. 4.- Ovocito de coneja mostrando su zona pelúcida (p) después de eliminar las células foliculares con una solución de pronasa. (Película polaroid, 400x campo obscuro).

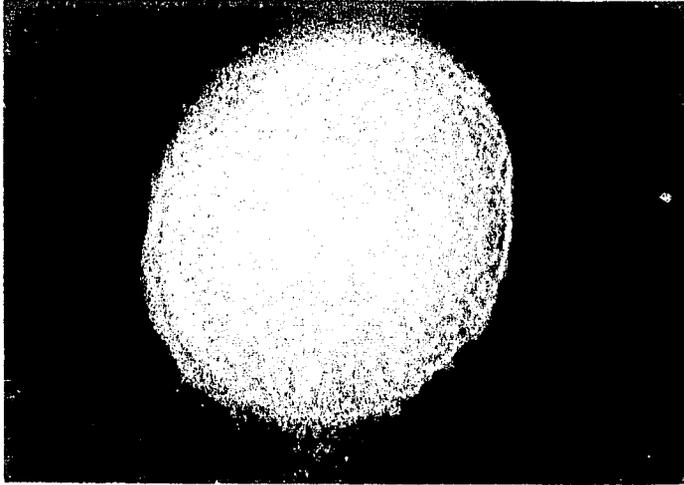


Fig. 5.- Ovocito de coneja después de haber eliminado su zona pelúcida con una solución de pronasa. (Película polaroid, 400x campo obscuro).

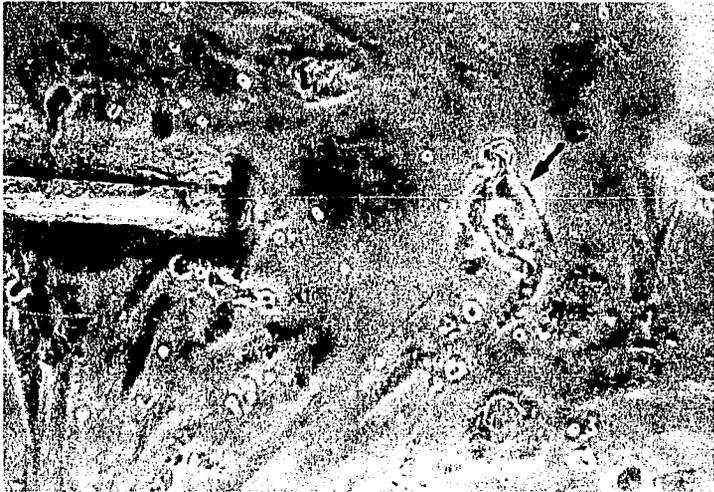


Fig. 6.- Célula de riñón aislada (c). Se observan perfectamente todas sus partes. Se muestra parte de la micropipeta. (Película panatomic X, Kodak. 240x contraste de fase).

frías.

3.- RESULTADOS

Después de una serie de pruebas con diversas diluciones del contenido viral, se encontró que 200UHA/ml., es una concentración adecuada para producir la fusión celular.

Al poner la laminilla de células en la cámara (fig. 1 (C) con la solución viral, se observó aglutinación y fusión celular en las células de riñón (fig. 8). Las células aglutinadas adoptan una forma más o menos redondeada y pierden la característica forma estrellada de un cultivo normal (fig. 9), se une una célula con otra y forman una verdadera maraña de células, cada una de ellas conserva su límite celular. Las células fusionadas también presentan una forma redondeada, pero se introducen unas en otras.

Obtenida la concentración viral, se procedió a fusionar el ovocito con la célula somática de riñón, observándose en las primeras veinticuatro horas después del tratamiento (ver método), como la célula somática se ha redondeado y empieza a penetrar poco a poco en el ovocito (figs. 10 y 11). Esta penetración representa el estímulo suficiente para provocar la división celular del ovocito, formándose dos blastómeros a las cuarenta y ocho horas del tratamiento y cuatro a las setenta y dos horas (fig. 12).



Fig. 7.- Cultivo de tejidos de riñón antes del tratamiento por virus. (Película panatomic, 240x contraste de fase).



Fig. 3.- Cultivo de tejidos de riñón después del tratamiento con virus, se observa a la derecha aglutinación de células (A) y en el centro fusión de éstas (F). (Película panatomic, -- 250x contraste de fase).

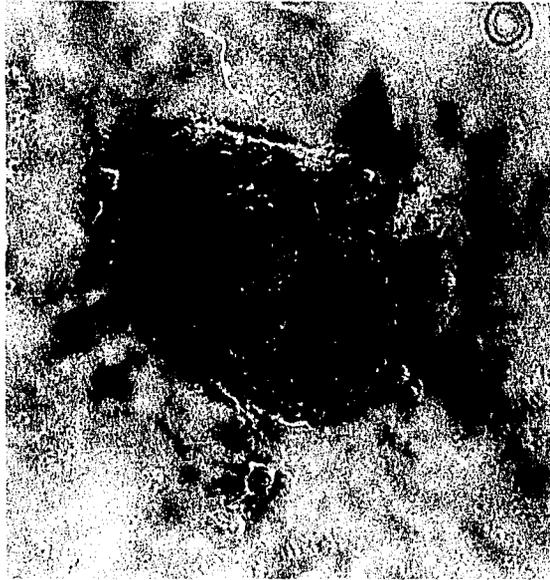


Fig. 9.- Célula somática (s) fusionada con el ovocito.
(Película panatomic, 200x contraste de fase).

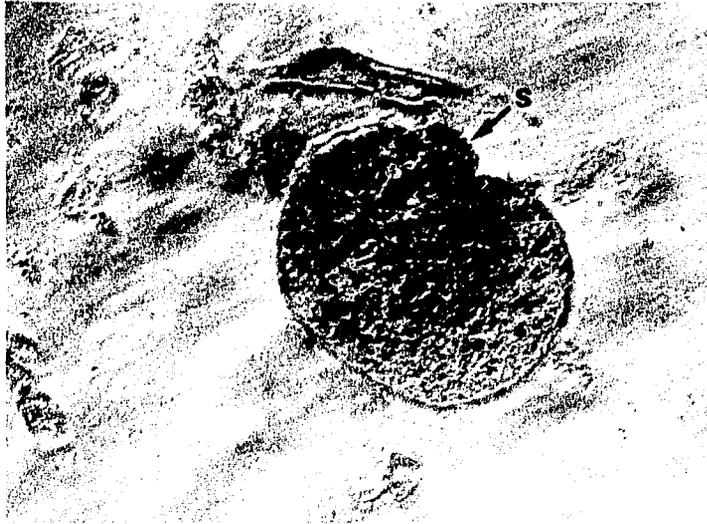


Fig. 10.- Mayor penetración de la célula somática (s)
en el mismo ovocito. (Película panatomic, -
200x contraste de fase).

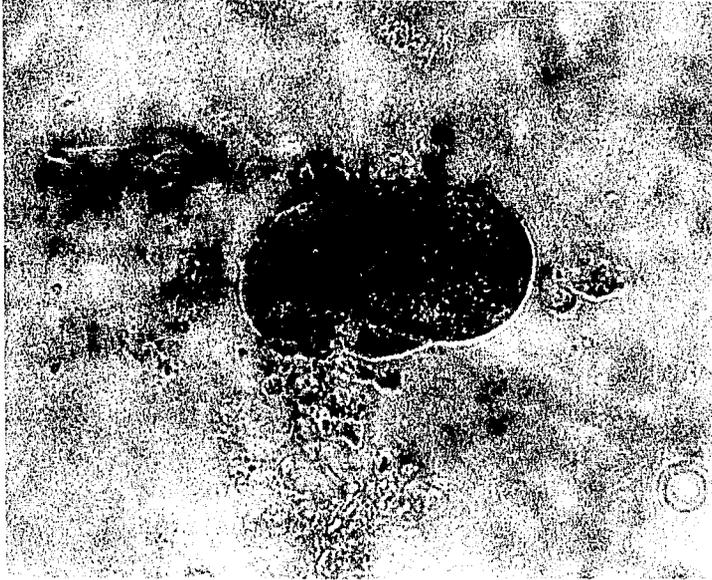


Fig. 11.- El ovocito de las figs. anteriores, dividido en cuatro blastómeros. (Película panatomic, - 200x contraste de fase).

4.- DISCUSION

El experimento se realizó en mamíferos, ya que estos representan la etapa evolutiva a seguir, a partir de los trabajos realizados en anfibios por Gurdon, (1968). Se eligió el conejo pues este animal posee una ovulación provocada, constituyendo la cópula un requisito necesario para que se presente la ovulación. A diferencia de otros mamíferos que ovulan espontáneamente (Arey, 1968), en el conejo no es necesario realizar frotis vaginales para saber en que etapa de su ciclo estral se encuentra. Usando conejas se tenía la seguridad que al extraerles los ovarios, los folículos contendrían ovocitos y no serían folículos amarillos o hemorrágicos y así se evita matar al animal sin necesidad.

En este experimento, las conejas resultaron también ideales porque el tamaño de su ovocito es más grande (140μ) que el de la rata o ratón (75μ), lo que permite poder manipularlos con mayor facilidad.

En 1962, Mintz, reportó que la zona pelúcida del ovocito evita la fusión celular, por cuya razón fué necesario eliminarlas. Está formada por mucoproteínas que pueden extraerse mediante el uso de enzimas específicas. Mintz en 1962 y Daniel en 1972, lograron remover la zona pelúcida de huevos de ratón utilizando pronasa sin provocar daño al ovocito. Esta fué la razón por la que se prefirió usar esta enzima.

En este experimento se emplearon virus Sendai pues Watkins y Harris en 1970, (Harris, 1970), reportaron que el virus Sendai -

inactivado podría ser usado para fusionar células de diferentes especies animales y que las células híbridas así producidas son viables. Este virus conserva su facultad de fusión después de ser expuesto a una dosis de radiación ultravioleta para anular su infectividad.

El método de inactivación del virus por medio de radiación ultravioleta es simple y rápido; y para los propósitos del presente trabajo, completamente satisfactorio. Antes de cada experimento se procede a reinactivar el virus por segunda vez con radiación ultravioleta para tener la seguridad de haber anulado su infectividad (Rao, 1969).

La habilidad fusionante del virus reside en su envoltura, pues se ha comprobado que la capacidad de fusión es completamente abolida por la extracción de lípidos de su membrana mediante eter. Estas observaciones sugieren que la fusión celular requiere de la integridad estructural de la envoltura viral (Harris, 1970).

Como se observa en la fig. 8, existe aglutinación y fusión de células de riñón. La aglutinación se realiza a temperatura de 4°C y la fusión celular empieza hasta que se eleva ésta a 37°C . Parece razonable suponer que donde las superficies de las dos células se encuentran en contacto, la envoltura del virus puede fusionar ambas superficies celulares formando puentes intercelulares. La fusión de células varía según los tipos celulares a la temperatura de 37°C . (Steplewski, et al. 1970).

Según Okada y col. (1968) tanto la superficie de la célula

como la del virus están cargados negativamente, por lo tanto, existe una repulsión electrostática entre ellos, en un medio no iónico, disminuyendo la adsorción del virus hacia la célula. Es muy importante por esta razón la presencia de cationes en concentraciones adecuadas en el medio para neutralizar estas fuerzas repulsivas, formando una doble capa eléctrica o por protección de las cargas negativas, aumentando la adsorción del virus cuando hay cationes en el medio.

Por lo tanto, la aglutinación de células y la presencia de iones de Ca^{++} son factores esenciales para la fusión celular. En las figuras 9 y 10 se observa la fusión del ovocito con la célula somática, esto demuestra que células con distinto grado de diferenciación son compatibles unas con otras cuando son amalgamadas dentro de una unidad. En este caso se observa que no hay mecanismos intracelulares en el reconocimiento de incompatibilidad, similares a aquellos responsables del desconocimiento y destrucción de injertos de tejidos u órganos de diferentes individuos, ya que el ovocito de una coneja con la célula de riñón de otro conejo fusionan sus citoplasmas. También se muestra que el virus Sendai inactivado puede ser utilizado como un medio para fusionar los tipos celulares antes mencionados bajo condiciones controladas.

Estos tipos celulares fusionados se prestan a experimentos que hasta hace pocos años, ni siquiera se pensaban poder realizarse. Se observó que la penetración de esta célula somática representa el estímulo suficiente para provocar la división del ovocito. Esto comprueba que el pronúcleo masculino no es esencial en la seg-

mentación del ovocito, debido a que éste se dividió por estímulo de la célula somática, o sea, que la unión de los pronúcleos masculino y femenino no constituye el factor desencadenante principal, y el espermatozoide que penetra al óvulo no proporciona ninguna sustancia específica que sea necesaria para la activación del óvulo.

El citoplasma del ovocito contiene constituyentes responsables de los cambios en la función de los cromosomas. Las diferentes clases de actividad génica son inducidas por los constituyentes normales del citoplasma; como el óvulo es el sustrato esencial del futuro embrión y los genes de los núcleos de las células somáticas no se pierden, se inactivan solo aquellos que no se necesitan para la diferenciación de cada tipo celular. Por tanto es posible, al fusionar un núcleo de célula somática con un ovocito enucleado, obtener un organismo controlado genéticamente.

De este modo se ha obtenido un ovocito con toda la información genética para dividirse, y si este es trasladado a las trompas uterinas de una coneja preñada, podría desarrollarse en un organismo completo con todas las características genéticas del núcleo de la célula somática. Esto significa obtener el control genético total del producto.

El siguiente paso a realizar es enuclear el ovocito para que el núcleo de la célula somática entre en división celular junto con el citoplasma del ovocito.

El experimento realizado abre las puertas para subsecuen

tes investigaciones sobre la regulación de la síntesis de los ácidos nucleicos, reactivación de los núcleos somáticos y regulación de las actividades de sus genes.

REFERENCIAS

1. AHKONG, Q.F., CRAMP, D., FISHER, D., HOWELL, J., 1972.
Studies on chemically-induced cell fusion. J. -
Cell. Sci., 10: 769-787.
2. AREY, B.L., 1968. Anatomía del desarrollo. Edit. Vázquez.
Buenos Aires.
3. BARSKI, G., 1970. Cell asociation and somatic cell - -
hybridization. Acad. Press. New York.
4. BRIGGS, R. and KING, J.T., 1952. Transplantation of li-
ving nuclei from blastula cells into enucleated
frogs eggs. Proc. Nat. Acad. Sci. 38: 445-463.
5. CROCE, C.M., SAWICKI, D., et al., 1971. Induction of ho-
mokaryocyte, heterokaryocyte and hybrid formation
by lysolecithin. Exp. Cell. Res., 67: 427-435.
6. - - - 1974. Enucleation of somatic cells with cytocha-
lasine B. Methods in cell Biology., 8: 145-150.
7. DANIEL, J.C., 1972. Methods in mammalian embryology. W.H.
Freeman and Co., New York.
8. DIACUMAKOS, E. G. and TATUM, E.L., 1972. Fusion of mam-
malian somatic cells by microsurgery. Proc. Nat. - -
Acad. Sci., 69: 2959-2962.

9. GLEDHILL, B. L., 1972. DNA synthesis in rabbit spermatozoa after treatment with lysolecithin and fusion with somatic cells. *Exp. Cell. Res.*, 73: 33-40.
10. GOLMAN, R.D., POLLACK, R., 1974. Uses of enucleated cells. *Methods in Cell Biology.*, 8: 123-142.
11. GORDON, S., 1975. Cell fusion and some subcellular properties of heterokaryons and hybrids. *The Journal of cell biology* 67: 257-280.
12. GRANT, P., 1972. Nuclear function in embryogenesis., *Devital. Biol.*, 29: 11-15.
13. GURDON, J.B., 1963. Nuclear transplantation in amphibia -- and the importance of staple nuclear changes in promoting cellular differentiation. *Quart. Rev. Biol.* - 38: 54-78.
14. - - - 1960. The effects of ultraviolet irradiation on the uncleaned eggs of Xenopus leavis. *Quart. J. Microscop.* 101: 299-312.
15. - - - 1968. Transplanted nuclei and cell differentiation. *Sci. Amer.* 219: 24-35.
16. HAEMMERLING, J., 1953. Nucleo-cytoplasmic relationships in the development of *Acetabularia*. *Intern. Rev. Cytol.*, 2: 475-498.
17. HARRIS, H., 1970. *Cell fusion*. Harvard Univ. Press. Cambridge, Mass.

18. HAYWOOD, A.M. 1973. Characteristics of Sendai virus receptors in a model membrane. *J. Mol. Biol.*, 83: 427-436.
19. KOPAC, M. J., 1959. Micrurgical studies on living cells. *The cell. I*: 161-189.
20. KOPROWSKI, H. and CROCE, M., 1973. Fusion of somatic and gametic cells with lysolecithin. *Methods in cell biology.*, 7: 251-260.
21. KRUSE, P., 1973. Tissue culture methods and applications. Acad, Press. Inc. New York.
22. LOYTER, A., ZAKAI, N., KULKA, R.G. 1975. "Ultramicroinjection" of macromolecular or small particles into animal cells. *J. Cell. Biol.*, 66: 292-304.
23. LUCY, J. A., AHKONG, Q.F., CRAMP, D., FISHER and HOWELL I. J. 1971. Cell fusion without viruses. *Biochem. J.*, 124: - - 46-47.
24. MINTZ, B., 1962. Experimental study of the developing mammalian egg. Removal of the zona pellucida. *Science*, 138: 594-595.
25. OKADA, Y. and MURAYAMA, F., 1968. Fusion of cells by HVJ: Requirement of concentration of virus particles at the site of two cells for fusion. *Exp. Cell. Res.*, 52: 34-42.

26. POSTE, G., 1973. Anucleate mammalian cells: Applications in cell biology and virology. *Methods in cell biology.*, 7: 211-246.
27. PRESCOTT, D.M. 1959. Nucleosytoplasmic interactions in eggs and embryos. *The Cell.*, 1: 537-611.
28. -- -- 1972. Enucleation of mammalian cells with cytochalasin B. *Exptl. Cell. Res.*, 71: 480-485.
29. PRESCOTT, D.M. and KIRKPATRICK, J. B., 1973. Mass enucleation of cultured animal cells. *Methods in cell biology.*, 7: 189-201.
30. RAO, F., et al., 1968. Complementation analysis on virus fused chinese hamster cells with nutritional markers. *Science.*, 164: 312-314.
31. RAO, P.N. and JOHNSON, R. T., 1972. Cell fusion and its application to studies on the regulation of the cell cycle. *Methods. in cell Biology* 6: 76-122.
32. SCHEID, A. and CHOPPIN, P.W., 1973. Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology.* 57: 475-490.
33. SCHNEEBERGER, E.E. and HARRIS, H., 1966. An ultrastructural study of interspecific cell fusion induced by inactivated Sendai virus. *J. Cell. Sci.*, 1: 401-406.

34. STEPLEWSKI, Z. and KOPROWSKI, H., 1970. Somatic cell fusion and hybridization. Methods in cancer research. Academic Press. 5: 155-191.
35. WATKINS, J.F., 1971. Fusion of cells for virus studies production of cell hybrids. Methods in virology. 5: 1-32.
36. WATSON, J.D., 1974, Biología Molecular del gen. Edit. Interamericana, México.
37. WRIGHT, W. E., 1973. The production of mass populations of anucleate cytoplasm. Methods in cell biology. 7: 203-210.