

12
29°



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS REPRODUCTORAS
DE RATONES DESNUDOS HIPOTIMICOS Y LA VINCULACION
DEL TIMO CON LA REGULACION NEURO-
ENDOCRINA DE LA REPRODUCCION.

T E S I S
Que para obtener el Grado de
DOCTORA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)
p r e s e n t a

PATRICIA ROSAS SAUCEDO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1990



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.

I N D I C E

	Pag.
LISTA DE PUBLICACIONES	1
RESUMEN	2
INTRODUCCION	4
- El ratón atímico-alopécico nu/nu	6
- El ratón alopécico et/et	9
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	11
METODOLOGIAS	12
RESULTADOS	22
- Frecuencia fenotípica	22
- Análisis cromosómico	22
- Evolución de los heteroinjertos de piel en ratones normales y et/et	22
- Fertilidad y supervivencia de los mutantes et/et	24
- Crecimiento corporal y ponderal de los órganos reproductores y endócrinos	27
- Ritmo circádico de la función adrenal en ratones hembras y machos adultos normales y et/et	39
- Pubertad espontánea e inducida en ratones hembra normales y alopécicos et/et y su respuesta a la desnervación noradrenérgica periférica	43
- Ritmo circádico de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados de ratones hembras y machos adultos normales y et/et	49
- Respuesta de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados de ratones macho adultos normales y et/et a la castración y la hemicastración	52
- Respuesta del peso del timo a la castración y la hemicastración en ratones macho adultos normales y et/et	57

DISCUSION	61
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFIA	75
PUBLICACIONES	82

LISTA DE PUBLICACIONES

Esta tesis se basa en los siguientes trabajos publicados:

- I. ROSAS, P., CASTELLANOS, P. y DOMINGUEZ, R. (1987). The existence of spontaneous hairless ("nude") hypothymic mutant mice from the CD1 strain, reared under conventional animal house conditions. Medical Science Research. 15, 553-554.
- II. ROSAS, P., CHAVEZ, R., CRUZ, M.E. y DOMINGUEZ, R. (1989). Sex differences in serum corticosterone levels and circadian rhythms between hairless et/et mutant and CD1 adult mice. Medical Science Research 17, 283-284.
- III. ROSAS, P., ARGUELLO, M.S. y DOMINGUEZ, R. (1989). Effects of noradrenergic peripheral denervation on spontaneous or induced puberty in normal and hypothymic hairless females mice. Medical Science Research 17, 285-286.
- IV. ROSAS, P., CRUZ, M.E. y DOMINGUEZ, R. (1990). Sex differences in the circadian rhythm of brain acetylcholinesterase activity between hairless hypothymic and normal mice. Medical Science Research 18, 139-140.
- V. ROSAS, P. (1990). Respuesta del timo y de la actividad acetilcolinesterasa en el hipotálamo, a la castración y la hemicastración en ratones machos adultos normales e hipotímicos et/et. AIBIR, XV Reunión Anual. 83-94.

RESUMEN

Se ha propuesto la existencia de una relacion bidireccional entre el timo y el sistema reproductor de los mamiferos, con base en las observaciones de las caracteristicas reproductoras de animales con atimia congenita y por los resultados obtenidos en animales timectomizados. En este trabajo se analizaron las caracteristicas geneticas y reproductoras del raton mutante alopecico et/et que presenta alteraciones estructurales y morfologicas del timo y se estudiaron sus respuestas a modificaciones neuroendocrinas vinculadas con la reproduccion.

Se utilizaron ratones hembras y machos alopecicos et/et y normales heterocigotos (et/+) y homocigotos (+/+) mantenidos en condiciones convencionales de biterio. Los resultados mostraron que:

- El raton et/et posee un numero diploide de 40 cromosomas y porta una mutacion autosomica recesiva (alopecia) para el gen que controla la expresion del crecimiento normal del pelo.
- Los machos et/et son hipotimicos, mientras que las hembras presentan una estructura con las caracteristicas histologicas de un ganglio linfatico.
- Los mutantes et/et rechazaron los heteroinjertos de piel.
- La fertilidad de los machos y hembras et/et fue normal, pero en estas ultimas decrecio con la edad.
- El periodo de gestacion, el incremento ponderal durante la preñez y el numero de crias por paricion de las hembras et/et fueron similares a los de las hembras normales.
- La supervivencia de los ratones et/et al destete fue del 80% comparada con los animales normales.
- Los mutantes et/et presentaron un promedio de vida de dos años.
- Los ciclos estrales de los animales et/et fueron irregulares al igual que en las hembras normales.
- En comparacion con los ratones normales, el crecimiento corporal de las hembras et/et fue menor y en los machos fue retardado.
- El peso absoluto de los ovarios de los animales et/et adultos fue menor y el de las adrenales mayor en comparacion con las hembras normales.
- En los machos adultos et/et los pesos absolutos de los testiculos, la prostata y el timo fueron menores, mientras que los pesos de las adrenales, el bazo y las glandulas submandibulares fueron mayores que los de los machos normales.

- Las concentraciones séricas de corticosterona en los ratones et/et fueron mas elevadas que en los animales normales; en ambos tipos de animales se observó un ritmo circádico.
- Las concentraciones de colesterol en las adrenales de los mutantes et/et fueron menores que las de los animales normales; en las adrenales de ambos tipos de ratones se observó un ritmo circádico.
- La pubertad de las hembras et/et fue retardada.
- Las hembras prepúberes normales de 16, 20 y 25 días de edad estimuladas con FMSG adelantaron la pubertad, pero sólo los animales de 25 días ovularon. Las hembras et/et de 30 y 35 días con el mismo tratamiento adelantaron la pubertad, pero sólo 4/11 animales de 35 días ovularon.
- La administración de FMSG-HCG induce la ovulación en los animales normales de 16 días y en los et/et de 30 días.
- La desnervación noradrenérgica periférica desde el nacimiento adelantó la pubertad espontánea de las hembras et/et y no la de los animales normales.
- La desnervación noradrenérgica adelanto la capacidad ovulatoria inducida por la FMSG en las hembras normales de 16 días pero no en las et/et.
- La actividad de la enzima acetilcolinesterasa (ACHE) en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados presentó diferencias sexuales; en los mutantes et/et, la actividad enzimática fue menor en los machos que en las hembras, mientras que en los ratones normales se observó lo opuesto.
- En los machos normales y et/et, la actividad de la AChE en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados presentó un ritmo circádico; en las hembras normales y et/et este ritmo sólo se observó en los cuerpos estriados.
- La respuesta de la actividad de la AChE a la castración y la hemicastración fue inversa entre los machos et/et y los normales y dependió del testículo extirpado.
- En los machos normales castrados se observó un aumento del peso del timo, mientras que en los ratones et/et la castración provocó la disminución del órgano; en los ratones normales, la respuesta del timo a la hemicastración dependió del testículo extirpado, lo que no se observó en los machos et/et hemicastrados.

Estos resultados permiten concluir que la función de las adrenales (ritmos circádicos de colesterol y corticosterona) de los ratones normales y los alopecicos et/et es dependiente del sexo. El timo participa en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la pubertad de la hembra, la cual a su vez está vinculada con la inervación noradrenérgica del ovario. En el ratón macho adulto, existe asimetría en la relación funcional entre el timo, los testículos y la actividad de la enzima AChE en el hipotálamo.

INTRODUCCION

Las hormonas participan en el control homeostático de las funciones celulares por interacciones sinérgicas estimulantes e inhibitorias. El timo, órgano del sistema linfóide, participa en los mecanismos de defensa inmunológica y, según algunos resultados observados en animales quirúrgicos y congénitamente atímicos, está vinculado con los mecanismos de regulación del proceso reproductor de los mamíferos.

Esta interacción funcional entre el timo y el sistema reproductor se basa en los siguientes hechos:

1- en los mamíferos, el tamaño del timo aumenta desde el nacimiento hasta la pubertad, momento en el que comienza la involución del órgano. El peso del timo decrece principalmente por disminución en la producción de los linfocitos de la corteza y por la restricción en la formación de corpúsculos de Hassall en la médula (2, 68).

2- la administración de progesterona, estrógenos o testosterona provoca la involución del timo, mientras que la castración induce la hipertrofia del órgano, aun en ratas de 18 meses de edad (13, 22, 28, 29, 58).

3- la involución del timo también ocurre por la administración de corticosteroides, en tanto que la adrenalectomía provoca su hipertrofia (27).

4- durante la preñez se acelera la involución del timo. hecho que se ha atribuido al aumento de las concentraciones plasmáticas de progesterona y corticosterona durante este periodo (5, 9, 13, 28).

5- en la rata y el conejo los tratamientos prolongados con progesterona alargan la supervivencia de los aloinjertos de piel (4).

6- la timectomia en ratas hembra recién nacidas retarda la maduración sexual, provoca disgenesis ovárica, foliculogénesis anormal y disminución de la fertilidad; en los machos, se observa atrofia testicular y disminución de las concentraciones plasmáticas de testosterona (6, 7, 30, 39, 50, 60, 76).

7- en las células retículo-epiteliales del timo existen receptores a esteroides y a la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (46, 47, 54, 78).

8- en ratas de 7 a 19 meses de edad tratadas con un agonista de la GnRH, se observa un incremento del peso del timo y se restablece la capacidad proliferativa de linfocitos (46, 47).

9- el timo secreta factores que estimulan la secreción de la GnRH. El agregado de extractos de timo (timosina fracción 5) al cultivo conjunto de hipotálamo medio basal e hipófisis de rata, induce la liberación de la hormona luteinizante (LH) al medio de cultivo, efecto que no se

observa cuando la timosina se adiciona al cultivo de hipofisis (63).

10- los factores tímicos aumentan los efectos de la GnRH sobre la secreción in vitro de las gonadotropinas por la hipofisis (49).

11- la secreción de polipeptidos tímicos es modulada por factores neuroendócrinos, entre los cuales la prolactina estimula la secreción in vivo e in vitro de la timulina (16, 20, 26, 27, 44).

12- un factor extraído del timo o de la bolsa de Fabricio (aves), probablemente de naturaleza proteica, inhibe el efecto estimulante que tiene la gonadotropina corionica humana (hCG) in vitro sobre la síntesis de testosterona por la célula de Leydig. Este factor tímico inhibe la actividad de la hCG al interactuar competitivamente en la unión de la hormona con el receptor. Este factor tímico también modula la esteroidogénesis en cultivos de células de ovario estimuladas con hCG (3, 33, 58, 59, 59).

El ratón atímico-alopécico nu/nu

El ratón mutante nu/nu es el modelo biológico espontáneo, a partir del cual se han obtenido el mayor número de evidencias que apoyan la existencia de una vinculación funcional entre el timo y el aparato reproductor.

En el año de 1966 se describe la existencia de este mutante homocigotico recesivo, que se caracteriza por carecer de pelo (alopecico) desde el nacimiento y al cual se le denomina "nude". En el año de 1968 se afirma que este mutante es congenitamente atimico, aunque posteriormente se describe la existencia de ratones nu/nu que poseen un timo aparentemente normal, o bien, un timo diminuto, rudimento timico, rudimento linfocitico, rudimento linfatico o nódulo linfatico, por lo que se sugiere que en los estudios realizados con este raton se verifique la atimia durante la autopsia en todos los casos (23, 34, 35, 56, 57).

Este mutante se caracteriza por:

- la tasa de mortalidad es muy alta durante la primera semana de vida y la mayoría no llega al destete (18, 23).
- en comparacion con sus hermanos heterocigotos (nu/+) o normales (+/+), los mutantes nu/nu son más débiles, su crecimiento es más lento y alcanzan menor tamaño y peso corporal (21, 57, 60, 65, 66).
- en la competencia por el alimento materno están en desventaja frente a sus hermanos con pelo (18, 23, 60).
- su promedio de vida es de 2 a 4 meses en condiciones convencionales de bioterio; cuando son mantenidos en colonias libres de patógenos especificos alcanzan los 10 meses de edad (18, 61).

- presentan envejecimiento prematuro: jóvenes de 1 a 2 meses, adultos de 3 a 4 meses y viejos de 6 a 9 meses (61).

- la cuenta de linfocitos en sangre periférica es extremadamente baja (35, 56).

- las uñas son largas y espiraladas, presentan desarrollo espontáneo de abscesos subcutáneos en los ojos y la cola (16, 21, 23).

- las hembras generalmente son estériles, presentan disgenesia ovárica caracterizada por foliculogénesis anormal con reducción en el número de folículos pequeños y en crecimiento, ausencia de folículos multilaminares y antrales, aceleración del proceso de atresia folicular, teca interna anormal, cuerpos lúteos degenerados y proliferación e hipertrofia de las células intersticiales (18, 23, 35, 39, 40, 41, 42, 43, 67, 74).

- los ovarios y el útero son más pequeños que los de las hembras normales (6, 23, 40).

- la madurez sexual, evaluada por la edad de la apertura vaginal, está retardada y los ciclos estrales son irregulares con fases prolongadas de diestro (6, 23, 65).

- el peso, la morfología y la función de las adrenales, la tiroides y la hipófisis también se encuentran alterados (15, 60, 61, 65, 66, 74).

- las concentraciones de gonadotropinas en la hipófisis y en el suero, así como las de estrógenos,

progesterona y testosterona circulantes, tanto de hembras como de machos nu/nu son muy inferiores a las de sus hermanos nu/+ y +/- (15, 60, 62, 64, 65, 66).

- las concentraciones plasmáticas de corticoesteroides son mayores que las de los ratones normales (15).

- existen controversias en cuanto a la normalidad de la función reproductora de los machos. Tanto se describen animales nu/nu fértiles con espermatogénesis normal, pese a las bajas concentraciones plasmáticas de gonadotropinas y testosterona, como otros que ocasionalmente son fértiles, presentan alteraciones de la espermatogénesis y un alto índice de espermatozoides inmóviles (23, 66, 74).

- el trasplante de timo a ratones nu/nu recién nacidos restablece las concentraciones plasmáticas normales de gonadotropinas en ambos sexos y normaliza la función endócrina de los testículos y las adrenales. Los resultados respecto a la función del ovario son contradictorios, para algunos autores no se modifica (15) y se normaliza para otros (40, 69).

El ratón alopecico et/et

En la actualidad se conoce otro mutante alopecico denominado et/et, que proviene de la cepa de ratón albino CD1. Los machos poseen un órgano con las características histológicas de un timo, pero cuyo peso es aproximadamente la

mitad del peso de un timo normal, por lo que se les define como hipotímicos. Las hembras presentan un órgano linfoide similar a un ganglio linfático, por lo que se les ha considerado atímicas. No obstante estas alteraciones, los ratones et/et viven y se reproducen en las condiciones convencionales del bioterio de la ENEP-Zaragoza (71).

La existencia de este modelo biológico espontáneo permite el estudio sistemático de las características reproductoras de animales con alteraciones en la función del timo y analizar su relación con los mecanismos neuroendocrinos que regulan el proceso reproductor.

Por ello, en este trabajo se describen algunas de las características biológicas de este mutante y su respuesta a modificaciones neuroendocrinas vinculadas con la reproducción.

HIPOTESIS

Las características morfológicas y estructurales del timo de los ratones machos y hembras alopecicos, que viven y se reproducen en las condiciones convencionales de un bioterio, dependen del ambiente hormonal de los animales. Dado que el timo participa en los mecanismos que modulan la función de los organos reproductores, la regulación neuroendócrina de la reproducción en los ratones alopecicos debera presentar diferencias con la de los animales normales.

OBJETIVOS

- Estudiar las características reproductoras de ratones hembras y machos adultos et/et que viven en condiciones convencionales de mantenimiento y su relación con la ausencia de timo o la presencia de restos tímicos.
- Analizar la participación del timo y del sistema noradrenergico periférico en la regulación de la pubertad espontánea e inducida de hembras normales y atímicas.
- Analizar la función adrenal en ratones normales e hipotímicos y su vinculación con el desarrollo del timo.
- Estudiar la respuesta del timo a la ausencia de hormonas testiculares en animales normales e hipotímicos.
- Estudiar la vinculación de los ritmos del sistema colinérgico del sistema nervioso central con el timo.

METODOLOGIAS

Se utilizaron ratones desnudos et/et y ratones fenotípicamente normales, heterocigotos para el gen et (et/+) y homocigotos para el alelo normal (+/+ = CD1), mantenidos desde el nacimiento en condiciones convencionales de bioterio, con fotoperíodo controlado de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), temperatura entre 21 y 24 °C, con libre acceso al agua y al alimento. En los estudios realizados con animales prepúberes, estos tuvieron libre acceso a la madre hasta el momento del destete, el que se realizó a los 30 días de edad.

Frecuencia fenotípica

Para el análisis de la frecuencia fenotípica, se realizaron cruza y retrocruza de ratones con pelo y alopecicos considerando el posible genotipo de los progenitores y la segregación génica esperada para una mutación autosómica recesiva en el gen que controla la expresión del crecimiento normal del pelo. En todos los partos se registró el número de crías por camada y el número de crías con pelo y alopecicas.

Análisis cromosómico

Se usaron ratones machos y hembras normales (+/+ y et/+) y et/et de 40 a 90 días de edad a los cuales se les

inyectó una solución de colchicina (Sigma Chem.Co., St.Louis, Mo., EE.UU) al 0.1% (0.1 ml/10 g de peso corporal) por vía intraperitoneal. Los animales fueron sacrificados por sobredosis de éter 90 minutos después de la administración del mitogeno. se diseccionaron los fémures, se limpiaron y se cortaron las epifisis. El contenido de la cavidad ósea se colectó en tubos de centrifuga y los cromosomas se obtuvieron a partir de los linfocitos de la médula ósea siguiendo la técnica de Morales (53).

La tinción convencional de las laminillas se realizó con una solución de Giemsa (Merck, Mexico) al 4% en amortiguador Sorensen (fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio monobásico al 0.067M, 1:1), pH 6.8, por 10 min; se lavaron con agua corriente y se dejaron secar al aire antes de montar en definitivo.

Las bandas C se obtuvieron a partir de preparaciones recientes siguiendo la técnica de Sharma y Sharma (77) y se tificaron en una solución de Giemsa, pH 6.8, al 3% en amortiguador Sorensen, durante 20 min. Se lavaron en agua corriente y se dejaron secar al aire.

Para la estimación del complemento cromosómico, y de las bandas C, solo se seleccionaron las C-metafases que presentaron cromosomas condensados, individualizados y dispersos en el mismo plano.

El conteo se hizo en un intervalo de 38 a 42

cromosomas por C-metafase, el número cromosómico de la línea en cuestión se determinó como el número que presentó la mayor frecuencia (número modal).

Prueba de la evolución de heteroinjertos de piel en ratones normales y et/et

Se utilizaron grupos de 10 ratones machos y hembras adultos CD1 y et/et. Los animales fueron anestesiados con eter, se limpió la región axilar con una solución de alcohol yodado, se diseccionó un cm² de piel completa y se injertó piel de rata macho adulta. Los animales se dejaron recuperar en las condiciones convencionales del bioterio. La evolución de los injertos se observó diariamente, registrando los signos de viabilidad, de necrosis y el proceso de cicatrización del mismo.

Fertilidad y supervivencia de los mutantes et/et

Para conocer el patrón de ciclicidad vaginal, se obtuvieron frotis vaginales diarios de ratones hembra et/et, et/+ y +/-, que fueron teñidos con hematoxilina y eosina.

Para estudiar la fertilidad de los mutantes et/et, se realizaron cruces de hembras y machos alopecicos con ratones normales heterocigotos (et/+) y homocigotos dominantes (+/+), desde los 60 hasta los 150 días de edad. Se cuantificó el número total de apareamientos y el número de cruces fértiles. Se realizaron cruces de hembras y machos

et/et mayores de 1 año para evaluar el periodo de vida fértil.

Grupos de 20 hembras de los tres genotipos que presentaron tapón espermático (día 1 de preñez) fueron pesadas cada tercer día durante el periodo de gestación hasta el momento de la parición.

Al nacimiento se formaron camadas puras de animales et/et y camadas mixtas en las que se les mantuvo a los ratones et/et con sus hermanos normales heterocigotos (7-8 animales por camada). Con el fin de incrementar la supervivencia de las crías et/et durante el periodo de la lactancia, se formaron camadas de 4 crías et/et por madre lo que llevó a reunir 12 crías normales por madre.

Crecimiento corporal y ponderal de órganos reproductores y endócrinos

Grupos de 10 ratones hembras y machos et/+ y et/et, obtenidos de camadas puras, fueron sacrificados por decapitación a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días. De la misma manera se sacrificaron grupos de 32 machos y 48 hembras de 150 días. A la autopsia se diseccionaron y pesaron en balanza de precisión los ovarios, el útero, los testículos, la próstata, las vesículas seminales, el timo, el bazo, las glándulas submandibulares, la hipófisis y las adrenales.

Los timos de los animales adultos fueron fijados en solución de Bouin, incluidos en parafina, cortados a 10 μ m y

teñidos con hematoxilina-eosina. El análisis histológico de este órgano se realizó en 6 animales +/-, et/+ y et/et de ambos sexos, tomados al azar.

Ritmo circádico de la función adrenal en ratones hembras y machos adultos normales y et/et

Grupos de hembras en etapa de diestro vaginal y machos CD1 y et/et de 150 días de edad, fueron sacrificados por decapitación a las 4:00, 8:00, 12:00, 16:00, 20:00 y 24:00. Se colectó la sangre del tronco, se dejó coagular a temperatura ambiente por una hora y se centrifugó a 1000 g durante 15 min. El suero fue colectado y almacenado a -20 °C hasta la determinación de las concentraciones de corticosterona por fluorometría (25). Las adrenales fueron pesadas en balanza de precisión y homogeneizadas en solución salina (NaCl 0.9%, pH 6.8) y se cuantificaron de las concentraciones de colesterol por espectrofotometría (1).

Pubertad

Para analizar la pubertad espontánea, se utilizaron grupos de 60 hembras desnudas et/et y 60 normales heterocigotas et/+. En todos los animales se registró la edad de la apertura vaginal (pubertad) y del primer estro vaginal.

Para analizar si la disponibilidad de alimento durante la lactancia, modifica la edad de la pubertad, ésta se analizó en las hembras et/et de las camadas formadas por 4

animales y se les comparó con la de las et/+ que se criaron en camadas de 12 animales por madre.

El estudio de la ovulación espontánea al primer estro vaginal, se realizó en 22 ratones et/+ y 18 et/et que fueron sacrificados entre las 9:00 y 10:00 h del mismo día. A la autopsia se disecaron los ovarios y el útero y se pesaron en balanza de precisión; en los oviductos se buscó la presencia de ovocitos y se contaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

1. Estudio de la participación del timo y del sistema noradrenergico en la regulación de la pubertad espontánea y la ovulación.

Hembras recién nacidas et/+ y et/et fueron inyectadas diariamente entre las 9:00 y 10:00 h con guanetidina (Ciba-Geigy, Mexico) (bloqueador adrenergico periférico), en dosis de 20 mg/Kg de peso corporal o con solución salina.

2. Estudio de la pubertad y la ovulación inducidas por la administración de gonadotropinas en ratones normales y et/et.

Con base en el retardo en la edad de la apertura vaginal que presentan las hembras alopécicas, se decidió utilizar hembras normales heterocigotas et/+ de 16, 20 y 25 días de edad y hembras et/et de 30 y 35 días, las cuales fueron tratadas con 5 u.i. de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) (Sigma Chem. Co. Ms. EE.UU.).

Con el mismo criterio de selección más lo observado en el experimento anterior, grupos de hembras normales et/+ de 16 y 20 días y et/et de 25 y 30 días recibieron 5 u.i. de PMSG y 54 h después 3 u.i. de hCG (Sigma Chem.Co., EE.UU).

3. Estudio de los efectos de la desnervación noradrenergica periférica sobre la pubertad y la ovulación inducidas en ratones normales y et/et.

Considerando los resultados observados en la respuesta ovulatoria de las hembras normales y alopécicas a las gonadotropinas, se utilizaron grupos de hembras et/+ y et/et inyectadas con guanetidina desde el nacimiento, las cuales fueron tratadas con 5 u.i. de PMSG a los 16 y 30 días respectivamente.

En todos los animales de los 3 experimentos anteriores se registró la edad de la apertura vaginal y del primer estro, momento en que fueron sacrificados. A la autopsia se diseccionaron los ovarios y el utero y se pesaron en balanza de precisión; en los oviductos se buscó la presencia de ovocitos y se contaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Ritmo circádico de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados de ratones machos y hembras adultos normales y et/et

Grupos de 6 a 8 ratones hembras (en diestro vaginal) y machos de 150 días de edad, fueron sacrificados

por decapitación a las 04:00, 08:00, 12:00, 16:00, 20:00 y 24:00 horas. Se extrajo el cerebro y se disecaron el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados, se colocaron sobre un vidrio de reloj mantenido sobre hielo, se pesaron en balanza de precisión y se homogeneizaron en frío por sonicación en un amortiguador de fosfatos 0.07 M, pH 8. La actividad AChE fue cuantificada por espectrofotometría, en duplicado, utilizando yoduro de acetiltiocolina como sustrato (19). Los resultados fueron expresados en nmol de sustrato hidrolizado/min/mg de tejido. También se cuantificó la concentración de proteína ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido) en las mismas estructuras (8).

Prueba de nado

Con el objeto de evaluar la actividad motora de los mutantes alopecicos, grupos de 10 ratones adultos CD1 y et/et de ambos sexos fueron colocados individualmente en una caja de acrílico de 30 x 20 x 15 cm, llena con agua a 22 °C y se contó el número de movimientos de las extremidades posteriores durante 30 seg.

Respuesta del timo y de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados de ratones macho adultos normales y et/et a la castración y la hemicastración

Se utilizaron ratones machos normales CD1 y desnudos hipotímicos et/et adultos. Los animales fueron

distribuidos en los siguientes grupos experimentales: testigo absoluto, con operación simulada, castrados y hemicastrados de la gonada izquierda o la derecha. Las intervenciones quirúrgicas se realizaron por vía escrotal, bajo anestesia con éter.

Los testículos extirpados de los grupos castrados y hemicastrados fueron pesados en balanza de precisión. Los animales del grupo con operación simulada fueron anestesiados, se les seccionó el escroto el que se suturó inmediatamente.

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación a las 12:00 h, 20 días después de las operaciones. A la autopsia se disecaron los testículos, las adrenales y el timo y se pesaron en balanza de precisión.

Inmediatamente después de la decapitación se extrajo el cerebro y se disecaron el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados donde se determinó la actividad de la enzima AChE.

Análisis estadístico de los resultados

Los datos de edad de apertura vaginal y primer estro, de pesos corporales y de órganos, del número de ovocitos, de las concentraciones de corticoides y colesterol, de la actividad de la AChE y del número de crías por parición fueron analizados por análisis de varianza multifactorial

[ANDEVA] seguido de la prueba de Duncan: en los casos que se compararon dos grupos, el análisis se realizó por la prueba de "t" de Student; las tasas de fertilidad y de animales ovulantes fueron cotejadas por la prueba de probabilidad exacta de Fisher o de J_1^2 . Solo se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor al 5%.

RESULTADOS

Frecuencia fenotípica

La frecuencia fenotípica observada de animales con pelo y alopecicos de las cruza de ratones hembras y machos $+/+ \times et/et$, las retrocruzas de la F1 ($et/+$) con el progenitor et/et y las cruza de $et/et \times et/et$ no presentaron diferencias significativas con la frecuencia esperada para una mutación autosómica recesiva (Tabla 1).

Análisis cromosómico

El análisis cromosómico de los ratones CD1, portadores ($et/+$) y desnudos et/et mostró que los tres tipos de animales tienen como número diploide 40 cromosomas. Todos ellos de tipo acrocéntrico (Figura 1). No se observaron diferencias en el patrón de bandas C entre los tres tipos de ratones.

Evolución de los heteroinjertos de piel en ratones normales y et/et

Los injertos de piel de rata en ratones machos y hembras et/et y CD1 fueron rechazados en todos los casos. No se observaron diferencias significativas en el lapso transcurrido entre el injerto y el rechazo del mismo. El proceso de cicatrización fue similar en ambos tipos de animales.

Tabla 1. Frecuencia fenotípica observada y media \pm e.e.m. del número de crías por parición de las cruza de ratones machos y hembras mutantes alopecicos et/et con ratones normales heterocigotos (et/+) y homocigotos (+/+).

TIPO DE CRUZA		No. TOTAL DE CRIAS	No. DE CRIAS/ PARICION	No. DE CRIAS/ FENOTIPO		FRECUENCIA FENOTIPICA	
macho X hembra				con pelo	alopécicas	con pelo	alopécicas
+/+	+/+	317	10.6 \pm 0.5	317	0	100 %	---
	et/et	206	10.3 \pm 0.7	206	0	100 %	---
et/+	et/et	177	10.4 \pm 0.7	91	86	51%	49 %
	+/+	301	10.0 \pm 0.4	301	0	100 %	---
et/et	et/+	554	10.1 \pm 0.4	288	266	52 %	48 %
	et/et	267	10.3 \pm 0.5	0	267	---	100 %



Figura 1. Cromosomas de la médula ósea del ratón mutante alopécico et/et. Número cromosómico diploide = 40 (1000 X).

Fertilidad y supervivencia de los mutantes et/et

Los ciclos estrales de las hembras normales (+/+ y et/+) y alopécicas et/et fueron irregulares.

La tasa de fertilidad de los machos et/et fue igual que la de los animales normales de los 60 a los 150 días de edad. En las hembras et/et de 60 a 90 días, la fertilidad fue similar a la de las hembras normales, pero a los 150 días fue 45% menor que la de las hembras normales (Tabla 2). En los

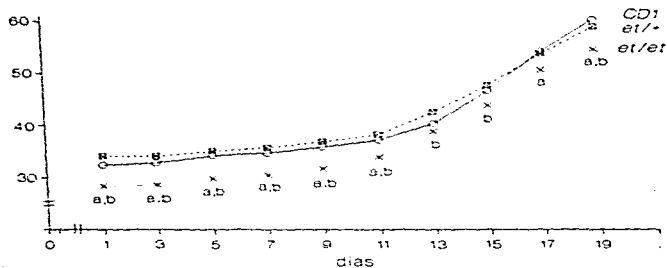
machos et/et. 14/23 animales fueron fértiles aún a los 720 días de edad; mientras que en las hembras et/et solo 2/11 llegaron a parir a los 450 días.

Tabla 2. Tasa de fertilidad de ratones machos y hembras normales homocigotos (+/+) y heterocigotos (et/+) y alopecicos et/et

GRUPO	No. TOTAL DE APAREAMIENTOS	No. DE CRUZAS FERTILES	FERTILIDAD (%)
Machos			
+/+	40	40	100
et/+	20	20	100
et/et	159	157	99
Hembras			
+/+	45	42	93
et/+	118	113	96
et/et	39	37	95

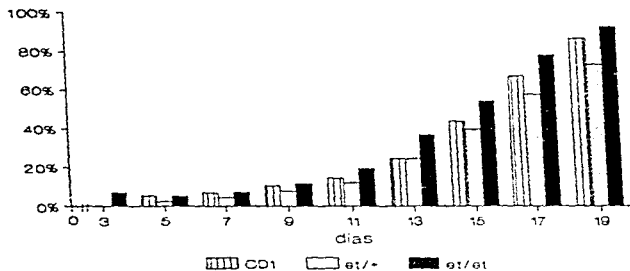
El periodo de gestación (20 días) y el número de crías por parición fue similar entre las hembras normales y las et/et (Tabla 1). El crecimiento corporal durante la preñez siempre fue menor en las hembras et/et respecto a las hembras CD1 y et/+, sin embargo, la tasa de incremento no mostró diferencias significativas (Figura 2).

Figura 2. CRECIMIENTO PONDERAL (g) DE RATONES CD1, et/+ y et/et DURANTE LA PRENEZ



a. P < 0.05 vs CD1
b. P < 0.05 vs et/+

INCREMENTO PONDERAL (%) DE RATONES CD1, et/+ y et/et DURANTE LA PRENEZ



En las camadas mixtas, (hipotímicos et/et con sus heterocigotos et/+) la supervivencia de las crías et/et entre los 15-18 días fue del 50%; la mayoría de los animales no llegaron al periodo de destete. Cuando se separaron al nacimiento los animales alopecicos de sus hermanos con pelo, la supervivencia se incremento al 80% al destete. El 60% de los animales separados de esta forma alcanzo las 52 semanas de vida.

Crecimiento corporal y ponderal de los órganos reproductores y endócrinos

En las camadas puras de animales normales o alopecicos, el crecimiento corporal ponderal de las hembras normales heterocigotas et/+ y atímicas et/et fue similar desde el nacimiento hasta los 10 días, pero de los 15 días en adelante, el peso corporal de las hembras desnudas fue siempre menor que el de las normales. En los machos et/et el crecimiento ponderal fue semejante al de sus hermanos heterocigotos normales desde el nacimiento hasta los 15 días, pero a partir de los 20 días el aumento de peso en los normales fue significativamente mayor, diferencia que no se observó en los animales adultos (Tablas 3 y 4; Figura 3).

El peso de los ovarios de los animales desnudos fue similar al de las hembras et/+ de los 5 a los 30 días, pero a los 150 días el peso de los ovarios de las hembras normales heterocigotas et/+ fue significativamente mayor que el de las

Tabla 3. Media \pm e.c.m. del peso corporal (g) y de órganos (mg) de ratones hembras et/+ y et/et a diferentes edades.

EDAD (días)	PESO CORPORAL		OVARIOS		UTERO	
	et/+	et/et	et/+	et/et	et/+	et/et
5	6.8 \pm 0.1	6.7 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1	5.2 \pm 0.1	5.9 \pm 0.0	5.9 \pm 0.7
10	8.5 \pm 0.1	8.4 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1	11.7 \pm 0.0	11.7 \pm 0.7
15	8.5 \pm 0.1	8.4 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1	11.7 \pm 0.6*	11.7 \pm 0.6*
20	9.5 \pm 0.1	9.4 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1	10.3 \pm 0.7*	10.3 \pm 0.7*
25	11.8 \pm 0.1	11.7 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1	10.3 \pm 0.7*	10.3 \pm 0.7*
30	17.7 \pm 0.1	17.6 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1	10.3 \pm 0.7*	10.3 \pm 0.7*
150	37.7 \pm 0.1	37.6 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1	195.4 \pm 0.7	195.4 \pm 0.7

EDAD (días)	BAZO		TIEMO	
	et/+	et/et	et/+	et/et
5	30.8 \pm 0.1	30.7 \pm 0.1	11.7 \pm 0.0	11.7 \pm 0.7
10	30.8 \pm 0.1	30.7 \pm 0.1	11.7 \pm 0.6*	11.7 \pm 0.6*
15	30.8 \pm 0.1	30.7 \pm 0.1	11.7 \pm 0.6*	11.7 \pm 0.6*
20	30.8 \pm 0.1	30.7 \pm 0.1	11.7 \pm 0.6*	11.7 \pm 0.6*
25	30.8 \pm 0.1	30.7 \pm 0.1	11.7 \pm 0.6*	11.7 \pm 0.6*
30	30.8 \pm 0.1	30.7 \pm 0.1	11.7 \pm 0.6*	11.7 \pm 0.6*
150	167.7 \pm 0.1	167.6 \pm 0.1	168.4 \pm 0.7	168.4 \pm 0.7

EDAD (días)	HIPOFISIS		GLANDULAS SUBMANDIBULARES	
	et/+	et/et	et/+	et/et
5	1.2 \pm 0.3	1.3 \pm 0.3	---	---
10	1.2 \pm 0.3	1.3 \pm 0.3	---	---
15	1.2 \pm 0.3	1.3 \pm 0.3	---	---
20	1.2 \pm 0.3	1.3 \pm 0.3	---	---
25	1.2 \pm 0.3	1.3 \pm 0.3	---	---
30	1.2 \pm 0.3	1.3 \pm 0.3	---	---
150	4.9 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1	168.4 \pm 0.7	168.4 \pm 0.7

* P < 0.05 vs ratones et/+. (ANDEVA seguida de la prueba de Duncan).
n=10 (2-30 días); n=6 (150 días)

Tabla 4. Media \pm e.e.m. del peso corporal (g) y de órganos (mg) de ratones machos et/+ y et/et a diferentes edades.

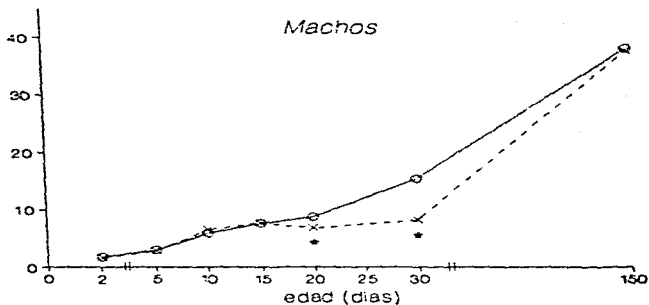
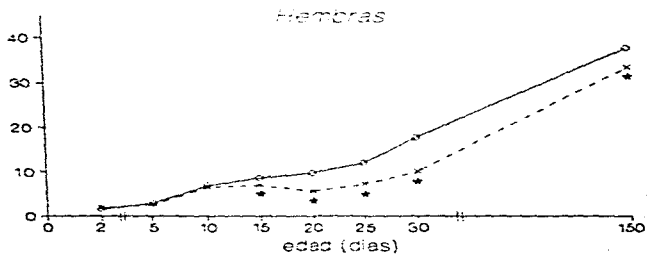
EDAD (días)	PESO CORPORAL		TESTICULOS		PROSTATA	
	et/+	et/et	et/+	et/et	et/+	et/et
5	7.7 \pm 0.3	7.7 \pm 0.3	1.1 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.03	0.2 \pm 0.03
10	5.9 \pm 0.1	5.9 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.04	0.2 \pm 0.07*
15	7.7 \pm 0.3	7.7 \pm 0.3	1.1 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.08	0.2 \pm 0.06
20	8.7 \pm 0.3	8.7 \pm 0.3	1.1 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.06	0.2 \pm 0.07
30	15.4 \pm 0.6	15.4 \pm 0.6	1.1 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.03	0.2 \pm 0.03*
150	38.1 \pm 0.9	38.1 \pm 0.9	1.1 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.01	0.2 \pm 0.03*

EDAD (días)	VESICULAS SEMINALES		BAZO		TIMO	
	et/+	et/et	et/+	et/et	et/+	et/et
5	3.4 \pm 0.2	3.4 \pm 0.2	1.9 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	15.3 \pm 0.7	13.0 \pm 0.9
10	5.4 \pm 0.2	5.4 \pm 0.2	1.9 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	15.3 \pm 0.7	13.2 \pm 0.9
15	6.7 \pm 0.6	6.7 \pm 0.6	1.9 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	15.3 \pm 0.7	13.2 \pm 0.9
20	8.7 \pm 0.6	8.7 \pm 0.6	1.9 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	15.3 \pm 0.7	13.2 \pm 0.9
30	15.4 \pm 0.6	15.4 \pm 0.6	1.9 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	15.3 \pm 0.7	13.2 \pm 0.9
150	38.1 \pm 0.9	38.1 \pm 0.9	1.9 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	15.3 \pm 0.7	13.2 \pm 0.9

EDAD (días)	HIPOFISIS		GLANDULAS SUDORÍFICAS	
	et/+	et/et	et/+	et/et
5	2.4 \pm 0.2	2.4 \pm 0.2	---	---
10	1.5 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	---	---
15	2.7 \pm 0.3	2.7 \pm 0.3	52.6 \pm 2.5	44.6 \pm 2.0*
20	3.6 \pm 0.3	3.6 \pm 0.3	52.2 \pm 3.1	38.6 \pm 1.3
30	4.4 \pm 0.3	4.4 \pm 0.3	52.2 \pm 3.1	44.0 \pm 3.7
150	4.4 \pm 0.3	4.4 \pm 0.3	205.7 \pm 8.2	255.0 \pm 7.8*

* P < 0.05 vs ratones et/+ (ANDEVA seguido de la prueba de Duncan).
n=10 (2-30 días), n=32-48 (150 días)

Figura 3. CURVA DE CRECIMIENTO (g) DE RATONES $et/+$ (○) y et/et (×).



* $P < 0.05$ vs ratones $et/+$

et/et. El peso del útero de las hembras et/et fue menor que el de las normales de los 15 a los 30 días, diferencia que no se observó en los animales adultos. La expresión del peso de estos órganos en función del peso corporal mostró un patrón de crecimiento inverso, mientras que el peso relativo de los ovarios de las hembras et/et fue significativamente mayor que el de los animales normales. el útero no presentó diferencias significativas (Tabla 3, Figura 4).

El peso de los testículos de los ratones et/et fue menor que el de los animales heterocigotos de los 15 hasta los 150 días, mientras que la próstata mostró ser menor a los 10, 30 y 150 días y las vesículas seminales solamente a los 30 días. El análisis de estos órganos en función del peso corporal, muestra que el peso de los testículos de los ratones desnudos tienden a ser siempre menores que los de los machos et/+ siendo estas diferencias significativas a los 30 días y en el adulto. Los pesos relativos de la próstata y las vesículas seminales no presentaron diferencias con lo observado en los pesos absolutos (Tabla 4, Figura 5).

El peso del timo en las hembras et/et fue semejante al de los ratones normales recién nacidos, pero a partir de los 10 días el tamaño del órgano de los ratones alopecicos fue 50% menor que el de los normales. En los animales adultos, la diferencia ponderal de los timos de ambos grupos de animales no fue tan marcada, aunque en los animales et/et

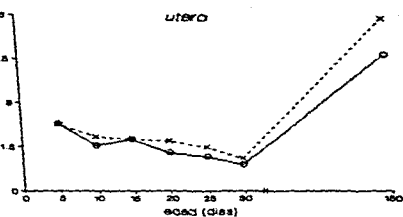
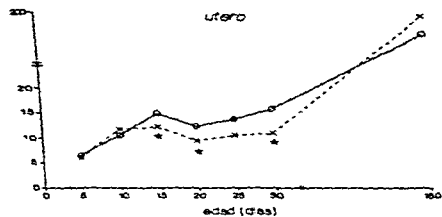
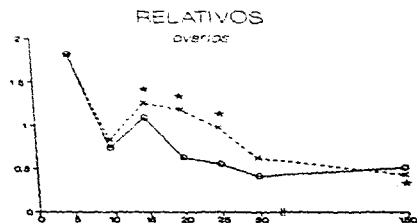
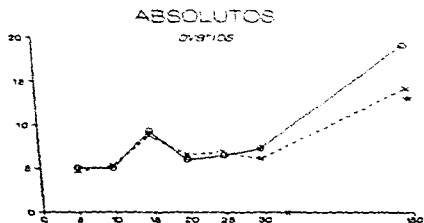
fue siempre menor. El análisis del peso del timo en función del peso corporal mostro diferencias significativas de los 10 a los 25 días entre ambos tipos de animales, siendo menor el peso relativo en los alopecicos (Tabla 3, Figura 6).

Los pesos absolutos del bazo y de las glándulas submandibulares de las hembras et/et fueron menores que los de las normales de los 20 a los 30 días pero similares en los animales adultos, mientras que la expresión del peso de estos dos órganos en función del peso corporal mostro un patrón de crecimiento inverso en ambos tipos de animales (Tabla 3, Figura 6).

El peso de los timos de los machos normales y et/et fue similar en los recién nacidos y hasta los 10 días, momento en el cual el peso del organo fue siempre mayor en los animales normales. En los ratones alopecicos, el tamaño del timo comenzó a decrecer a partir de los 10 días y se estabilizó a los 30 días. En el animal adulto, el peso del timo de los et/et fue de aproximadamente la mitad del de los ratones normales. El peso relativo del timo de los machos et/et fue siempre menor al de los ratones normales (Tabla 4, Figura 7).

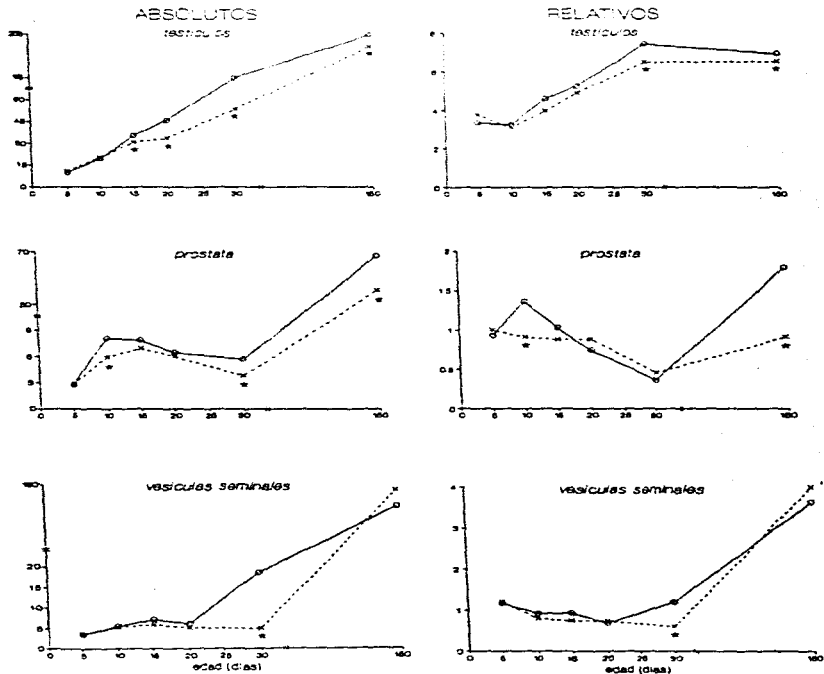
Los pesos absolutos y relativos del bazo y las glándulas submandibulares de los machos et/+ y et/et no

Figura 4. PESOS ABSOLUTOS (mg) Y RELATIVOS (mg/g de peso corporal) DE LOS OVARIOS Y EL UTERO DE RATONES et/+ (-o-) y et/et (*) A DIFERENTES EDADES



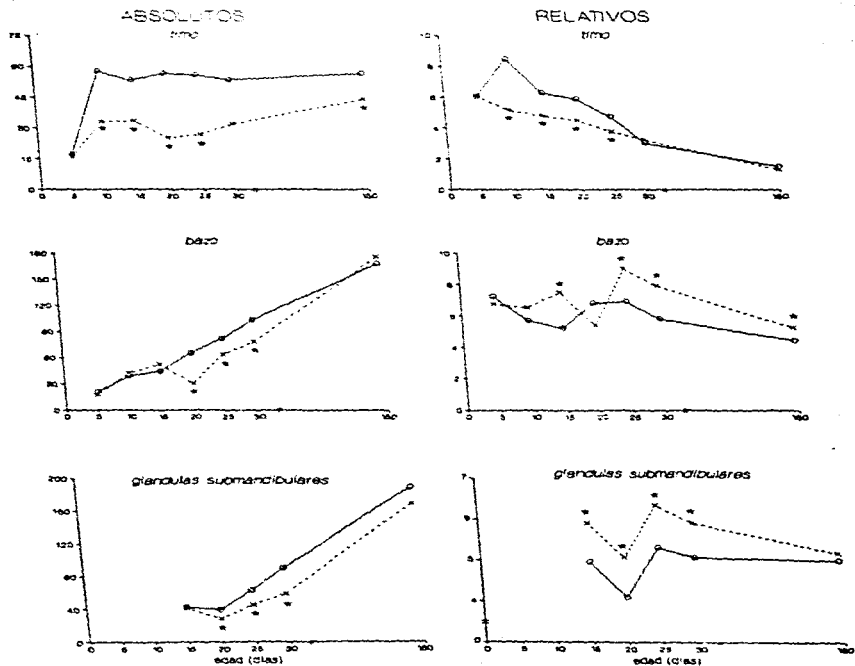
* P < 0.05

Figura 5. PESOS ABSOLUTOS (mg) Y RELATIVOS (mg/g de peso corporal) DE LOS TESTÍCULOS, LA PROSTATA Y LAS VESÍCULAS SEMINALES DE RATONES *et/et* y *et/et* A DIFERENTES EDADES



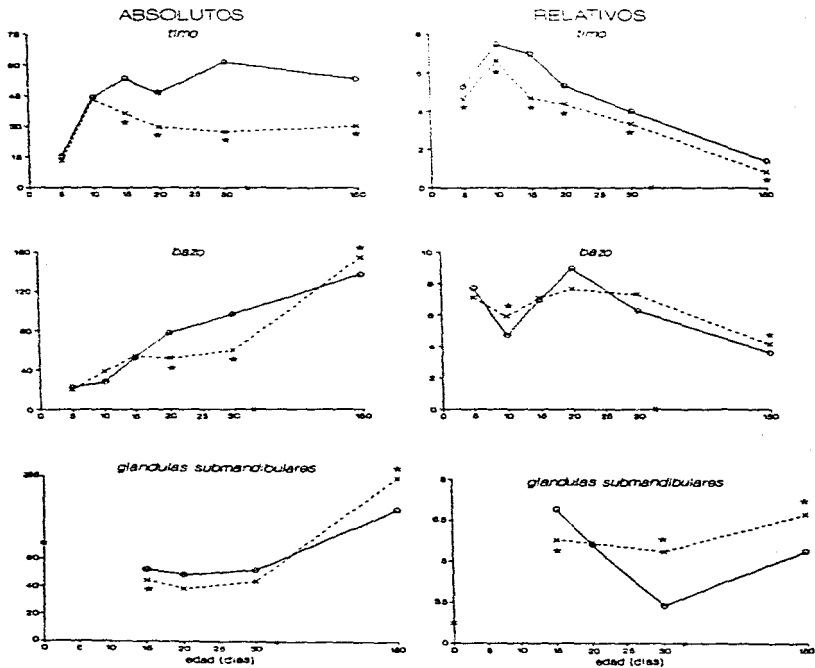
* $P < 0.05$

Figura 6. PESOS ABSOLUTOS (mg) Y RELATIVOS (mg/g de peso corporal) DEL TIMO, EL BAZO Y LAS GLANDULAS SUBMANDIBULARES DE RATONES MEMBRAS et/• (•) y et/et (○) A DIFERENTES EDADES



* P < 0,05

Figura 7. PESOS ABSOLUTOS (mg) Y RELATIVOS (mg/g de peso corporal) DEL TIMO, EL BAZO Y LAS GLANDULAS SUBMANDIBULARES DE RATONES MACHOS *str/str* y *et/et* A DIFERENTES EDADES



* $P < 0.05$

mostraron un patrón de crecimiento inverso tan claro como las hembras, ya que en los animales adultos alopecicos, estos organos son siempre de mayor peso que los de los ratones normales (Tabla 4, Figura 7).

El análisis histológico de los timos de los ratones adultos et/et mostro que los machos poseen un rudimento tímico, mientras que las hembras et/et presentaron una estructura con características histológicas semejantes a las de un ganglio linfático (Figura 8).

Los resultados del peso de las hipófisis de ratones machos y hembras et/et no mostraron un patrón definido en comparación con sus hermanos con pelo (Tablas 3 y 4).

El peso de las adrenales de las hembras et/et fue mayor que el de las normales a los 15 y 150 días. En los machos, el peso de las adrenales de los ratones et/et fue similar al de los normales desde los 5 hasta los 30 días, pero en el animal adulto fueron significativamente mayores. Los pesos relativos mostraron que las adrenales de las hembras et/et siempre fueron más grandes que las de las et/+ y en los machos este incremento se observó a partir de los 20 días y se hizo significativo a partir de los 30 días (Tabla 5, Figura 9).

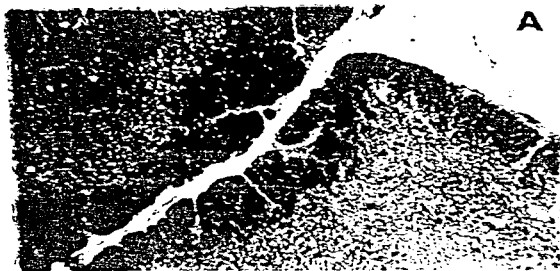


Figura 1. Corte histológico de un tubo de salida de la hembra (A) y hembras de *Phaenocarpa*. En el tubo de la hembra se distinguen la zona ventral y la zona característica de este órgano. El tipo de las hembras presenta nodulos linfoides y tejido intermedular semejantes a los de los ganglios linfáticos. (hematoxilina-eosina 100 X)

Tabla 5. Media \pm e.e.m. del peso de las adrenales (mg) de ratones hembras y machos et/+ y et/et a diferentes edades.

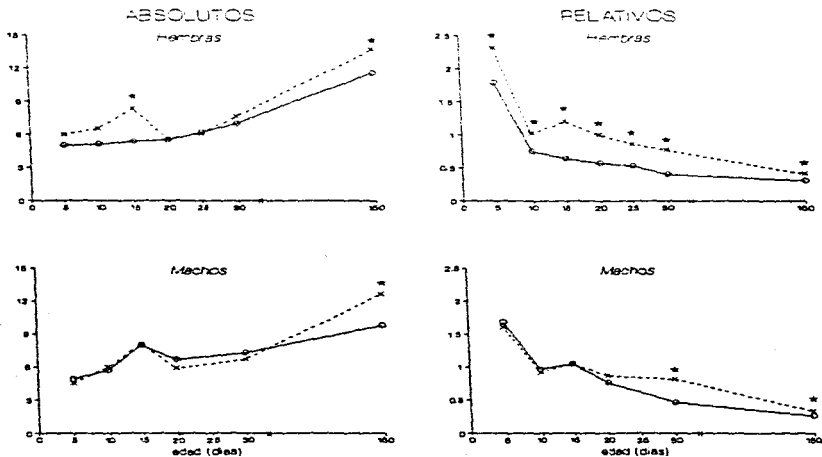
EDAD (días)	HEMBRAS		MACHOS	
	et/+	et/et	et/+	et/et
5	5.0 \pm 0.5	6.0 \pm 1.0	4.9 \pm 0.5	4.5 \pm 0.6
10	5.1 \pm 0.4	6.5 \pm 0.6	5.7 \pm 0.4	6.0 \pm 0.6
15	5.4 \pm 0.2	8.4 \pm 0.7*	8.0 \pm 0.3	8.1 \pm 0.6
20	5.8 \pm 0.4	5.6 \pm 0.3	6.7 \pm 0.4	5.9 \pm 0.2
25	6.2 \pm 0.5	6.1 \pm 0.4	7.3 \pm 0.4	6.7 \pm 0.5
30	7.0 \pm 0.5	7.6 \pm 0.4	---	---
150	11.6 \pm 0.4	13.7 \pm 0.6*	9.8 \pm 0.4	12.6 \pm 0.7*

*. P<0.05 vs ratones et/+ del mismo sexo (ANDEVA seguido de la prueba de Duncan).
n=10 (5-30 días); n=32-48 (150 días)

Ritmo circádico de la función adrenal en ratones hembras y machos adultos normales y et/et

En la tabla 6 se muestran los resultados agrupados de las concentraciones de colesterol en las adrenales y de corticosterona en el suero de ratones machos y hembras adultos normales y alopecicos, independientemente de la hora del día en la que fueron autopsiados. Se observa que las concentraciones de colesterol en las adrenales fueron menores en los machos et/et que en los normales, mientras que en las hembras no hubo diferencias. Las concentraciones séricas de corticosterona fueron mayores en los machos y hembras et/et que en los ratones normales.

Figura 9. PESOS ABSOLUTOS (mg) Y RELATIVOS (mg/g de peso corporal) DE LAS ADRENALES DE RATONES HEMBRAS Y MACHOS *et/et* y *et/e* A DIFERENTES EDADES



* $P < 0.05$

Tabla 6. Media \pm e.e.m. de las concentraciones de colesterol en las adrenales y de corticosterona en el suero de ratones machos y hembras adultos CD1 y et/et.

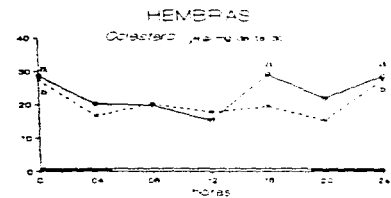
GRUPO	n	COLESTEROL (μ g/EG de tejido)	CORTICOSTERONA ng/ml de suero
Machos			
CD1	32	27.9 \pm 1.7	38.0 \pm 3.3
et/et	48	12.1 \pm 1.6a	59.5 \pm 5.9a
Hembras			
CD1	48	22.6 \pm 1.3a	35.3 \pm 4.4
et/et	48	19.6 \pm 1.0b	51.7 \pm 6.2c

Análisis estadístico: prueba de ANDEVA seguido de la prueba de Duncan.

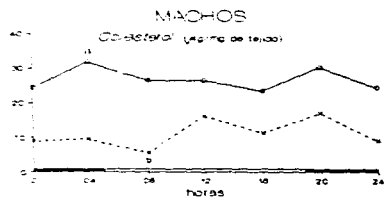
- a. P<0.05 vs machos CD1
- b. P<0.05 vs machos et/et
- c. P<0.05 vs hembras CD1

En las adrenales de las hembras y machos normales y et/et, las concentraciones de colesterol presentaron un ritmo circádico. El patrón de ciclicidad fue diferente entre hembras y machos. Las concentraciones séricas de corticosterona en las hembras normales y atímicas presentaron un ritmo circádico similar. En los machos normales e hipotímicos también se observó un ritmo pero con un patrón de ciclicidad inverso (Figura 10).

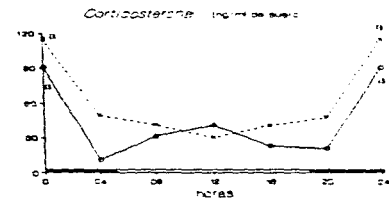
Figura 10. VARIACIONES CIRCADICAS DE LAS CONCENTRACIONES DE COLESTEROL EN LAS ADRENALES Y DE CORTICOSTERONA EN EL SUERO DE RATONES HEMBRAS Y MACHOS ADULTOS CD1 (+/+) y et/et (-/-)



a. $P < 0.05$ vs 12 h del mismo grupo
 b. $P < 0.05$ vs 20 h del mismo grupo

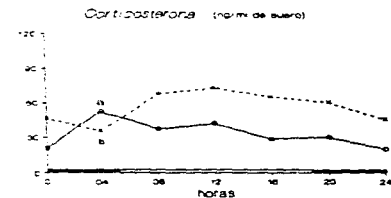


a. $P < 0.05$ vs 12 h del mismo grupo
 b. $P < 0.05$ vs 12 y 20 h del mismo grupo



a. $P < 0.05$ vs todas las horas del mismo grupo
 b. $P < 0.05$ vs 12 h del mismo grupo

— Luz-obscuridad

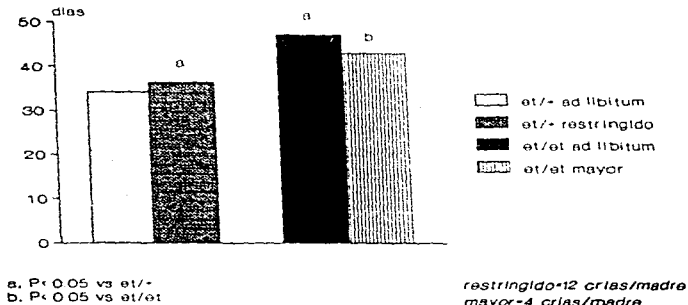


a. $P < 0.05$ vs 24 h del mismo grupo
 b. $P < 0.05$ vs 12 h del mismo grupo

Pubertad espontánea e inducida en ratones hembra normales y alopecidos et/et y su respuesta a la desnervación noradrenérgica periférica.

La pubertad, evaluada por la edad de la apertura vaginal, de las hembras et/et estuvo retrasada en comparación con las hembras normales (7 crias por madre durante la lactancia). Cuando los animales et/et se mantuvieron en casadas de 4 ratones por madre y las et/+ de 12, las hembras normales presentaron retardo en la edad de la apertura vaginal, mientras que en las hembras et/et el retardo fue menor que el observado en condiciones ad libitum (Figura 11).

Figura.11 EDAD DE LA APERTURA VAGINAL EN RATONES et/+ y et/et CON DIFERENTES CONDICIONES DE ACCESO AL ALIMENTO MATERNO



La desnervación periférica inducida por la administración de guanetidina, provocó el adelanto significativo de la edad de la apertura vaginal espontánea en las hembras et/et y no la modificó en las et/+. En cambio, la edad del primer estro se retrasó en ambos grupos desnervados. La desnervación no modificó la tasa de animales ovulantes (Tabla 7). No se observaron diferencias significativas en los pesos de los ovarios y del útero de los animales con desnervación periférica respecto a su testigo.

Tabla 7. Media \pm e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (AV), del primer estro vaginal y del número de ovocitos y tasa de animales ovulantes de ratones et/+ y et/et sin tratamiento (TA) y desnervados con guanetidina (20 mg/Kg) desde el nacimiento, autopsiados en el día del primer estro vaginal.

GRUPO	EDAD AV	PRIMER ESTRO *	NUMERO DE OVOCITOS	TASA DE ANIMALES OVULANTES
et/+				
TA	28.7 \pm 0.7	6.3 \pm 0.9	14	1/22
Desnervado	28.4 \pm 1.3	10.7 \pm 1.4a	9.0 \pm 1.4	4/25
et/et				
TA	39.5 \pm 0.7b	4.0 \pm 2.0	9.11	2/18
Desnervado	32.6 \pm 2.4a	16.6 \pm 3.8a	0	0/17

* días posteriores a la AV

Análisis estadístico: prueba de ANDEVA seguido de la prueba de Duncan.

a. P<0.05 vs TA correspondiente

b. P<0.05 vs et/+

La administración de PMSG provocó adelanto de la pubertad, la cual se presentó alrededor de las 72 h después de la inyección de la hormona, y del primer estro vaginal en todos los grupos tratados. En las hembras normales et/+ de 20 días, la administración de PMSG indujo la ovulación en 2 de 9 animales, mientras que todos los ratones tratados a los 25 días ovularon. En los animales et/et de 30 días, el mismo tratamiento no indujo la ovulación, pero en los animales de 35 días, la administración de PMSG provocó la ovulación en 4 de 11 animales (Tabla 8).

En los animales de 25 (et/+) y de 30 (et/et) días, la administración de la PMSG indujo aumento del peso de los ovarios, mientras que el peso del útero se incrementó en todos los grupos tratados excepto en las hembras desnudas de 35 días (Tabla 8).

En los animales et/+ de 15 días, la administración secuencial de gonadotropinas indujo la ovulación en 5 de 8 animales, mientras que todos los tratados a los 20 días ovularon. En los animales atímicos, la administración de PMSG + hCG indujo la ovulación en los animales de 30 días y no así en los de 25. El número de ovocitos liberados fue menor que el de las hembras normales. El peso de los ovarios y del útero aumentó en todos los animales tratados excepto los ovarios de los et/et de 25 días (Tabla 9).

Tabla 8. Tasa de animales ovulantes y media \pm e.e.m. del número de ovocitos, del peso de los ovarios y del útero de ratones et/+ y et/et sin tratamiento (TA) y tratados con 5 u.i. de PMSG a los 20, 25 (et/+), 30 y 35 (et/et) días de edad.

GRUPO	TASA DE ANIMALES OVULANTES	NUMERO DE OVOCITOS	OVARIOS (mg/10 g peso corporal)	UTERO
et/+				
20 días				
TA	0/9	0	7.0 \pm 1.1	13.1 \pm 1.1
PMSG	2/9	6.1	8.3 \pm 0.9	33.0 \pm 3.7a
25 días				
TA	0/9	0	5.0 \pm 0.4	10.7 \pm 1.0
PMSG	9/9b	10.3 \pm 1.9	6.6 \pm 0.5a	31.8 \pm 2.6a
et/et				
30 días				
TA	0/8	0	3.0 \pm 0.4	6.3 \pm 1.0
PMSG	0/9	0	5.1 \pm 0.5a	34.2 \pm 1.4a
35 días				
TA	0/7	0	6.7 \pm 1.2	21.9 \pm 2.4
PMSG	4/11	8.0 \pm 1.4	4.9 \pm 0.6	29.2 \pm 2.9

a. $P < 0.05$ vs TA correspondiente (ANDEVA seguido de la prueba de Duncan).

b. $P < 0.05$ vs TA correspondiente (prueba exacta de Fisher).

Tabla 9. Tasa de animales ovulantes y media \pm e.e.m. del número de ovocitos, del peso de los ovarios y del útero de ratones et/+ y et/et sin tratamiento (TA) y tratados con 5 u.i. de PMSG + 3 u.i. de hCG a los 16, 20 (et/+), 25 y 30 (et/et) días de edad.

GRUPO	TASA DE ANIMALES OVULANTES	NUMERO DE OVOCITOS	OVARIOS (mg/10 g peso corporal)	UTERO
----- et/+ -----				
16 días				
TA	0/9	0	5.4 \pm 0.5	11.1 \pm 0.9
PMSG + hCG	5/8a	18.4 \pm 2.2	10.1 \pm 0.6b	37.9 \pm 4.8b
20 días				
TA	0/9	0	7.0 \pm 1.1	13.1 \pm 1.1
PMSG + hCG	8/8a	14.3 \pm 2.6	11.8 \pm 1.0b	29.4 \pm 1.8b
----- et/et -----				
25 días				
TA	0/9	0	9.9 \pm 0.5	15.5 \pm 1.6
PMSG + hCG	0/8	0	7.2 \pm 1.3	46.1 \pm 3.5b
30 días				
TA	0/7	0	3.0 \pm 0.4	6.3 \pm 1.0
PMSG + hCG	7/11a	8.0 \pm 1.2c	6.7 \pm 1.1b	23.5 \pm 1.6b

a. $P < 0.05$ vs TA correspondiente (prueba exacta de Fisher).
Análisis estadístico: prueba de ANDEVA seguido de la prueba de Duncan.

b. $P < 0.05$ vs TA correspondiente

c. $P < 0.05$ vs et/+ de 16 y 20 días con PMSG+hCG.

En los animales normales de 16 días, con desnervación noradrenergica periférica desde el nacimiento, la administración de PMSG indujo la ovulación, lo que no se observó en los animales atímicos de 30 días tratados con guanetidina y estimulados con PMSG (Tabla 10).

Tabla 10. Tasa de animales ovulantes y media \pm e.e.m. del número de ovocitos, del peso de los ovarios y del útero de ratones et/+ y et/et sin tratamiento (TA) y desnervados con guanetidina desde el nacimiento y sin desnervar, tratados con 5 u.i. de PMSG a los 16 (et/+) y 30 (et/et) días de edad.

GRUPO	TASA DE ANIMALES OVULANTES	NUMERO DE OVOCITOS	OVARIOS (mg/10 g peso corporal)	UTERO

et/+				

16 días				
TA	0/9	0	5.4 \pm 0.5	11.1 \pm 0.9
Desnervado	0/9	0	8.0 \pm 0.4a	16.6 \pm 0.6a
PMSG	0/9	0	10.5 \pm 0.8ab	56.2 \pm 3.9ab
Desnervado +PMSG	6/8d	10.8 \pm 2.3	10.4 \pm 0.7b	39.5 \pm 2.3bc

et/et				

30 días				
TA	0/8	0	3.0 \pm 0.4	6.3 \pm 1.0
Desnervado	0/9	0	7.2 \pm 0.6a	12.5 \pm 1.0a
PMSG	0/9	0	5.1 \pm 0.5ab	34.2 \pm 1.4ab
Desnervado +PMSG	0/9	0	5.8 \pm 0.9	28.3 \pm 3.7b

Análisis estadístico: prueba de ANDEVA seguido de la prueba de Duncan.

- a, P<0.05 vs TA correspondiente; b, P<0.05 vs desnervado;
 c, P<0.05 vs PMSG.
 d, P<0.05 vs todos los grupos (prueba exacta de Fisher).

El peso de los ovarios y el útero de los animales desnervados fue mayor que el de los animales testigo. En cambio, el peso del útero fue menor en los ratones desnervados tratados con PMSG que en los no desnervados sometidos al mismo tratamiento. No se observaron diferencias en el peso de los ovarios de estos últimos (Tabla 10).

Ritmo circádico de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados de ratones hembras y machos adultos normales y et/et.

En la prueba se sabe que se realizó para evaluar la actividad motora de hembras y machos normales e hipotímicos, no se observaron diferencias entre las hembras CD1 y et/et (88.1 ± 2.3 vs 84.3 ± 2.2 movimientos de las extremidades/30 seg. NS). En cambio, los machos normales mostraron mayor número de movimientos que los et/et (92.1 ± 3.2 vs 82.9 ± 2.6 , $P < 0.05$). No se observaron diferencias sexuales.

El peso del cerebelo de los ratones et/et adultos fue menor que el de los animales normales (hembras: 65.8 ± 1.1 vs 69.4 ± 1.1 mg, $P < 0.05$; machos: 58.4 ± 1.3 vs 68.2 ± 1.4 mg, $P < 0.05$). Solo se observaron diferencias sexuales en el peso del cerebelo de los ratones et/et (58.4 ± 1.3 vs 65.8 ± 1.1 mg, $P < 0.05$).

No se observaron diferencias significativas en la concentración de proteína en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados de hembras y machos CD1 y et/et.

Los resultados de la actividad de la AChE en las tres estructuras se presentan en la tabla 11. La actividad de la enzima AChE (expresada en nmol de sustrato hidrolizado/min/mg de tejido) del hipotálamo y el cerebelo de los ratones CD1 y et/et y de los cuerpos estriados de los ratones et/et presentó diferencias sexuales.

Tabla 11. Media \pm e.c.m. de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (nmol/min/mg de tejido) en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados de ratones machos y hembras adultos CD1 y et/et.

GRUPO	n	HIPOTALAMO	CEREBELO	CUERPOS ESTRIADOS
Machos				
CD1	40	17.4 \pm 0.5	5.1 \pm 0.2	39.4 \pm 2.1
et/et	48	7.2 \pm 0.3a	3.7 \pm 0.1a	25.9 \pm 1.9a
Hembras				
CD1	48	11.3 \pm 0.4a	4.4 \pm 0.1a	38.6 \pm 1.2
et/et	48	12.7 \pm 0.3bc	5.0 \pm 0.1bc	43.9 \pm 1.7bc

Análisis estadístico: prueba de ANDEVA seguido de la prueba de Duncan.

a. P<0.05 vs machos CD1; b. P<0.05 vs machos et/et; c. P<0.05 vs hembras CD1

La actividad enzimática en el hipotálamo y el cerebelo de los ratones CD1 fue mayor en los machos que en las hembras, mientras que en los ratones atímicos los resultados de la actividad fueron inversos.

En los machos et/et la actividad de la AChE en las tres estructuras fue más baja que en los animales normales, mientras que en las hembras et/et, la actividad enzimática fue mayor que en las normales.

En el hipotálamo y el cerebelo de los machos normales, la actividad AChE fue mayor durante la fase de luz, diferencias que no se observaron en las hembras CD1, ni en los animales et/et de ambos sexos (Tabla 12).

Tabla 12. Media \pm e.c.m. de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (nmol/min/mg de tejido) en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados de ratones machos y hembras adultos CD1 y et/et, durante las fases de luz y obscuridad.

GRUPO	n	HIPOTALAMO	DEFEBELO	CUERPOS ESTRIADOS
Machos				
CD1				
luz	20	18.8 \pm 0.2	5.6 \pm 0.3	37.8 \pm 0.7
obscuridad	20	16.1 \pm 0.5*	4.6 \pm 0.2*	41.0 \pm 0.3
et/et				
luz	24	6.7 \pm 0.4	3.4 \pm 0.2	22.6 \pm 2.7
obscuridad	24	7.8 \pm 0.8	4.0 \pm 0.2	29.5 \pm 2.5
Hembras				
CD1				
luz	24	11.1 \pm 0.9	4.3 \pm 0.1	41.3 \pm 1.5
obscuridad	24	10.7 \pm 0.6	4.4 \pm 0.2	35.9 \pm 1.7*
et/et				
luz	24	12.8 \pm 0.5	4.9 \pm 0.1	46.3 \pm 2.5
obscuridad	24	12.6 \pm 0.4	5.0 \pm 0.1	41.5 \pm 2.1

*. P<0.05 vs fase de luz del mismo grupo (ANDEVA seguido de la prueba de Duncan).

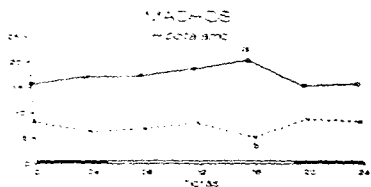
La actividad de la enzima AChE en el hipotálamo y el cerebelo de las hembras normales y et/et no presentó variaciones circádicas, mientras que en los cuerpos estriados de las hembras alopecicas se observó un ritmo circádico, donde la actividad mas elevada se presentó durante la fase de luz. La actividad enzimática del hipotálamo, el cerebelo y el cuerpo estriado de los machos normales y et/et presentaron variaciones circádicas. En los animales CD1, los valores mas altos se observaron en la fase de luz, mientras que en los machos hipotimicos estos fueron durante la fase de obscuridad (Figura 12).

Respuesta de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados de ratones macho adultos normales y et/et a la castración y la hemicastración.

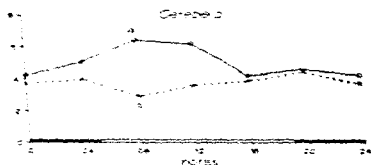
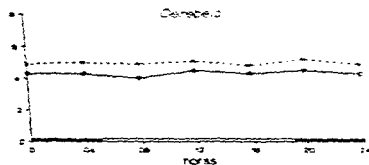
El estrés quirúrgico no modificó las concentraciones de proteína en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados de los ratones CD1. Tanto la castración como la hemicastración provocaron disminución en la concentración de proteína en las tres estructuras, pero los cambios en el cerebelo y los cuerpos estriados inducidos por la hemicastración dependieron del testículo extirpado (Tabla 13).

En cambio, en los machos et/et, la concentración de proteína en en las tres estructuras aumento con el estrés quirúrgico. En el hipotálamo este incremento fue mayor por

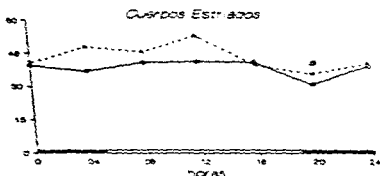
Figura 12. VARIACIONES CIRCADICAS DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA AChE EN EL HÍPOTÁLAMO, EL CEREBELO Y LOS CUERPOS ESTRAZOS DE RATONES HEMBRAS Y MACHOS ADULTOS CD1 (24 h) y et/et (24 h)



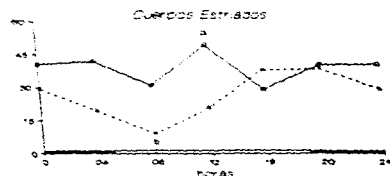
a: P < 0.05 vs 04 y 16 h de mismo grupo
b: P < 0.05 vs 16 h de otro grupo



a: P < 0.05 vs 04 y 16 h de mismo grupo
b: P < 0.05 vs 08 h de otro grupo



a: P < 0.05 vs 04 y 16 h de mismo grupo



a: P < 0.05 vs 04 y 16 h de mismo grupo
b: P < 0.05 vs 08 h de mismo grupo

— actividad

efectos de la castración, mientras que en el cerebelo disminuyo significativamente (Tabla 13).

Tabla 13. Media \pm e.e.m. de la concentración de proteína ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido) en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados de ratones machos adultos CDI y et/et, enteros (TA), con operación simulada (OS), castrados (CAS) y hemicastrados del testículo izquierdo (HI) o del derecho (HD), autopsiados 20 días después de las intervenciones.

GRUPO	n	HIPOTALAMO	CEREBELO	CUERPOS ESTRIADOS
CDI				
TA	10	75.2 \pm 5.9	102.3 \pm 3.9	94.5 \pm 5.2
OS	10	81.5 \pm 6.3	96.7 \pm 5.7	80.6 \pm 6.3
CAS	11	29.7 \pm 3.1a	62.4 \pm 2.6a	49.3 \pm 4.0a
HI	10	41.9 \pm 3.6a	99.5 \pm 4.3	54.3 \pm 4.3a
HD	10	49.2 \pm 5.3a	62.6 \pm 1.9a	77.6 \pm 4.7
et/et				
TA	10	37.4 \pm 4.9	46.0 \pm 1.4	31.4 \pm 5.1
OS	7	53.5 \pm 5.0b	95.3 \pm 3.6b	85.7 \pm 6.8b
CAS	8	73.1 \pm 6.3a	82.7 \pm 2.7a	80.3 \pm 7.3
HI	8	51.7 \pm 6.8	79.8 \pm 4.7a	72.2 \pm 8.0
HD	9	47.5 \pm 6.1	72.8 \pm 4.4a	57.9 \pm 5.9a

Análisis estadístico: prueba de ANDEVA seguido de la prueba de Duncan.

- a. P<0.05 vs OS correspondiente
b. P<0.05 vs TA correspondiente

En los ratones et/et, la hemicastración provocó disminución de la concentración de proteína en el cerebelo, que no dependió del testículo extirpado. En cambio, en los

cuerpos estriados, este efecto se observó al extirpar el testículo derecho. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de proteína en las tres estructuras entre la hemicastración izquierda y la derecha (Tabla 13).

En los ratones normales, la operación simulada provocó disminución de la actividad de la enzima AChE (nmol/min/mg de tejido) en las tres estructuras en estudio (Tabla 14).

Tabla 14. Media \pm e.e.m. de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (nmol/min/mg de tejido) en el hipotálamo, el cerebelo y los cuerpos estriados de ratones machos adultos CD1 y et/et, enteros (TA), con operación simulada (OS), castrados (CAS) y hemicastrados del testículo izquierdo (HI) o del derecho (HD), autopsiados 20 días después de las intervenciones.

GRUPO	n	HIPOTALAMO	CEREBELO	CUERPOS ESTRIADOS
CD1				
TA	10	19.8 \pm 1.0	6.2 \pm 0.3	49.4 \pm 3.4
OS	10	8.4 \pm 0.5a	3.9 \pm 0.2a	38.3 \pm 2.4a
CAS	11	9.6 \pm 0.5	4.9 \pm 0.2b	45.4 \pm 2.5
HI	10	7.8 \pm 0.7	4.1 \pm 0.2	31.9 \pm 2.8
HD	10	9.8 \pm 1.0	4.4 \pm 0.2	39.1 \pm 2.7
et/et				
TA	10	8.1 \pm 0.7	3.6 \pm 0.3	20.9 \pm 2.1
OS	7	14.1 \pm 2.2a	6.4 \pm 0.5a	54.5 \pm 5.8a
CAS	8	9.9 \pm 1.2	4.6 \pm 0.1b	45.3 \pm 5.5
HI	8	14.2 \pm 2.5	5.7 \pm 0.5	41.1 \pm 5.0
HD	9	9.8 \pm 1.1	5.0 \pm 0.2b	42.9 \pm 2.9

Análisis estadístico: prueba de ANDEVA seguido de la prueba de Duncan.

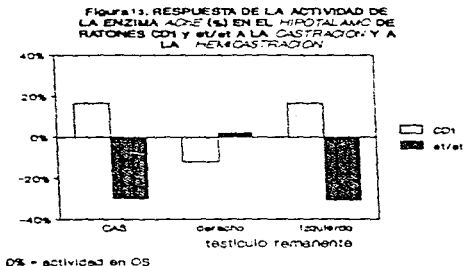
a. $P < 0.05$ vs TA correspondiente;

b. $P < 0.05$ vs OS correspondiente

En comparación con los efectos del estrés quirúrgico, la actividad enzimática del cerebelo aumento en los animales normales castrados (Tabla 14).

En los ratones hipotimicos, la actividad enzimática de las tres estructuras aumentó por efectos del estrés quirúrgico. La castración y la extirpación del testículo derecho disminuyeron la actividad AChE del cerebelo. La actividad enzimática en las tres estructuras fue similar entre los ratones con hemicastración izquierda o derecha (Tabla 14).

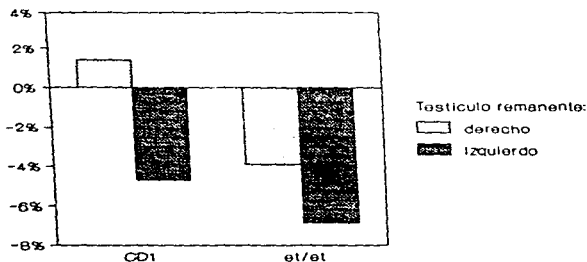
En el análisis de los resultados de la actividad de la AChE en el hipotálamo en función de los obtenidos en la operación simulada, se observó que tanto en el ratón CD1 como en el alopecico la actividad se modifica en forma similar con la castración y en presencia del testículo izquierdo pero con un patrón inverso entre ambos tipos de animales (Figura 13).



Respuesta del peso del timo a la castración y la hemicastración en ratones macho adultos normales y et/et.

No se observaron diferencias significativas en el peso de los testículos de los animales normales y et/et hemicastrados. Sin embargo, en los ratones CD1 cuando se extirpó el testículo derecho, el peso del izquierdo mostró una tendencia a la disminución, mientras que cuando se extirpó el testículo izquierdo, el derecho mostró una tendencia al aumento. En cambio, en los ratones et/et ambos testículos tendieron a disminuir de peso (Figura 14).

Figura 14. RESPUESTA PONDERAL (%) DEL TESTICULO DERECHO e IZQUIERDO DE RATONES CD1 y et/et A LA HEMICASTRACION



El estrés quirúrgico provocó disminución del peso del timo en ambos grupos de animales, aunque en los et/et las diferencias no fueron significativas (51.9 ± 4.1 vs 35.0 ± 2.6 , $P < 0.05$; 28.6 ± 3.2 vs 21.9 ± 2.5 , NS). En comparación con los efectos del estrés quirúrgico, la castración no provocó cambios significativos en el peso del timo de los ratones CD1 y et/et, aunque en el timo de los animales normales se observó una tendencia al aumento de peso, mientras que en los ratones et/et esta fue a la disminución. (Tabla 15, Figura 15).

Tabla 15. Media \pm e.e.m. del peso de las adrenales y del timo de ratones machos adultos CD1 y et/et, con operación simulada (OS), castrados (CAS) y hemicastrados del testículo izquierdo (HI) o del derecho (HD), autopsiados 20 días después de las intervenciones.

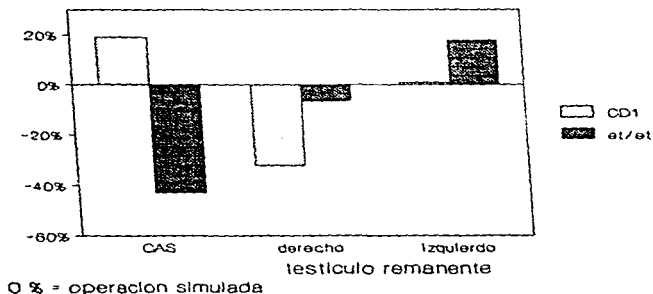
GRUPO	n	ADRENALES	TIMO
CD1			
OS	10	9.1 ± 0.7	35.0 ± 2.6
CAS	11	8.7 ± 0.7	41.7 ± 4.6
HI	10	8.6 ± 0.4	$23.8 \pm 2.4a$
HD	10	9.3 ± 1.0	35.4 ± 2.0
et/et			
OS	7	11.0 ± 1.0	21.9 ± 2.5
CAS	8	12.3 ± 0.9	$12.5 \pm 1.9b$
HI	8	13.4 ± 1.4	20.5 ± 5.4
HD	9	$9.6 \pm 0.8c$	25.8 ± 4.3

Análisis estadístico: prueba de ANDEVA seguido de la prueba de Duncan.

a, $P < 0.05$ vs todos los grupos correspondientes; b, $P < 0.05$ vs HD; c, $P < 0.05$ vs HI

La hemicastración izquierda indujo un descenso significativo del peso del timo de los animales normales y no tuvo efectos cuando se realizó en los et/et. La hemicastración derecha provocó cambios en los hipotímicos pero no así en el timo de los ratones normales (Tabla 15, Figura 15).

Figura 15. RESPUESTA PONDERAL (%) DEL TIMO DE RATONES CD1 y et/et A LA CASTRACION Y A LA HEMICASTRACION



El peso de las adrenales de los animales CD1 no se modificó con ninguna de las intervenciones realizadas. Las adrenales de los ratones et/et siempre fueron más grandes que las de los normales con excepción de los animales con hemicastración derecha (Tabla 15).

DISCUSION

El raton mutante et/et apareció espontáneamente en una colonia cerrada de ratones albinos CD1. Estos mutantes alopecicos se distinguen de los ratones normales al nacimiento por la ausencia de vibrisas.

Los resultados obtenidos de las frecuencias de animales con pelo y desnudos a lo largo de varias generaciones, muestran que la alopecia de los ratones et/et es una mutación autosómica recesiva. El hecho que la proporción fenotípica observada de 1:1 en las retrocruzadas de animales de la F₁ (et/+) con el progenitor alopecico et/et haya sido igual a la esperada apoyan este resultado.

El analisis cromosómico mostro que este mutante no presenta aberraciones numericas ni estructurales que involucren al centromero.

Todos los ratones et/et presentaron un organo linfoide ubicado en la región que ocupa el timo. Los machos et/et presentaron un organo con las características histológicas de un timo pero de menor tamaño que el timo de los animales normales, por lo que se les consideró hipotímicos. En las hembras, el organo mostro las características de un ganglio linfático estimulado, por lo que se le consideró como un animal atímico. Estos hechos son semejantes a los descritos previamente en algunos animales

nu/nu de ambos sexos, en los cuales se describe la presencia de un nódulo linfático o rudimento linfoepitelial (34, 35, 57). El dimorfismo sexual que presenta el timo de los ratones et/et probablemente es el responsable de las diferencias observadas en la fertilidad y los ritmos circádicos, sin descartar la posibilidad de que el desarrollo de este órgano se encuentre influido por el ambiente hormonal como sucede en el timo normal por la presencia de receptores a esteroides en dicho órgano (54, 78).

El mutante et/et presenta una serie de características similares a las del nu/nu, aunque algunas de las vinculadas con la función reproductora son diferentes (70, 71, 72, 73). En el Cuadro 1 se resumen estas características y se les compara con las de los ratones normales homocigotos (CD1) y heterocigotos (et/+) y con las descritas para el mutante nu/nu (6, 23, 34, 35, 61, 65, 66). Los ratones heterocigotos et/+ no mostraron diferencias significativas respecto a los animales +/- en las características descritas en este estudio, por lo que se les considero normales y se utilizaron ambos como grupo testigo.

El hecho de que los ratones et/et sobrevivan en las condiciones estándar del bioterio, a diferencia de otras cepas de animales atímicos o con deficiencias en el desarrollo de este órgano, que por ser inmunodeficientes requieren de condiciones de mantenimiento libres de patógenos

Cuadro 1. CARACTERISTICAS DE LOS RATONES et/et Y SU COMPARACION CON LAS DE LOS RATONES NORMALES (CD1 y et/+) Y LAS DESCRITAS EN LOS RATONES nu/nu.

Genotipo	CD1 +/+ portadores et/+	et/et	nu/nu
Fenotipo	normal	alopecico	alopecico
Número cromosómico	40	40	- - -
Tipo	normal	♀ atímicas ♂ hipotímicos	atímica o hipotímica
Crecimiento corporal	normal	♀ menor ♂ retardado	menor
Condiciones de mantenimiento	*C	*C	**LPE
Supervivencia al destete en camadas puras	100%	80%	*C 0% **LPE 50%
Longevidad	3 años	2 años	*C 2-4 meses **LPE 6-10 meses
Fertilidad ♀	94.6%	94.9%	*C 9-24% **LPE 98%
Fertilidad ♂	100%	99%	*C 24-66% **LPE 94%
Periodo de gestación	20 días	20 días	- - -
No. de crías por parición	10.4±0.4	10.4±0.7	*C 7 **LPE 6
Pubertad (días)	28.7±0.7	39.5±0.7	*C 45.8±0.9 **LPE 48.0±1.6
Ciclos estrales	irregulares	irregulares	irregulares
Respuesta a heteroinjertos de piel	rechazo	rechazo	aceptación

* convencional
** libre de patógenos específicos

especificos (18): que la mayoria de los animales et/et rebasen el año de vida y que rechacen los injertos de piel hacen suponer la existencia de algún mecanismo de defensa inmunologica independiente del timo o bien, que el órgano presente en los animales et/et no es hipofuncionante en cuanto a la capacidad inmunológica.

Los ratones et/et son mas debiles que los animales con pelo, pese que al nacimiento no se observan diferencias significativas en el peso corporal. En las camadas mixtas esta debilidad los pone en desventaja por el alimento materno, frente a sus hermanos heterocigotos, por lo que la tasa de mortalidad fue muy alta durante las 2 primeras semanas de vida no llegando la mayoria al periodo del destete. Esta interpretación es apoyada por el hecho de que la supervivencia de los ratones et/et se incrementó notablemente al separarlos desde el nacimiento de las crías con pelo. Sin embargo, la curva de crecimiento corporal indica que su desarrollo es deficiente siendo este más marcado en las hembras atímicas que en los machos hipotímicos. Un hecho semejante ha sido observado en los ratones nu/nu, lo que ha sido atribuido a una deficiencia en la maduración neuroendocrina (60).

El análisis cronológico del peso del timo de los ratones normales y et/et, mostró un patrón de desarrollo diferente entre ambos tipos de animales. El órgano de los

ratones et/et, además de alcanzar un menor peso, presenta una involución prematura.

El bazo, al igual que el timo, forma parte del sistema hematopoyético, y presenta zonas de proliferación celular dependientes del timo (68). Las diferencias observadas en el peso del bazo de los animales et/et respecto a los normales posiblemente se deba a deficiencias en esta función, aunque los pesos relativos muestran que este órgano es más grande en los mutantes et/et que en los normales. Este hecho apoyaría la idea de que en este mutante existe un sistema de compensación inmunológica. Sin embargo, resultados similares se han descrito en los ratones nu/nu que son considerados inmunodeficientes (56).

Con base en los pesos de las gonadas y de la próstata, se puede afirmar que los ratones machos et/et son hipogonádicos, desde antes de la pubertad, aunque su capacidad reproductora fue normal en los animales adultos. En cambio, en la hembras el peso de los ovarios es menor en los animales adultos, aunque su función endocrina evaluada por el peso del útero, sería normal. Excepto para el peso de los testículos de los animales adultos, estos patrones de crecimiento son similares a los descritos en los órganos de los ratones nu/nu, en los que se correlacionan con disminución en las concentraciones de gonadotropinas y de esteroides gonadales y con la baja fertilidad (66). En los

ratones et/et no se podría afirmar que sucede lo mismo, ya que su fertilidad es similar a la de los animales normales.

Al igual que en los ratones nu/nu las adrenales de los mutantes et/et son mayores que la de los animales normales y presentan altas concentraciones de corticoides en el suero (15, 61). En el mutante et/et estas últimas pueden ser el resultado de un constante estrés provocado por la falta de pelo, como son la irritación de la piel y la hipotermia. Los resultados observados en ratones normales con pelo y timectomizados al nacimiento, en los cuales las concentraciones de corticoides disminuyen significativamente (52), apoyan la idea de que la alopecia de los ratones et/et es la responsable de las levadas concentraciones de corticosteroides. Por otra parte, diversos estudios han mostrado que los corticoides inducen la involución del timo (37, 38), por lo que es probable que las altas concentraciones de corticosterona presentes en los ratones et/et sean en parte las responsables de su hipotimia o atimia.

Estudios realizados en adrenales de ratones nu/nu estimuladas in vitro con la hormona adrenocorticotrófica, mostraron que la biosíntesis de corticosterona es normal y atribuyen las variaciones observadas in vivo a una alteración en la regulación hipotalámica (15, 61). Los resultados del presente estudio muestran que existen diferencias sexuales en

el ritmo circádico de la corticosterona. El hecho de que las hembras et/et presenten un patrón del ritmo de corticosterona similar al de las hembras normales nos permite sugerir que en estos animales el eje hipotálamo-hipofisis-adrenal sería normal, mientras que la presencia de un hipotimo en los machos altera dicha ritmicidad. Estos hechos podrían estar relacionados con lo observado en primates sobre la participación del timo en la regulación de la diferenciación postnatal de la adrenal y con la actividad similar a la hormona liberadora de corticotropina que presentan algunos polipeptidos tímicos (31, 32). También se ha descrito que las adrenales ejercen un efecto inhibitorio sobre el timo que se manifiesta después del destete (36). Los resultados obtenidos hasta el momento, no permiten adelantar una explicación a estas diferencias.

La pubertad espontánea está retrasada en las hembras et/et, hecho semejante al observado en las hembras nu/nu y en las normales timectomizadas al nacimiento (6, 50, 65, 76). Este retraso en la edad de la apertura vaginal refleja una modificación de la secreción de estrógenos por el ovario, interpretación que es apoyada por el menor peso del útero de los animales prepúberes.

En el ratón adulto atímico nu/nu las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas y estradiol son menores que en el animal normal, la timectomía al nacimiento retrasa la

pubertad y el implante de timo o de tejido linfóide los restablece (6, 51, 52, 60, 64, 65, 67). En el animal atímico et/et, la capacidad del ovario para responder a las gonadotropinas es bajo comparado con el animal normal, tanto en el número de ovocitos liberados, como en el peso del ovario. Por lo tanto es posible que las bajas concentraciones de gonadotropinas circulantes en los animales atímicos reduce la reactividad del ovario a las mismas (65). Otra posibilidad sería que las elevadas concentraciones de corticoides disminuyan la secreción de las gonadotropinas, la reactividad del ovario a las mismas o ambos.

El hecho de que la pubertad, tanto de los animales normales como de los et/et se haya modificado con diferentes condiciones de alimentación durante la lactancia, sugiere que en la etapa prepúber, además de los mecanismos neuroendócrinos de regulación, también participan factores nutricionales.

El hecho que la desnervación noradrenérgica periférica haya provocado el adelanto de la edad de la apertura vaginal solo en los animales atímicos, sugiere que en estos animales, la inervación noradrenérgica regula de manera inhibitoria la esteroidogénesis del ovario, y al parecer no la afecta en los animales que presentan timo.

En cambio, en la regulación de la ovulación inducida por estimulación con PMSG, la participación de la

inervación noradrenergica del ovario parece ser opuesta en relacion a la presencia del timo o alteraciones de este, en comparacion con la regulacion de la esteroidogenesis. Asi, en los animales normales con desnervacion noradrenergica el tratamiento con PMSG indujo la ovulacion, hecho que no ocurrio en los atimicos. Por lo tanto, es posible pensar que en el raton prepuber normal, asi como en la rata adulta, la inervacion noradrenergica tiene un efecto inhibitorio sobre la reactividad del folículo a las gonadotropinas (17). No se puede descartar que los resultados obtenidos sean el reflejo de la accion desnervante de la guanetidina sobre la inervacion del timo (55), con la consecuente afectacion en la secrecion de polipeptidos, o que se haya afectado a las terminaciones noradrenergicas de la eminencia media, region que está fuera de la barrera hematoencefalica (45) o que sean la resultante de la alteracion de la inervacion catecolaminergica en todas las regiones antes mencionadas.

Las características en la actividad de AChE del hipotalamo de los ratones normales y et/et, concuerdan con las observadas en el hipotalamo de la rata, aunque existen diferencias sexuales interespecies y en las variaciones circádicas (11, 12, 48).

La actividad AChE disminuyo en el hipotálamo de los ratones normales sometidos a estrés, hecho que ha sido explicado con base en la relación entre la actividad AChE y

la actividad motora (48, 75), de tal forma que la menor actividad enzimática puede ser un reflejo de la disminución en la actividad motora que presentan los animales sujetos a una intervención quirúrgica.

En los machos, la actividad de la AChE en el hipotálamo parece estar relacionada con la presencia de las gonadas o la función de las mismas. En la rata macho, la actividad de la enzima disminuye por efectos de la castración y la hemicastración (48) y en el ratón et/et, que es hipogonádico e hipotímico, la actividad de la AChE también es menor que en el animal normal. Las diferencias observadas en la actividad de la enzima no estarían vinculadas a las elevadas concentraciones plasmáticas de corticosteroides presentes en los animales et/et, ya que estas también son elevadas en la hembra et/et pero la actividad de la enzima es mayor que en los animales normales.

Las variaciones circádicas de la actividad de la AChE parecen ser intrínsecas y no están vinculadas al ritmo circádico de las concentraciones plasmáticas de los corticoides.

Las diferencias observadas en la respuesta de la actividad AChE hipotalámica en los ratones CD1 con hemicastración izquierda o derecha sugieren la existencia de asimetría en los mecanismos de regulación periférica, tal como se ha sugerido que existe en el ovario (10, 11, 17).

Aunque la respuesta de la actividad AChE del hipotálamo de los ratones hipotímicos es distinta a la observada en los ratones normales, la asimetría en la respuesta del hipotálamo a la falta de un gonada se sigue manteniendo.

Tomando en consideración las divergencias observadas en la respuesta del peso del timo en los ratones normales y los et/et frente a las diversas condiciones experimentales, se puede sugerir que el hipotimo que presentan los et/et no es exclusivamente un "timo pequeño" o "rudimento tímico" como se describe (71), sino que se trataría de un timo con características funcionales distintas a las del timo normal, o bien que los mecanismos de regulación en ambos tipos de animales presentan variaciones. El hecho de que la respuesta del timo a la castración sea inversa entre los dos tipos de animales apoya la idea que los mecanismos de regulación del timo son disímiles en el ratón CD1 y el et/et.

En las relaciones funcionales del timo con los testículos también parece existir asimetría, al menos en la respuesta ponderal del órgano a la ausencia de un testículo. En experimentos agudos se ha mostrado que la capacidad de secreción de testosterona es mayor en el testículo derecho que en el izquierdo (24). En este caso, en el ratón normal hemicastrado, cuando la gonada derecha permaneció in situ, el peso del timo disminuyó de manera significativa, efecto que

no se produjo cuando el testículo izquierdo fue el remanente.

Con los resultados obtenidos hasta el presente no se puede afirmar que las diferencias observadas son reflejo de modificaciones en la capacidad secretora de ambos testículos, aunque dicha posibilidad no puede ser descartada. El hecho de que aun en ausencia de hipertrofia compensadora, el peso del testículo derecho auzente ligeramente y el del izquierdo disminuya, apoya parcialmente esta posibilidad. Estos resultados tambien permiten sugerir que la gonada derecha es mas sensible de reaccionar a los sistemas de regulacion compensadora que la izquierda, como ya ha sido descrito para la rata hemicastrada (10, 14, 17, 24). Nuevamente, el tipo de respuesta de los ratones hipotimicos fue diferente a la de los animales normales, y aunque ambos testiculos disminuyen de peso, el descenso fue mayor en el testiculo izquierdo.

CONCLUSIONES

- El ratón desnudo et/et porta una mutacion autosómica recesiva para el gen que regula el crecimiento normal del pelo.
- En los ratones desnudos et/et adultos, los machos presentan un timo pequeño (hipotímicos), mientras que las hembras presentan un ganglio linfático en la región del timo (¿atímicas?).
- Los ratones et/et no son inmunodeficientes ya que rechazan los aloinjertos de piel y viven en condiciones convencionales de bioterio.
- La fertilidad de los ratones desnudos et/et es normal.
- Existen diferencias sexuales en el ritmo circádico de corticosterona en los ratones normales y alopecicos et/et.
- La pubertad en las hembras atímicas et/et esta retardada.
- La capacidad esteroidogénica de los ovarios de las hembras et/et [evaluada por el peso del útero, la fertilidad, el adelanto de la edad de apertura vaginal al estímulo con gonadotropinas] parece ser similar a la de las hembras normales.
- La capacidad ovulatoria de las hembras atímicas prepúberes en respuesta al estímulo gonadotrópico es menor y retardada respecto a las hembras prepúberes normales.

- El papel de la inervación noradrenérgica periférica en la regulación de la pubertad y la primera ovulación depende parcialmente de la presencia del timo.
- La inervación noradrenérgica periférica regula de manera inhibitoria la acción de las gonadotropinas en el ovario del ratón prepúber normal.
- Los mecanismos de regulación neuroendócrina que vinculan al sistema colinérgico con los testículos y el timo, responden de manera diferente en el ratón mutante et/et que en el normal.
- La reactividad del timo de un animal normal y del hipotimo del ratón et/et a la falta de las hormonas testiculares es diferente.

BIBLIOGRAFIA

1. ABELL, L.L. (1952). Simplicity method for estimation of cholesterol total in serum and demonstration his specificity. *J. Biol. Chem.* 195, 357-366.
2. ABOUSSAQUIRA, T., MOUSTAFA, Y. y IDELMAN, S. (1989). Image analysis of cell proliferation in rat thymus throughout development. *Thymus* 12, 167-186.
3. AGUILERA, G. y ROMANO, M. (1989). Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells in vitro. *J. Endocrinol.* 123.
4. ANDERSON, R.H. y MONROE, C.W. (1962). Experimental study of the behavior of adult human skin homografts during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 84, 1096-1098.
5. BARDAWIL, W. A., MITCHELL, G. W., McKEOGH, R.P. y MARCHANT, D.J. (1962). Behavior of skin homografts in human pregnancy. I. Habitual abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 84, 1283-1286.
6. BESEDOVSKY, H.O. y SORKIN, E. (1974). Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* 249, 356-358.
7. BIANCHI, E., PIERPAOLI, W. y SORKIN, E. (1971). Cytological changes in the mouse anterior pituitary after neonatal thymectomy: a light and electron microscopical study. *J. Endocrin.* 51, 1-6.
8. BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-252.
9. CARTER, J. (1976). The effect of progesterone, oestradiol and hCG on cell-mediated immunity in pregnant mice. *J. Reprod. Fert.* 46, 211-216.
10. CRUZ, M.E., CHAVEZ, R. y DOMINGUEZ, R. (1986). Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *Rev. Invest. Clin.* 38, 167-171.
11. CRUZ, M.E., CHAVEZ, R., MARTINEZ, R. y DOMINGUEZ, R. (1987). Differences in the acute changes in acetylcholinesterase activity in several brain structures induced by bilateral or unilateral section of the vagi nerves in the adult male rat. *Med. Sci. Res.* 15, 1531-1532.
12. CRUZ, M.E., CHAVEZ, R., ROSAS, P., LUJAMBIO, V.M., MORAN, J.L. y DOMINGUEZ, R. (1990). Diurnal changes in hypothalamic acetylcholinesterase activity during the oestrous cycle of the rat. *Med. Sci. Res.* 18, 137-138.

13. CHAMBERS, S.P. y CLARKE, A.G. (1979). Measurement of thymus weight, lumbar node weight and progesterone levels in syngeneically pregnant, allogeneically pregnant, and pseudopregnant mice. *J. Reprod. Fert.* 55, 309-315.
14. CHAVEZ, R., CRUZ, M.E. y DOMINGUEZ, R. (1987). Differences in the ovulation rate of the right and left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effect of ipsi and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J. Endocrin.* 113, 397-401.
15. CHESNOKOVA, V.M., IVANOVA, L.N. y GRUNTENKO, E.V. (1983). Effect of the thymus on endocrine functions of the gonads and adrenals in mice. *Syull. Eksp. Biol. Med.* 96, 89-91.
16. DARDENNE, M., SAVINO, W., GAGNERAULT, M.C., ITOH, T. y BACH, J.F. (1989). Neuroendocrine control of thymic hormonal production. I. Prolactin stimulates *in vivo* and *in vitro* the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cells. *Endocrinology* 125, 3-12.
17. DOMINGUEZ, R., CRUZ, M.E. y CHAVEZ, R. (1989). Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: *Growth Factors and the Ovary*. A.N. Hirshfield Ed., Plenum Press, New York, 321-325 p.p.
18. EATON, G.J., OUTZEN, H.C., CUSTER, R.P. y JOHNSON, F.N. (1975). Husbandry of the "nude" mouse in conventional and gerafree environments. *Lab. An. Sci.* 25, 309-314.
19. ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V.N. y FEATHERSTONE, R.M. (1961). A new and rapid determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
20. ERICSSON-VIITANEN, S., RUGGIERI, S., NATALINI, P. y MORECKER, B.L. (1983). Thymosin beta-10, a new analog of thymosin beta-4 in mammalian tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 225, 407-413.
21. FITZJOHN, F.E. y SEBESTENY, A. (1978). The production of athymic nude (nu/nu) mice from homozygous parents. *J. Inst. An. Tech.* 29, 5-10.
22. FITZPATRICK, F.T.A., KENDALL, M.D., WHEELER, M.J., ADCOCK, I.M. y GREENSTEIN, B.D. (1985). Reappearance of thymus of ageing rats after orchidectomy. *J. Endocrin.* 106, R17-R19.
23. FLANAGAN, S.F. (1966). "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res. Camb.* 8, 295-309.
24. FRANKEL, A.I., CHAPMAN, J.C. y COOK, B. (1989). Testes are asymmetric in the testicular hemicastration response of the male rat. *J. Endocrin.* 122, 485-488.

25. GLICK, D., VON REDLICH, D. y LEVINE, S. (1964). Fluorometric determination of corticosterone and cortisol in 0.02-0.05 milliliters of plasma or submilligram samples of adrenal tissue. *Endocrinology* 74, 653-655.
26. GOLDSTEIN, A.L., LOW, T.L.K., THURMAN, G.B., ZATZ, M.M., HALL, N., CHEN, J., HU, S.K., NAYLOR, P.B. y McCLURE, J.E. (1981). Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland. *Recent Prog. Horm. Res.* 37, 369-415.
27. GOLDSTEIN, G. (1974). Isolation of bovine thymin: a polypeptide hormone of the thymus. *Nature* 247, 11-14.
28. GROSSMAN, C.J. (1984). Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Rev.* 5, 435-455.
29. GROSSMAN, C.J. (1995). Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* 227, 257-261.
30. HATTORI, M. y BRANDON, M.R. (1979). Thymus and the endocrine system: ovarian dysgenesis in neonatally thymectomized rats. *J. Endocrin.* 83, 101-111.
31. HEALY, D.L., BACHER, J. y HODGEN, G.D. (1985). Thymic regulation of primate fetal ovarian-adrenal differentiation. *Biol. Reprod.* 32, 1127-1133.
32. HEALY, D.L., HODGEN, G.D., SCHULTE, H.M., CHROUSOS, G.P., LORIAUX, D.L., HALL, N.R. y GOLDSTEIN, A.L. (1983). The thymus-adrenal connection: thymosin has corticotropin-releasing activity in primates. *Science* 222, 1353-1355.
33. HIRIART, M. y ROMANO, M.C. (1986). Human chorionic gonadotropin binding to rat testis receptors is inhibited by a thymus factor. *Life Sci.* 38, 789-795.
34. HOLUB, M., ROSSMANN, P., TLASKALOVA, H. y VIDMAROVA, H. (1975). Thymus rudiment of the athymic nude mouse. *Nature* 256, 491-493.
35. HSU, C., WHITNEY, R.A. y HANSEN, C.T. (1975). Thymus-like lymph node in nude mice. *Nature* 257, 681-682.
36. INOMATA, T. y NAKAMURA, T. (1989). Influence of adrenalectomy on the development of the neonatal thymus in the rat. *Biol. Neonate* 55, 238-242.
37. ISHIDATE, M. y METCALF, D. (1963). The pattern of lymphopoiesis in the mouse thymus after cortisone administration or adrenalectomy. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 41, 637-649.
38. JANARDANA SARMA, T. y SIRSI, M. (1961). Comparison of the effect of ovariectomy and adrenalectomy on the thymus in young female rats, and a study of the part played by the thymus in body growth. *J. Endocrin.* 22, 177-182.
39. LINTERN-MOORE, S. (1977). Effect of athymia on the initiation of follicular growth in the rat ovary. *Biol. Reprod.* 17, 155-161.

40. LINTERN-MOORE, S., MOORE, G.P.M. y PANTELOURIS, E.M. (1976). Abnormal nucleolar growth in the oocytes of athymic "nude" mice. *Exptl. Cell Res.* 97, 430-432.
41. LINTERN-MOORE, S. y PANTELOURIS, E.M. (1975). Ovarian development in athymic nude mice. I. The size and composition of the follicle population. *Mech. Age. Develop.* 4, 385-390.
42. LINTERN-MOORE, S. y PANTELOURIS, E.M. (1976). Ovarian development in athymic nude mice. III. The effect of PMSG and oestradiol upon the size and composition of the ovarian follicle population. *Mech. Age. Develop.* 5, 33-38.
43. LINTERN-MOORE, S. y PANTELOURIS, E.M. (1976). Ovarian development in athymic nude mice. V. The effects of PMSG upon the numbers and growth of follicles in the early juvenile ovary. *Mech. Age. Develop.* 5, 259-265.
44. LOW, T.L.K. y GOLDSTEIN, A.L. (1984). Thymosins: structure, function and therapeutic applications. *Thymus* 6, 27-42.
45. McGREER, P.L., ECCLES, S.J.C. y McGEER, E.G. (1987). *Molecular neurobiology of the mammalian brain.* Plenum Press, New York, 265-317 p.p.
46. MARCHETTI, B., GUARCELLO, V., MORALE, M.C., BARTOLONI, G., FARINELLA, Z., CORDARO, S. y SCAPAGNINI, U. (1989). Luteinizing hormone-releasing hormone-binding sites in the rat thymus: characteristics and biological function. *Endocrinology* 125, 1025-1036.
47. MARCHETTI, B., GUARCELLO, V., MORALE, M.C., BARTOLONI, G., RAITI, F., PALUMBO, G., FARINELLA, Z., CORDARO, S. y SCAPAGNINI, U. (1989). Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist restoration of age-associated decline of thymus weight, thymic LHRH receptors, and thymocyte proliferative capacity. *Endocrinology* 125, 1037-1045.
48. MARTINEZ, R., ZIPITRIA, D. y DOMINGUEZ, R. (1989). Changes in circadian acetylcholinesterase activity in hypothalamus and cerebellum induced by castration or hemicastration in the adult male rat. *J. Interdisc. Cycle Res.* 20, 135-143.
49. MENDOZA, M.E. y ROMANO, M. (1988). Prepubertal rat thymus secretes a factor that modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus*, en prensa.
50. MICHAEL, S.D. (1983). Interactions of the thymus and the ovary. En: *Factors Regulating Ovarian Function.* G.S. Greenwald y P.F. Terranova Eds., Raven Press, New York, 445-464 p.p.
51. MICHAEL, S.D., TAGUCHI, O. y NISHIZUKA, Y. (1980). Effect of neonatal thymectomy on ovarian development and plasma LH, FSH, GH and PRL in the mouse. *Biol. Reprod.* 22, 343-350.

52. MICHAEL, S.D., TAGUCHI, O., NISHIZUKA, Y., McCLURE, J.E., GOLDSTEIN, A.L. y BARKLEY, M.S. (1981). The effect of neonatal thymectomy on early follicular loss and circulating levels of corticosterone, progesterone, estradiol, and thymosin alfa 1. En: Dynamics of Ovarian Function. N.B. Schwartz y M. Hunzicker-Dunn Eds., Raven Press, New York, 279-284 p.p.
53. MORALES-RAMIREZ, P. (1980). Analysis *in vivo* of sister chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells. *Mut. Res.* 74, 51-59.
54. MOROAN, D. y GROSSMAN, C.J. (1985). Studies on the cytosolic estrogen receptor from rat thymus. *Thymus* 7, 279-286.
55. NANCE, D.M., HOPKINS, D.A. y BIEGER, D. (1987). Re-investigation of the innervation of the thymus gland in mice and rats. *Brain Behavior Immunity* 1, 134-147.
56. PANTELOURIS, E.M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217, 370-371.
57. PANTELOURIS, E.M. (1975). Nude mice with normal thymus. *Nature* 254, 141.
58. PEDERNERA, E., AGUILAR, M.C. y ROMANO, M. (1985). A factor from bursa of Fabricius inhibits *in vitro* the choriionic gonadotropin response of the chick testis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 57, 12-129.
59. PEDERNERA, E., DIAZ-OSUNA, J. y CALCAGNO, M. (1986). A thymus factor influences the *in vitro* testosterone secretion of Leydig cells in the rat. *Life Sci.* 38, 779-787.
60. PIERPAOLI, W. y BESEDOVSKY, H.O. (1975). Role of the thymus in programming of neuroendocrine functions. *Clin. Exp. Immunol.* 20, 323-328.
61. PIERPAOLI, W. y SORKIN, E. (1972). Alterations of adrenal cortex and thyroid in mice with congenital absence of the thymus. *Nature New Biol.* 238, 262-265.
62. REBAR, R.W., MIYAKE, A., ERICKSON, G.F., LOW, T.L.K. y GOLDSTEIN, A.L. (1963). The influence of the thymus gland on reproductive function: a hypothalamic site of action. En: Factors Regulating Ovarian Function. G.S. Greenwald y P.F. Terranova, Eds. Raven Press, New York, 465-469 p.p.
63. REBAR, R.W., MIYAKE, A., LOW, T.L.K. y GOLDSTEIN, A.L. (1981). Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 214, 669-671.
64. REBAR, R.W., MORANDINI, I.C., BENIRSCHKE, K. y PETZE, J.E. (1980). Reduced gonadotropins in athymic mice: prevention by athymic transplantation. *Endocrinology* 107, 2130-2132.

ESTA FERIA NO SEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

65. REBAR, R.W., MORANDINI, I.C., ERICKSON, G.F. y PETZE, J.E. (1981). The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal females. *Endocrinology* 108, 120-126.
66. REBAR, R.W., MORANDINI, I.C., PETZE, J.E. y ERICKSON, G.F. (1982). Hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: reduced gonadotropins and testosterone in males. *Biol. Reprod.* 27, 1267-1276.
67. REBAR, R.W., MORANDINI, I.C., SILVA DE SA, M.F., ERICKSON, G.F. y PETZE, J.E. (1981). The importance of the thymus gland for normal reproductive function in mice. En: *Dynamics of Ovarian Function*. N.B. Schwartz y M. Hunzicker-Dunn Eds., Raven Press, New York, 285-290 P.P.
68. ROITT, I., BROSTOFF, J. y MALE, D. (1986). *Inmunología*. MEDSI, España.
69. ROMANO, M., AGUILAR, M.C., MENDEZ, M.C. y PEDERNERA, E. (1981). Bursa of Fabricius produces *in vitro* a factor which inhibits the chorionic gonadotropin response of the newly hatched chick testis. *J. Steroid Biochem.* 15, 429-432.
70. RCSAS, P., ARGUELLO, M.S. y DOMINGUEZ, R. (1989). Effects of noradrenergic peripheral denervation on spontaneous or induced puberty in normal and hypothyroid hairless females mice. *Med. Sci. Res.* 17, 285-286.
71. RCSAS, P., CASTELLANOS, P. y DOMINGUEZ, R. (1987). The existence of spontaneous hairless ("nude") hypothyroid mutant mice from the CD1 strain, reared under conventional animal house conditions. *Med. Sci. Res.* 15, 553-554.
72. ROSAS, P., CRUZ, M.E. y DOMINGUEZ, R. (1990). Sex differences in the circadian rhythm of brain acetylcholinesterase activity between hairless hypothyroid and normal mice. *Med. Sci. Res.* 18, 139-140.
73. ROSAS, P., CHAVEZ, R., CRUZ, M.E. y DOMINGUEZ, R. (1989). Sex differences in serum corticosterone levels and circadian rhythms between hairless et/et mutant and CD1 adult mice. *Med. Sci. Res.* 17, 283-284.
74. RUIENBERG, E.J. y BERKVEN, J.M. (1977). The morphology of the endocrine system in congenitally athymic (nude) mice. *J. Path.* 121, 225-231.
75. SAITO, Y. (1971). The circadian rhythm of brain acetylcholine levels and motor activity in the rat. *Life Sci.* 10, 735-744.
76. SAKAKURA, T. y NISHIZUKA, Y. (1972). Thymic control mechanism in ovarian development: reconstitution of ovarian dysgenesis in thymectomized mice by replacement with thymic and other lymphoid tissues. *Endocrinology* 90, 431-437.

77. SHARMA, A.K. y SHARMA, A. (1983). Chromosome Techniques. Theory and practice. Butterworths, Londres, 408-442 p.p.
78. SHOLITON, L.J., CROSSMAN, C.J. y TAYLOR, B.B. (1980). Rat thymic homogenates convert testosterone to androgenic metabolites. J. Steroid Biochem. 13, 1365-1369.



The existence of spontaneous hairless ("nude") hypothyemic mutant mice from the CD1 strain, reared under conventional animal house conditions

Patricia Rosas, Paz Castellanos and Roberto Dominguez

Laboratorio de Histología y la Reproducción, Escuela Nacional de Estudios Profesionales en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, IP-9020, CP Estímulo, México, D.F.

In 1966 the existence of a mutant mouse with the following characteristics were reported: hairless, low fertility rate, immunodeficiency, high mortality rate, short life span and atrophy [1, 2]. When these animals were born and maintained in specific pathogen-free conditions their survival time increased and the animals could reach 10 months of age [3]. A new, hairless mutant which has been raised and maintained in a conventional colony and in which the life span reached 2 years is described in the present paper (Figure 1).

Materials and methods: The mutation occurred in a closed, but not deliberately inbred, albino CD1 line. The symbol "et" has been adopted to refer to the mutant form. Hairless mice can be differentiated at birth by the absence of vibrissae, and this was shown to be the result of a single autosomal recessive gene.

The animals were housed under conventional conditions, with free access to food and tap water. The lights of the room were on from 05:00 to 19:00 and the temperature was between 21–24°C.

The animals were obtained by mating *et/+* males and females. The *et/et* pups were raised with their haired brothers or were separated and raised alone. The pups were weighed on a precision balance every third day, from birth to 30 days old. In females, puberty was defined as the day of vaginal opening (VO).

The estrous cycle of the females was studied by daily vaginal smears, stained with hematoxylin-eosin. To estimate the fertility rate of *et/et* males and females, adult (80–120 days of age) animals were kept together during 15 days. The presence of a vaginal plug was considered as evidence of mating. All the animals were subjected to at least three copulators tests.

Groups of adult (300–350 days old) male and female *et/et* and *+/+* animals were killed by decapitation (all the females were in diestrus). The ovaries, uterus, thymus, spleen, kidneys, liver, submaxillary glands, testis, prostate and seminal vesicles were dissected and weighed on a precision balance. The thymus glands were fixed in Bouin's fluid, embedded in paraffin wax, and, in six *et/et* males and six females taken at random, a histological study was performed.

Data obtained were analyzed by one way analysis of variance and Student's *t*-test.

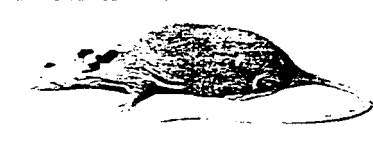


Figure 1. An *et/et* female hairless adult mouse.

Results and discussion: Macroscopic examination of the skin after 40–50 days of age, and not before, showed that some animals present a few hair fragments scattered on the head and feet. Flanagan [1] observed the same at 10 days of age in *nu/nu* mice. The signs of senescence described in the nude atrophic mice [3], were present in the *et/et* animals after 1 year of age, and in many of them after 2 years.

All the *et/et* males autopsied presented a thymus rudiment, which was corroborated in the six animals studied. The weight of that thymus was lower than in *+/+* mice (Table 1). The existence of nude mice with apparently normal or small thymuses has also been previously described [4]. In contrast *et/et* females presented a structure which resembles a lymphatic node at the place where normally the thymus is present. The weight of this structure was lower than the thymus in the *+/+* females (Table 1).

As in "*nu*" mice, when *et/et* animals born from *et/+* mothers were maintained with their haired brothers, their mortality rate was very high during the first 2 weeks of life. On the other hand, when *et/et* animals born from *et/+* mothers were maintained isolated from their haired brothers their survival at 4 weeks of age was 80% and 60% at 52 weeks. Similar results were obtained in *et/et* animals born from *et/et* mothers. In *nu/nu* mice reared with their haired brothers, the mortality rate was described as 55% within the first 2 weeks of life and 100% at 25 weeks [1].

There was no difference in the weight at birth between *et/et* and *et/+* mice, but at 13 days of age a clear difference was observed, the hairless animals being lighter than their haired brothers. Between 300 and 350 days of age, a clear sex difference in the body weight was observed between *et/et* males and females, and between them and the *+/+* animals (Table 1). While there were no differences in the body weight between *et/et* and *+/+* male animals, the *et/et* females were lighter than the *+/+* females.

Puberty was delayed in *et/et* mice compared with *et/+* mice (47.2 ± 0.42 vs 34.3 ± 0.24 days, $p < 0.01$). A group of *et/et* females which was nursed after day 13 of age by its mother at the same time as a foster group, presented a significant advance in the age of VO compared with the *et/et* mice maintained alone by their mother (43.0 ± 0.84 vs 47.2 ± 0.42 days, $p < 0.01$). The diminution of available maternal milk to *et/+* animals (12 *et/+* mice in the litter) caused by initiating rearing on day 12 of age, also altered the age of VO (36.4 ± 0.71 vs 34.3 ± 0.24 days, $p < 0.01$). Therefore, the delay in VO in *et/et* mice seemed to be related both to endocrine and nutritional alterations. In *nu/nu* female mice, a delay in the age of puberty has also been described [5].

The estrous cycle of *et/et* mice is irregular and ovulation is not predictable in all animals. The fertility rate of the *et/et* mice was very similar to the *+/+* mice. One hundred per cent of the *et/et* males proved to be fertile. Most of the *et/et* males were fertile until 450 days of age and some of them were fertile until 720 days. The fertility of *et/et* females was 80% compared with *+/+* or *et/+* females, which is very different to the rate observed in *nu/nu* female mice [1]. The

Table 1. The weight of body, testis, spleen, submaxillary glands and kidneys of *et/et* and *+/+* male and female adult mice (means \pm SEM)

Group	No.	Body (g)	Testis (mg)	Spleen (mg)	Submaxillary glands (mg)	Kidneys (mg)
Males	<i>+/+</i>	24	36.1 \pm 0.6	53.3 \pm 3.4	137 \pm 3.7	206 \pm 8.2
	<i>et/et</i>	48	37.7 \pm 0.7	30.2 \pm 1.3**	154 \pm 7.6*	258 \pm 7.9**
Females	<i>+/+</i>	40	37.7 \pm 0.4	56.4 \pm 3.1	169 \pm 7.1	184 \pm 12.7
	<i>et/et</i>	40	33.3 \pm 0.4**	43.4 \pm 3.4**	175 \pm 4.7	168 \pm 8.4

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

Table 2. The weight of testis, prostate and seminal vesicles of *+/+* male, glands, submaxillary glands and the weight of ovaries and uterus of *+/+* and *et/et* female adult mice (means \pm SEM)

Group	No. of mice	AVERAGE WEIGHTS (mg)			
		Testis	Prostate	Seminal vesicles	Ovaries and uterus
Males	<i>+/+</i>	24	262.4 \pm 5.4	64.0 \pm 6.1	128.7 \pm 6.1
	<i>et/et</i>	48	142.1 \pm 7.4**	54.3 \pm 2.3*	154.0 \pm 5.3
Females	<i>+/+</i>	40	14.1 \pm 0.6	174.5 \pm 5.6	12.7 \pm 0.7
	<i>et/et</i>	40	13.2 \pm 0.7	190.4 \pm 21.4	12.7 \pm 0.7

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

gestational period in *et/et* females was similar to the *+/+* and *+/?* animals (20 days). The number of offspring in each delivery was similar for all groups (9.75 \pm 0.24; $n = 62$; $P < 0.75$; 9.0 \pm 0.6).

The spleen, submaxillary glands and kidneys were larger in *et/et* females than in *+/?* males. Such differences were not present in *et/et* females compared with *+/?* females (Table 1). The weight of the testes, ovaries and prostate was lower in *et/et* animals than in *+/?* animals. No differences were observed in the weight of seminal vesicles and uterus (Table 2).

The irregular estrous cycle, delayed puberty and lower weight of gonads and prostate could be related to modifications in gonadotropin and sexual hormone levels, as has been described in the mouse model [5]. The enlargement of the submaxillary glands also could be an explanation for the results observed in *et/et* animals. According to several authors, the epidermal growth factor

produced by these glands affects the development of the gonads, thymus and other organs, and perhaps also their function.

1. Dominguez R, P. (1986) *Genet. Res.* **48**, 305-316.
2. Rodriguez R, P. (1988) *Nature* **237**, 172-173.
3. Rodriguez R and Dominguez R. (1987) *Genet.* **259**, 282-285.
4. Rodriguez R. (1987) *Nature* **328**, 381.
5. Rosen R, W., Mittleman B, Pitts J, and Leeman GJ. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 126-129.

This study was supported by CONACyT and PUNACNA 30082.

Dr. R. Dominguez, Laboratorio de Biología de la Reproducción, Escuela Nacional de Estudios Profesionales en Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 525, A.P. 1400, México DF.

Paper received 10 March 1987, accepted 15 August 1987



Sex differences in serum corticosterone levels and circadian rhythms between hairless et/et mutant and CDI adult mice

P. Rojas, R. Chávez, Ma. E. Cruz and R. Dominguez

Laboratorio de Biología de la Reproducción, Facultad Nacional de Estudios Profesionales (FANEPE), Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 56200, C.P. 11000, México, D.F., México

In a previous paper [1] we described the existence of a mutant of the CDI mice strain tested characterized by hairlessness and hypothyria, a strain which lives and reproduces in conventional husbandry conditions, and which has a lifespan of 2 years. The fertility rate is 80% in females and 100% in males when compared with their et/et or +/+ brothers.

In "nude" (nu/nu) athymic or hypothyric mice the adrenal glands are larger and hyperfunctional compared with normally haired mice [2-4].

Since the existence of circadian rhythms in plasma corticoid levels and adrenal cortex function has been described in several mammals [5], and because several reports suggest the presence of a link between the thymus and adrenal function [6, 7], it was decided to study the possible circadian differences in serum corticosterone levels and adrenal cholesterol concentration between adult male and female et/et and +/+ mice.

Materials and methods: Adult male and female (in diestrus) mice from our et/et and +/+ colonies were maintained in lighting controlled conditions (lights on from 05:00 to 19:00), with free access to food and tap water. The animals were killed by decapitation at 04:00, 08:00, 12:00, 16:00, 20:00 or 24:00. The blood of the trunk was collected, allowed to coagulate at room temperature, and centrifuged at 1000 x g for 15 min, and the serum was stored at -20°C until the corticosterone concentration on it was measured by the method of Gillet et al. [8]. The adrenals were weighed on a precision balance, homogenized in saline (0.9% NaCl, pH 6.8) and the cholesterol concentration was measured [9].

Results were analyzed by multivariate analysis of variance (MANOVA), followed by Duncan's test or Student's *t*-test.

Results and discussion: Taken together, the adrenal cortex gland function in hairless et/et mice was higher than in normal animals, since the weight of the adrenals and the serum corticosterone levels in both male and female et/et mice were higher than in the +/+ mice, while the mean cholesterol concentration was lower (Table 1).

The circadian variations in adrenal cholesterol concentration in both male and female mice tested and +/+ are presented in Figure 1. There was clear differentiation in the circadian rhythms between male and female et/et mice, in that at 24:00 the highest value in the females coincided with the lowest in the males. Such differentiation by sex was not so obvious in the +/+ mice.

Figure 2 represents the daily variations in serum corticosterone levels between et/et and +/+ male and female mice.

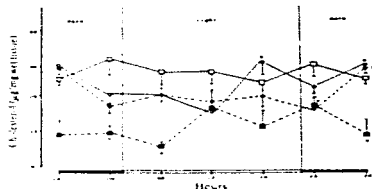


Figure 2. Adrenal cortex hyperfunction (see the text) in et/et mice and circadian rhythm of et/et adult male and female mice and +/+ adult male and female mice. Serum corticosterone levels (ng/ml) at 04:00, 08:00, 12:00, 16:00, 20:00 and 24:00 hours in et/et male (□), et/et female (○), +/+ male (△) and +/+ female (◇) mice. In comparison with +/+ males $p < 0.05$ (Duncan's test after MANOVA). In comparison with +/+ females $p < 0.05$ (Duncan's test after MANOVA). Error bars represent standard error (SE).

When both et/et and +/+ female mice showed a clear circadian rhythm in serum corticosterone levels (MANOVA by group, $p < 0.01$, $F = 9.247$, $p < 0.005$, by hour $F = 5$, $F = 0.144$, $p < 0.001$), by group (hour $F = 5$, $F = 1.554$, $p = 0.184$, for error $F = 7.8$, mean square = 689.038), the rhythm in male mice was not so evident. In female mice, the highest values were observed during the dark phase of the lighting cycle, whereas in the et/et male mice, the highest values occurred during the light hours of the cycle.

According to Pierpaoli and Benedovsky [7], at 240 days of age, the male nu/nu mice had lower plasma corticosterone levels during the afternoon than normal animals. In our study, the serum corticosterone levels of the et/et male mice were almost always higher than their haired brothers, particularly at 16:00 (et/et = 3.2 ± 29.1 vs. 1.2 ng/ml, $p < 0.05$). Differences between our results and those of Pierpaoli and Benedovsky [7] may be related to the existence of a hypertrophic thymus in our animals and the absence of a thymus in the athymic animals which they used, and/or by differences in husbandry conditions. The high serum corticosterone levels observed in the et/et animals may be the result of a constant stress provoked by heat ions and by the possi-

Table 1. The weight of adrenals (mg), adrenal cholesterol (mg) and serum corticosterone (ng/ml) of male and female et/et and +/+ adult mice (mean \pm SE).

Group	Number of animals	Adrenals (mg)	Adrenals cholesterol (mg)	Serum corticosterone (ng/ml)
Male et/et	12	9.8 \pm 0.4	27.0 \pm 1.1	38.0 \pm 3.3
Female et/et	48	11.6 \pm 0.4	22.0 \pm 1.3	35.3 \pm 4.4
Male +/+	48	12.8 \pm 0.7*	27.0 \pm 1.1	24.8 \pm 3.0
Female +/+	48	13.7 \pm 0.6*	10.6 \pm 1.0	51.7 \pm 0.2**

In comparison with +/+ males $p < 0.05$ (Duncan's test after MANOVA). In comparison with et/et males, $p < 0.05$ (Duncan's test after MANOVA).



Effects of noradrenergic peripheral denervation on spontaneous and induced puberty in normal and hypothymic hairless female mice

P. Rojas, M. S. Arguello and R. Domínguez

Laboratorio de Biología de la Reproducción, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zairaquén,
Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 56220, C.P. 15000 México DF, México

Puberty is the period of life when several neuroendocrine changes occur in the mammalian developing hypothalamic-pituitary-gonadal function. In the female the age of vaginal opening (puberty) can be modified by the administration of oestrogens, gonadotropins or by central nervous system lesions or electrical stimulation [1].

Besides the direct participation of the gonadotropins and ovarian hormones, puberty also seems to be affected by other factors which mediate both gonadotropin secretion and ovarian reactivity. In hypothymic congenitally atrophic or thymectomized female mice a delayed puberty has been observed [2-4].

We have previously shown that in the normal adult female rat peripheral noradrenergic denervation, induced by guanethidine administration, resulted in a lower number of ova being shed both in intact and hysterectomized animals [5, 6]. It was then decided to analyze the possible existence of a direct functional relationship between the thymus and noradrenergic ovarian innervation in the regulation of puberty and spontaneous and induced ovulation. To this purpose the *etw*⁻ and *etw*⁺ mice were denervated by the administration of guanethidine, which produces a peripheral noradrenergic denervation, without affecting the central nervous system noradrenergic neurons [7].

Materials and methods. Normal *etw*⁻ and atrophic hairless *etw*⁺ mice born in prepubertal female mice from our own laboratory were used. The animals were kept under controlled lighting conditions (lights on from 04:00 to 18:00), with free access to food and tap water. The day of vaginal opening was considered as puberty, after which vaginal smears were taken daily, between 09:00 and 10:00. After the various experimental treatments (see below) the animals were killed, by decapitation, on the morning of the first day of vaginal oestrus. The ovaries and uterus were dissected and weighed in a precision balance. The oviducts were dissected and ova counted with the aid of a stereomicro microscope.

The animals had been divided into the following experimental groups. To investigate the effects of noradrenergic denervation on spontaneous puberty and ovulation, newborn *etw*⁻ or *etw*⁺ mice were injected daily with saline or guanethidine (GTA, Gergo, México) 20 mg/kg body weight, and were autopsied on the morning of the first day of vaginal oestrus. Untreated *etw*⁻ and *etw*⁺ mice were used as controls.

To investigate the effects of gonadotropin or oestradiol administration on puberty and ovulation in normal and denervated animals, *etw*⁻ mice at 16 days and *etw*⁺ animals at 30 days of age were injected with 4 IU of pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.) or 15.45 µg oestradiol in spontaneous vaginal opening in *etw*⁻ animals has previously been observed. [4]. Groups of *etw*⁻ mice at 16 and *etw*⁺ at 30 days of age, treated with guanethidine or saline from birth, were also injected with PMSG. In a second experiment, *etw*⁻ female mice of 16 and *etw*⁺ of 30 days of age, were injected with 4 IU of PMSG and 48 h later with 4 IU of human chorionic gonadotropin (HCG, Lingua Chem. Co., St. Louis, Mo.). To study the possibility of inducing precocious puberty by a positive feedback action of oestrogens, *etw*⁻ and *etw*⁺ animals, treated with saline or guanethidine from birth, were injected with 20 µg of oestradiol benzoate (Oestrin, Mexico) at the same age as the gonadotropin-treated *etw*⁻.

Data were analyzed by Fisher's exact probability test and analysis of variance followed by Student's *t*-test of the Mann-Whitney U-test.

Results and discussion. Since no differences were observed between the saline treated and untreated animals, the data from all of them, were combined to form a single control group.

Puberty was delayed in *etw*⁺ mice compared with *etw*⁻ mice. Guanethidine administration from birth advanced puberty in atrophic mice and did not modify it in normal ones. The period between vaginal opening and the first vaginal oestrus, however, was delayed in both *etw*⁻ and *etw*⁺ denervated mice compared with controls. No differences were observed in the ovulation rate, nor in the number of ova shed both in *etw*⁻ and *etw*⁺ animals and peripheral denervation of 20 mg/kg of these results (Table 1). No differences were observed in the body weight nor in the weight of the ovaries and uterus between *etw*⁻ and *etw*⁺, nor in guanethidine-treated animals.

PMSG treatment advanced puberty in all animals (72 h post-treatment), whereas oestrus was induced in only *etw*⁻ denervated mice, and not in *etw*⁺ controls. In *etw*⁻ animals, PMSG's administration to guanethidine treated animals did not induce ovulation. The weight of the ovaries was lighter in these *etw*⁻ animals, denervated or not, treated

Table 1 Age of puberty, period between vaginal opening and first vaginal oestrus (1500), number of ova shed in spontaneous puberty (implant 15.45 µg Oestrin and 48 h later with 4 IU HCG), number of ova shed in oestrus (20 µg Oestrin) and in oestrus induced by the treatment with 20 µg/kg of oestradiol benzoate

Group	Puberty (days)	1500 (days)	Number of ova shed	Ovulation rate
Control				
<i>etw</i> ⁻	28.7 ± 0.7	6.3 ± 0.9	14	1/22
Denervated <i>etw</i> ⁻	29.4 ± 1.3	10.7 ± 1.4	9 ± 1.4	4/25
Control <i>etw</i> ⁺	34.5 ± 0.7*	4.0 ± 2.0	9-11	2/18
Denervated <i>etw</i> ⁺	32.6 ± 2.4*	3.6 ± 1.9*	0	0/17

* Significant difference with *etw*⁻ mice. *t*-test (Student's *t*-test) and ANOVA. For comparison with *etw*⁻ mice, *t*-test (Mann-Whitney U-test) and ANOVA.

IV

Sex differences in the circadian rhythm of brain acetylcholinesterase activity between hairless hypothyroid and normal mice

P. Rojas, M. E. Cruz, R. Chavez and R. Domínguez

Laboratorio de Biología del Aprendizaje, Escuela Nacional de Estudios Posgraduados, Facultad I, N. A. M., Universidad Nacional Autónoma de México, C. P. 70000, México, D. F., México

Keywords: Cholinergic system, acetylcholinesterase, circadian rhythm, hypothyroid mice, hairless mice, thyroid sex differences, hypothalamic acetylcholinesterase

Introduction: The measurement of the acetylcholinesterase activity (AChE) in several areas of the central nervous system (CNS) has been considered as a good parameter for the study of the function of the cholinergic system. It has been reported that the measurement of the activity of AChE is an indirect index of ACh concentration (1). We have previously reported the existence of circadian AChE activity variations in the male rat hypothalamus, its dependence on the presence of the gonads (2), and the integrity of the vagus nerve (3). In the female rat hypothalamus, AChE activity also varies during the estrous cycle (4).

In previous reports the existence of hypothyroidism (lower fertility rate and sex differences in the circadian rhythm) in serum thyroxine levels of a spontaneous mutant hairless hypothyroid mice of the CD-1 strain (mouse 012) was described (5, 6). The AChE activity and cholinergic function in the hypothalamus and cerebellum and levels of acetylated and nonacetylated male rat (7) and rat animals (8) of spontaneous hypothyroidism. It was deduced that to compare the AChE activity in several structures of the CNS in normal and hairless hypothyroid animals and female mice at various hours of the day.

Material and methods: AChE activity and cholinergic function were maintained from both male and female mice (012) (20-22°C) controlled conditions (light/dark cycle 12:12 h) with free access to food and tap water, were used. Groups of six-eight animals (female with vaginal smear in diestrus) were killed by decapitation at 08:00, 12:00, 16:00, 20:00, 23:00 or 24:00 h.

The brain was quickly extracted and put on a chilled watch glass kept on ice. The hypothalamus, cerebellum and striatum were quickly dissected, weighed on a precision balance, homogenized by sonication in cold buffer (pH 7.4, 0.04 M, 0.037 M). The activity of AChE was determined in triplicates by using acetylthiocholine as substrate (7). Results were calculated as nmol of substrate hydrolysed min⁻¹ mg⁻¹ wet tissue.

To confirm previous observations that motor activity in 012 is lower than in normal mice, a swimming test was performed at 18:00 h in males and females of 012 and CD-1 mice. The animals were put in a Plexiglas box of 40 x 20 x 15 cm, filled with water at 22°C, and the number of movements of exit from the box during 30 seconds were recorded.

Differences of AChE activity between groups (sex and hour of the day) was compared by multivariate analysis of variance (MANOVA), followed by Duncan's Student's *t* test.

Results and discussion: The weight of the cerebellum of 012 mice was lower than in CD-1 mice (male: 58.4 ± 1.3 mg vs 63.3 ± 2.4 mg, *t* test, *p* = 0.0001; female: 53.1 ± 0.4 mg vs 57.1 ± 1.1 mg, *p* = 0.0001). Sex differences in the parameters were present only in 012 animals (male: 53.1 ± 0.4 mg vs 51.3 mg, *p* < 0.01).

Sex differences in AChE activity in the hypothalamus, cerebellum and striatum were observed in both 012 and CD-1 mice. The pattern of these differences, however, was inverse. In the normal animals the enzymatic activity was higher in the male mice. The albino, erect female mice presented higher AChE activity in the brain structures than the black mice. In the male of the enzymatic activity in the three structures was lower than in normal male, the AChE activity in the female of 012 showed an inverse pattern (Table 1).

In the hypothalamus and cerebellum of CD-1 male mice, the AChE activity was higher during the light phase. Such differences were not observed in the same structures of

Table 1. AChE activity (nmol of substrate hydrolysed min⁻¹ mg⁻¹ wet tissue) of the hypothalamus, cerebellum and striatum of male and female 012 and CD-1 mice and during the light and dark phases of the estrous cycle (female mouse 012)

Group	Sex	Phase of the estrous cycle	Cerebellum	Striatum
012	Male	Light	5.3 ± 0.2	9.4 ± 2.3
		Dark	7.6 ± 0.2	5.7 ± 0.2
	Female	Light	4.6 ± 0.2	4.1 ± 0.3
		Dark	3.7 ± 0.3	28.9 ± 1.0
CD-1	Male	Light	5.4 ± 0.2	22.6 ± 2.0
		Dark	7.6 ± 0.2	29.8 ± 2.0
	Female	Light	4.8 ± 0.3	16.0 ± 1.2
		Dark	3.3 ± 0.4	43.3 ± 1.8
012	Light	4.6 ± 0.2	35.4 ± 1.0	
	Dark	12.0 ± 0.7	43.4 ± 0.7	
012	Light	4.0 ± 0.1	46.3 ± 2.0	
	Dark	12.0 ± 0.4	41.5 ± 2.1	

^aIn comparison with 012 male, *p* < 0.05 (Duncan's test after MANOVA).

^bIn comparison with 012 female, *p* < 0.05 (Duncan's test after MANOVA).

^cIn comparison with 012 female, *p* < 0.05 (Duncan's test after MANOVA).

^dIn comparison with the light phase of the same group, *p* < 0.05 (Duncan's test after MANOVA).

^eIn comparison with the dark phase of 012 male, *p* < 0.05 (Duncan's test after MANOVA).

^fIn comparison with the dark phase of 012 female, *p* < 0.05 (Duncan's test after MANOVA).

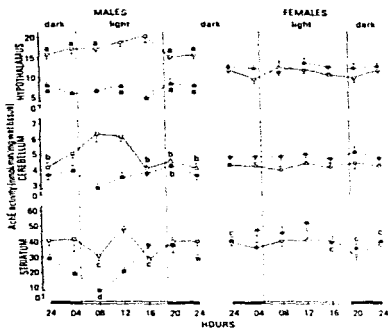


Figure 1. Acetylcholinesterase (AChE) activity ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ wet tissue) in the hypothalamus, cerebellum and striatum of the CD1 and etet male and female (in diestrus) adult mice subjected at 24 h to 16:08, 12:16, 16:00, 20:00 and 24:00 h (means \pm SEM). CD1 male mice: \circ ; CD1 female mice: \square ; etet male mice: \bullet ; etet female mice: \blacksquare . *In comparison with 16:00 h of the same group; $p < 0.05$ (Duncan's test after MANOVA). **In comparison with 16:00 h of the same group; $p < 0.01$ (Duncan's test after MANOVA). ***In comparison with 12:00 h of the same group; $p < 0.01$ (Duncan's test after MANOVA). ****In comparison with all hours of the same group; $p < 0.01$ (Duncan's test after MANOVA).

the female CD1 mice, or in male and female etet animals (Table 1).

Figure 1 represents the daily variations in AChE activity in the hypothalamus, cerebellum and striatum in CD1 and etet male and female mice. No daily variations in the enzymatic activity of the female hypothalamus and cerebellum in both CD1 and etet mice were observed. Daily differences in AChE activity were present only in the striatum of the etet female mice, with the highest value during the light phase.

The hypothalamus, cerebellum and striatum of CD1 and etet male mice present daily variations in AChE activity. In CD1 animals, the highest values were observed during the light phase. In the hairless-hypothymic male the lowest values were also present during the light phase.

The swimming test showed no differences in the motor activity between male and female CD1 mice (92.1 ± 3.2 vs 88.1 ± 2.3 movements of the limbs/ 30 s), as well as between CD1 and etet female mice (86.1 ± 2.3 vs 86.3 ± 2.2). A clear difference, however, was observed in the number of movements of the limbs between male CD1 and male etet (92.1 ± 3.2 vs 82.9 ± 2.6 ; $p < 0.05$).

The present results support the idea of the existence of sex differences in the AChE activity in the hypothalamus. There are, however, species differences in the sex dissimiludes, since in the rat the female has higher enzymatic activity than the male [2, 4], while male mice present higher activity than the female. Species differences in AChE activity are also present in the diurnal variations in the enzymatic activity. While the hypothalamus and cerebellum in the male rat do not show daily variations in AChE activity (expressed as a function of the weight of the structures), normal male mice show daily fluctuations. On the other hand, the rat presents variations in AChE activity hourly in the diestrus days of the cycle [4], while female mice do not.

It has been shown that阉割阉割 and castrated adult male rats present lower AChE activity than normal ones [2]. As the same pattern was observed in hypogonadic-hypothymic male mice, but not in hypogonadic-athymic female mice, the absence of the thymus may be related to such differences and not to the high corticosterone serum levels present in the etet mice [7].

1. Maffei L and Lombardi B (1982) *Neurosci* 15: 75-84.
2. Marini G, Zuppa G and Lombardi B (1981) *Behavior* 10: 209-213.
3. Cruz M, Chávez R, Marino R and Domínguez R (1987) *Med Sci Res* 15: 1571-1572.
4. Domínguez R, Cruz M, Chávez R et al (1986) *Acta Morphol Anatol (Lancaster)* 10: 109-115.
5. Domínguez R, Cruz M, Chávez R et al (1986) *Neuroendocrinology* 5: 190-195.
6. Rojas P, Latorre M, and Domínguez R (1987) *Med Sci Res* 15: 1573-1574.
7. Rojas P, Chávez R, Ma H, Cruz and Domínguez R (1989) *Med Sci Res* 17: 143-144.
8. Horvat E L and Domínguez R (1981) In *Endocr. Methods* (Ed. Domínguez R), pp 101-109. Plenum Press, New York.

This study was supported by CONICIT grant P/83-1 S/N 3362 and Programa Estructurado de Investigación Científica, U.S.A.M.

Reprint requests to: Dr Patricia Rojas, Laboratorio de Biología de la Reproducción, I. N. P. Zolotova, C.S.A.M. A.P. 64000, C.P. 19000, México, D.F., México.

Paper received 26th Mar. 1989; accepted 29th January, 1990

V

Respuesta del timo y de la actividad acetilcolinesterasa en el hipotálamo, a la castración y la hemicastración en ratones machos adultos normales e hipotímicos et/et

Rosas, Patricia. Laboratorio de Biología de la Reproducción, ENEP-Zaragoza, UNAM.

RESUMEN

En este trabajo se estudio la respuesta del timo y de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el hipotálamo de ratones adultos de la cepa CD1 y los mutantes hipotímicos et/et, a la castración y a la hemicastración izquierda o derecha. Comparado con los efectos de la operación simulada, la castración no modificó el peso del timo en ninguno de los dos tipos de animales. En los ratones normales, disminuyó el peso del timo con la hemicastración izquierda y no se modificó en los animales con hemicastración derecha (23.8±2.4 vs 35.4±2.0, P<0.05), mientras que en los machos et/et no se observaron estas diferencias (20.5±5.4 vs 25.8±4.3, NS). En el ratón CD1, la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el hipotálamo disminuyó en respuesta a todas las intervenciones quirúrgicas. En el animal con hemicastración izquierda, la actividad enzimática hipotalámica fue menor que la de los ratones con hemicastración derecha (7.4±0.7 vs 9.8±1.0, P<0.05). En cambio en el ratón hipotímico la actividad de la enzima aumentó tanto en los animales con operación simulada como con hemicastración izquierda (14.1±2.2; 14.2±2.5 vs 8.1±0.7, P<0.05). Nuestros resultados permiten sugerir que los mecanismos neuroendócrinos que modulan la relación del Sistema Nervioso Central con el timo y los testículos son asimétricos. Estos mecanismos de regulación en el ratón mutante et/et responden de manera diferente.

INTRODUCCION

El timo es un órgano que crece e involuciona durante la vida del individuo. Su peso aumenta desde el nacimiento hasta la pubertad, momento en el que comienza a involucionar, lo cual es atribuido al aumento de la concentración plasmática de las hormonas sexuales (9). En el animal adulto, la administración de progesterona, estrógenos, testosterona o de corticoides provocan su involución (3, 11), mientras que la castración, aun en animales de 18 meses de edad, o la adrenalectomía inducen su hipertrofia (7, 11, 12). La interacción de las hormonas sexuales con el desarrollo del timo es mediada por los receptores a esteroides que posee el órgano (9, 14).

La relación funcional entre el timo y las gónadas es bidireccional, ya que la timestectomía en los machos induce atrofia gonadal y disminución de las concentraciones plasmáticas de testosterona (17, 19, 20). También se describe la existencia de un factor tímico que inhibe la respuesta estimuladora de la gonadotropina coriónica humana (hCG) sobre la secreción in vitro de testosterona por las células de Leydig, inhibición que ocurre por la interacción competitiva en la unión de la hCG a su receptor (10, 16). Además, la timosina B4 estimula la secreción in vitro de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (18).

En la rata macho adulta, la respuesta compensatoria a la hemicastración es diferente a la que presentan otros órganos pares. El testículo remanente no gana peso pero aumenta la producción de testosterona, de tal forma que las concentraciones plasmáticas de esta hormona se mantienen normales. Este proceso parece ser asimétrico, ya que la capacidad del testículo derecho para secretar testosterona es mayor que la del izquierdo (8).

También ha sido descrita la existencia de asimetría periférica en la capacidad ovulatoria; en la rata hemicastrada la capacidad del ovario derecho para mantener la ovulación es mayor que la del ovario izquierdo, hecho que depende de la integridad de los nervios vago (1, 4, 5).

La actividad de la AChE en el hipotálamo de la rata macho depende de la presencia de ambas gónadas (13), así como de la integridad de los nervios vago (2). La castración aumenta la actividad de la enzima colino-acetiltransferasa y la concentración de acetilcolina en el hipotálamo, efecto que se acompaña del aumento de la concentración plasmática de la hormona luteinizante (LH) (15).

En trabajos anteriores hemos descrito algunas de las características reproductoras del ratón desnudo hipotímico et/et (21, 22, 24). Los machos adultos et/et presentan menor actividad AChE en el hipotálamo y un patrón de ciclicidad inverso comparado con los ratones normales (23).

Con el objeto de analizar si el timo hipoplásico de los ratones machos et/et responde a la falta de hormonas testiculares de igual manera que el timo normal, en este estudio se compararon los efectos de la castración sobre el peso del timo, en ratones normales e hipotímicos. Así mismo se analizaron los efectos de la castración sobre la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el hipotálamo. Debido a

Los antecedentes sobre la existencia de asimetría en los mecanismos centrales y periféricos que regulan la función de las gonadas y de las gonadas en sí, se decidió estudiar los parámetros antes mencionados pero en animales con extirpación del testículo derecho o del izquierdo.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratones machos adultos [120-140 días] normales CD1 y desnudos hipotímicos et/et mantenidos desde el nacimiento en condiciones convencionales de bioterio, fotoperíodo controlado de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h) y con libre acceso al agua y al alimento.

Las intervenciones quirúrgicas se realizaron por vía escrotal bajo anestesia con éter; todos los animales fueron sacrificados por decapitación, 20 días después, a las 12:00 h. Los animales CD1 y et/et fueron distribuidos al azar en los siguientes grupos experimentales: castrados (CAS), hemicastrados de la gónada izquierda (HI) o la derecha (HD). Los testículos extirpados fueron pesados en balanza de precisión. Como grupos de operación simulada (OS), se utilizaron ratones normales e hipotímicos que fueron anestesiados, se les seccionó el escroto y se suturó inmediatamente. Como grupo testigo absoluto (TA) se utilizaron animales intactos.

A la autopsia se diseccionaron los testículos, las adrenales y el timo y se pesaron en balanza de precisión.

Inmediatamente después de la decapitación se extrajo el cerebro y se diseccionó el hipotálamo, se colocó sobre un vidrio de reloj mantenido sobre hielo, se pesó en balanza de precisión y se homogeneizó en frío por sonicación en un amortiguador de fosfatos 0.07 M, pH 8.0. La actividad AChE fue cuantificada por espectrofotometría utilizando yoduro de acetiltiocolina como sustrato (6). Los resultados fueron expresados en nmol de sustrato hidrolizado/min/mg de tejido.

Los datos fueron comparados por análisis de varianza seguido de la prueba de Duncan. Solo se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor al 5%.

RESULTADOS

El estrés quirúrgico provocó disminución del peso del timo en ambos grupos de animales, aunque en los et/et las diferencias no fueron significativas. En los ratones CD1 la castración indujo aumento del peso del timo, pero éste no alcanzó los valores de los animales testigos absolutos, mientras que en los et/et el peso del timo disminuyó significativamente (Tabla 1).

Cuando se analizan los resultados de la hemicastración en función de la gónada extirpada, sobre el peso del timo de los animales normales, se observa que la ablación del testículo derecho (izquierdo remanente) no lo modificó, mientras que en los animales con hemicastración izquierda (testículo derecho remanente) se presentó un descenso significativo. En los ratones et/et no se observaron diferencias significativas (Tabla 1).

Tabla 1. Mediate.e.m. del peso de las adrenales y del timo (mg) de ratones machos adultos normales CD1 e hipotímicos et/et, enteros (TA), con operación simulada (OS), castrados (CAS) y hemicastrados del testículo izquierdo (HI) o del derecho (HD), autopsiados 20 días después.

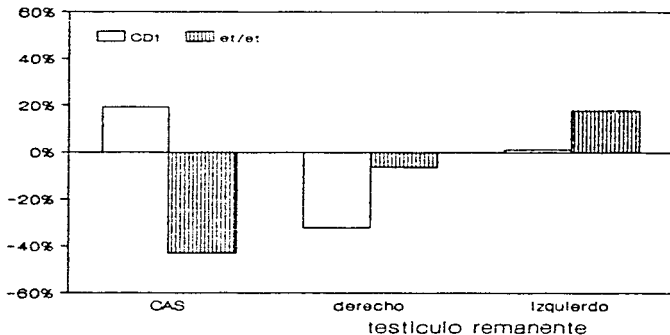
Grupo	adrenales	timo
<u>CD1</u>		
TA	9.6±0.5	51.9±4.1a
OS	9.1±0.7	35.0±2.6
CAS	8.7±0.7	41.7±4.6
HI	8.6±0.4	23.8±2.4a
HD	9.3±1.0	35.4±2.0
<u>et/et</u>		
TA	12.5±0.6	28.6±3.2
OS	11.0±1.0	21.9±2.5
CAS	12.3±0.9	12.5±1.9b
HI	13.4±1.4	20.5±5.4
HD	9.6±0.8c	25.8±4.3

Análisis estadístico: prueba de ANDEVA seguido de la prueba de Duncan.

- P<0.05 vs todos los grupos de ratones CD1
- P<0.05 vs IA y HD de ratones et/et
- P<0.05 vs IA y HI de ratones et/et

Sin embargo, cuando se analiza el grado de hipertrofia con base en los efectos de la operacion simulada, se observa que el hipotimo del raton et/et responde positivamente en presencia del testiculo izquierdo (Figura 1).

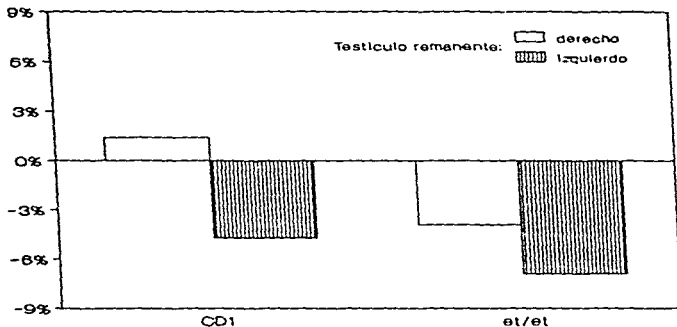
Figura 1. HIPERTROFIA DEL TIMO



0 % = operacion simulada

No se observaron diferencias significativas en el peso de los testiculos de los animales normales y et/et hemicastros. Sin embargo, en los ratones CD1 cuando el testiculo izquierdo fue el remanente se observó tendencia a la disminucion de su peso, en tanto que el derecho tendió a aumentar. En cambio, en los ratones et/et ambos testiculos tendieron a disminuir de peso (Figura 2).

Figura 2. HIPERTROFIA TESTICULAR



PORCENTAJE DE HIPERTROFIA TESTICULAR:

$$\frac{\text{peso del testículo remanente} - \text{peso del testículo extirpado}}{\text{peso del testículo extirpado}} \times 100$$

El peso de las adrenales de los animales CD1 no se modificó con ninguna de las intervenciones realizadas. Las adrenales de los ratones et/et siempre fueron más grandes que las de los normales, con excepción de los animales con hemicastación derecha (Tabla 1).

En comparacion con los resultados obtenidos en el grupo testigo absoluto, en los ratones CD1 la actividad AChE en el hipotalamo disminuyo en todos los grupos experimentales siendo esta disminucion significativamente diferente en la hemicastracion izquierda respecto a la derecha. En cambio, en los ratones et/et tanto la operacion simulada como la hemicastracion izquierda indujeron aumento de la actividad enzimatica, mientras que la extripacion de la gonada derecha no la modifico (Tabla 2).

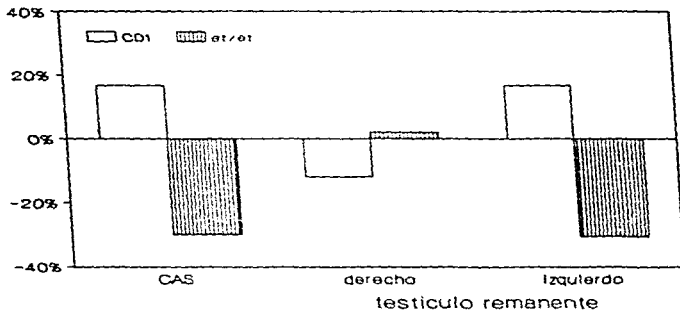
 Tabla 2. Mediana.e.m. de la actividad acetilcolinesterasa (nmol de sustrato hidrolizado/min/mg de tejido) en el hipotalamo de ratones machos adultos normales CD1 e hipotimicos et/et, enteros (TA), con operacion simulada (OS), castrados (CAS) y hemicastrados del testiculo izquierdo (HI) o del derecho (HD), autopsiados 20 dias despues.

Grupo	CD1	et/et
TA	18.8±1.0a	8.1±0.7
OS	8.4±0.5	14.1±2.1b
CAS	9.8±0.5	9.9±1.2
HI	7.4±0.7c	14.2±2.5b
HD	9.3±1.0	9.8±1.1

- a. P<0.05 vs todos los grupos de ratones CD1 (ANDEVA seguido de la prueba de Duncan)
 b. P<0.05 vs TA de ratones et/et (ANDEVA seguido de la prueba de Duncan)
 c. P<0.05 vs CAS y HD de ratones CD1 (ANDEVA seguido de la prueba de Duncan)

Cuando se analizan los resultados en funcion de los obtenidos en la operacion simulada, se observa que tanto en el raton CD1 como en el et/et, la actividad AChE se modifica en forma similar con la castracion y en presencia del testiculo izquierdo pero con un patron inverso entre ambos tipos de animales (Figura 3).

Figura 3. ACTIVIDAD AChE EN EL HIPOTALAMO



0% = actividad en OS

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran claramente que la reactividad neuroendocrina de los ratones hipotimicos et/et es diferente a la de los ratones normales. Además, tomando en consideración las divergencias observadas en la respuesta del peso del timo en los dos tipos de animales frente a las diversas condiciones experimentales, se puede sugerir que el hipotimo que presentan los et/et no es exclusivamente un "timo pequeño" o "rudimento tímico" como se describe (22) sino que se trataría de un timo con características funcionales distintas a las

del timo normal, o bien que los mecanismos de regulación en ambos tipos de animales presentan variaciones. El hecho de que la respuesta del timo a la castración sea inversa entre los dos tipos de animales apoya la idea que los mecanismos de regulación del timo son disimiles en el raton CD1 y el et/et.

En las relaciones funcionales del timo con los testiculos tambien parece existir asimetria, al menos en la respuesta ponderal del organo a la ausencia de un testiculo. En experimentos agudos se ha mostrado que la capacidad de secrecion de testosterona es mayor en el testiculo derecho que en el izquierdo (8). En este caso, en el raton normal hemicastrado, cuando la gonada derecha permanecio *in situ*, el peso del timo disminuyo de manera significativa, efecto que no se produjo cuando el testiculo izquierdo fue el remanente. Con los datos actuales no podemos afirmar que las diferencias observadas son reflejo de modificaciones en la capacidad secretora de ambos testiculos, aunque dicha posibilidad no puede ser descartada. El hecho de que aun en ausencia de hipertrofia compensadora, el peso del testiculo derecho aumente ligeramente y el del izquierdo disminuya, apoya parcialmente esta posibilidad. Estos resultados tambien permiten sugerir que la gonada derecha es mas sensible de reaccionar a los sistemas de regulacion compensadora que la izquierda, como ya ha sido descrito para la rata hemicastrada (1, 4, 5, 8). Nuevamente, el tipo de respuesta de los ratones "hipotimicos" fue diferente a la de los animales normales, y aunque ambos testiculos disminuyen de peso, el descenso fue mayor en el testiculo izquierdo.

Como ya se ha observado en la rata macho adulta (13), la actividad AChE tambien disminuyo en el hipotalamo de los ratones normales sometidos a estrés, hecho que ha sido explicado con base en la relacion entre la actividad AChE y la actividad motora (24, 25) de tal forma que la menor actividad enzimatica puede ser un reflejo de la disminucion en la actividad motora que presentan los animales sujetos a una intervencion quirurgica. Al igual que lo observado en la respuesta del timo a la extirpacion de una gonada, las diferencias observadas en la respuesta de la actividad AChE hipotalamica en los ratones CD1 con hemicastracion izquierda o derecha sugieren la existencia de asimetria en los mecanismos de regulacion periferica, tal como se ha sugerido que existe en el ovario (1, 4, 5). Aunque la respuesta de la actividad AChE del hipotalamo de los ratones hipotimicos es distinta a la observada en los ratones normales, la asimetria en la respuesta del hipotalamo a la falta de una gonada se sigue manteniendo.

En conclusión, los resultados del presente estudio indican que en el ratón macho existe asimetría en los mecanismos que vinculan al timo con los testículos, y que los mecanismos neuroendocrinos de regulación son diferentes en los animales hipotímicos.

BIBLIOGRAFIA

1. CRUZ, M.E., CHAVEZ, R. y DOMINGUEZ, R. (1986). Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *Rev. Invest. Clin.* **38**, 167-171.
2. CRUZ, M.E., CHAVEZ, R., MARTINEZ, R. y DOMINGUEZ, R. (1987). Differences in the acute changes in acetylcholinesterase activity in several brain structures induced by bilateral or unilateral section of the vagi nerves in the adult male rat. *Med.Sci.Res.* **15**, 1531-1532.
3. CHAMBERS, S.P. y CLARKE, A.G. (1979). Measurement of thymus weight, lumbar node weight and progesterone levels in syngeneically pregnant, allogeneically pregnant, and pseudopregnant mice. *J. Reprod. Fert.* **55**, 309-315.
4. CHAVEZ, R., CRUZ, M.E. y DOMINGUEZ, R. (1987). Differences in the ovulation rate of the right and left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effect of ipsi and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J. Endocrinol.* **113**, 397-401.
5. DOMINGUEZ, R., CRUZ, M.E. y CHAVEZ, R. (1989). Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: *Growth Factors and the Ovary*. Ed. A.N. Hirshfield. Plenum Press. Nueva York. pp. 321-325.
6. ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V.N. y FEATHERSTONE, R.M. (1961). A new and rapid determination of acetylcholinesterase activity. *Bioche. Pharmacol.* **2**, 88-95.
7. FITZPATRICK, F.T.A., KENDALL, M.D., WHEELER, M.J., ADCOCK, I.M. y GREENSTEIN, B.D. (1985). Reappearance of thymus of ageing rats after orchidectomy. *J. Endocrin.* **106**, R17-R19.
8. FFANKEL, A.I., CHAPMAN, J.C. y COOK, B. (1989). Testes are asymmetric in the testicular hemicastration response of the male rat. *J. Endocrinology* **122**, 485-488.
9. GROSSMAN, C.J. (1984). Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Rev.* **5**, 435-455.
10. HIRIART, M. y ROMANO, M.C. (1986). Human chorionic gonadotropin binding to rat testis receptors in inhibited by a thymus factor. *Life Sci.* **38**, 789-795.

11. ISHIDATE, M. y METCALF, D. (1963). The pattern of lymphopoyesis in the mouse thymus after cortisone administration or adrenalectomy. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 41, 637-649.
12. JANARDANA, S.T. y SIRSI, M. (1961). Comparison of the effect of ovariectomy and adrenalectomy on the thymus in young female rats, and a study of the part played by the thymus in body growth. *J. Endocrinol.* 22, 177-182.
13. MARTINEZ, R., ZIPITRIA, D. y DOMINGUEZ, R. (1989). Changes in circadian acetylcholinesterase activity in hypothalamus and cerebellum induced by castration or hemicastration in the adult male rat. *J. Interdisc. Cycle Res.* 20, 135-143.
14. MORGAN, D.D. y GROSSMAN, C.J. (1985). Studies on the cytosolic estrogen receptor from rat thymus. *Thymus* 7, 279-286.
15. MUTH, E.A., CROWLEY, W.R. y JACOBOWITZ, D.M. (1980). Effect of gonadal hormones on luteinizing hormone in plasma and on choline acetyltransferase activity and acetylcholine levels in discrete nuclei of the rat brain. *Neuroendocrinology* 30, 329-336.
16. PEDERNERA, E., DIAZ-OSUNA, J. y CALCAGNO, M. (1986). A thymus factor influences the *in vitro* testosterone secretion of Leydig cells in the rat. *Life Sci.* 38, 779-787.
17. PIERPAOLI, W. y BESEDOVSKY, H.O. (1975). Role of the thymus in programming of neuroendocrine functions. *Clin. Exp. Immunol.* 20, 323-338.
18. REBAR, R.W., MINAKE, A., LOW, T.L.K. y GOLDSTEIN, A.L. (1981). Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 214, 669-671.
19. REBAR, R.W., MORANDINI, I.C., PETZE, J.E. y ERICKSON, G.F. (1982). Hormonal basis of reproductive defects in athymic mice; reduced gonadotropins and testosterone in males. *Biol. Reprod.* 27, 1267-1276.
20. REBAR, R.W., MORANDINI, I.C., SILVA DE SA, M.F., ERICKSON, G.F. y PETZE, J.E. (1981). The importance of the thymus gland for normal reproductive function in mice. *En: Dynamics of ovarian Function*. Eds. N.B. Schwartz y M. Hunzicker-Dunn. Raven Press, New York, p.p. 285-290.
21. ROSAS, P., ARGUELLO, M.S. y DOMINGUEZ, R. (1989). Effects of noradrenergic peripheral denervation on spontaneous or induced puberty in normal and hypothyroid hairless female mice. *Med. Sci. Res.* 17, 285-286.
22. ROSAS, P., CASTELLANOS, P. y DOMINGUEZ, R. (1987). The existence of spontaneous hairless ("nude") hypothyroid mutant mice from the CD1 strain, reared under conventional animal house conditions. *Med. Sci. Res.* 15, 553-554.

23. ROSAS, P., CRUZ, M.E. y DOMINGUEZ, R. (1990). Sex differences in the circadian rhythm of brain acetylcholinesterase activity between hairless hypothymic and normal mice. Med.Sci.Res. 18;
24. ROSAS, P., CHAVEZ, R., CRUZ, M.E. y DOMINGUEZ, R. (1989). Sex differences in serum corticosterone levels and circadian rhythms between hairless et/et mutan and CD1 adult mice. Med. Sci. Res. 17, 283-284.
25. SAITO, Y. (1971). The circadian rhythm of brain acetylcholine levels and motor activity in the rat. Life Sciences 10, 735-744.