

PRODUCCION Y VERIFICACION DE UN MODELO ATIMICO INDUCIDO  
QUIRURGICAMENTE EN RATONES

Tesis presentada para la obtención

del título de

Medico Veterinario Zootecnista

ante la división de Estudios Profesionales

de la

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México

por

Alberto Pizaña Venegas

Asesores: M.V.Z.      Ciro Lomelí y Flores

M.V.Z.      Rafael Hernández Gonzalez

M. en I.B.B. Raúl Barrera Rodriguez.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

1992



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## CONTENIDO

	<u>PAGINA</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	6
RESULTADOS Y DISCUSION.....	14
CONCLUSIONES.....	53
LITERATURA CITADA.....	55

## RESUMEN

PIZANA VENEGAS ALBERTO. PRODUCCION Y VERIFICACION DE UN MODELO ATIMICO INDUCIDO QUIRURGICAMENTE EN RATONES (bajo la dirección de: M.V.Z. Ciro Lomelí y Flores, M.V.Z. Rafael Hernández Gonzalez y M.en I.B.B. Raúl Barrera Rodriguez).

Se diseñó y llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México un programa de producción y verificación de un modelo animal atímico inducido quirúrgicamente en ratones para el estudio de la respuesta inmune celular en la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps*.

Existe un modelo atímico espontáneo en ratones en donde la ausencia congénita del timo es causada por la presencia en condición homocigota del gen *nu*, sin embargo no se contaba con este animal por lo que se decidió hacer una timectomía completa en ratones recién nacidos.

El protocolo demandaba grandes números de animales en fechas preestablecidas por lo cual se diseñó un programa reproductivo aprovechando los fenómenos de Lee-Boot y Whitten característicos de los ratones para sincronizar a las hembras reproductoras. La intervención quirúrgica se realizó dentro de las 12 horas posteriores al nacimiento y se verificaron con una muestra al azar de cada lote por la ausencia de células timodependientes con el método de inmunofluorescencia indirecta empleando un anticuerpo monoclonal anti theta 1.1., e histológicamente por la carencia de estas células en los nichos de proliferación de

gánglios linfáticos, bazo y placas de Peyer.

Los resultados obtenidos mostraron que el programa funcionó con la eficacia esperada y los ratones resultaron adecuados para el propósito a que se destinaron, siendo la timectomía neonatal una alternativa útil para obtener ratones deficientes en células dependientes del timo.

## I. INTRODUCCION.

La cisticercosis por Taenia solium es una enfermedad que solo se desarrolla en sus huéspedes naturales, el hombre y el cerdo (3), por lo cual, su estudio en el laboratorio es difícil y costoso. La falta de un modelo animal no había permitido explorar preguntas críticas sobre esta parasitosis.

En trabajos previos se ha informado evidencia experimental que sustenta a Taenia crassiceps, céstodo que en su fase adulta parasita el intestino delgado de carnívoros y en su fase larvaria la cavidad peritoneal de roedores, como un modelo experimental de Taenia solium, debido a su cercanía filogenética, a sus similitudes antigénicas y a que induce inmunoprotección cruzada (12,13).

Este modelo resulta muy ventajoso porque la enfermedad se induce con la inoculación de cisticercos en la cavidad peritoneal de roedores en donde se multiplica asexualmente, pudiéndose cuantificar la carga parasitaria por conteo de los cisticercos generados o por medición del volumen ocupado por los mismos (22).

La constitución genética, particularmente las diferencias en los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad del ratón (H-2), determinan en forma importante el número de cisticercos recuperados, habiéndose identificado el haplotipo H-2<sup>d</sup> como susceptible y los haplotipos H-2<sup>k</sup> y H-2<sup>b</sup> como resistentes (23).

Dado que la respuesta inmune mediada por anticuerpos aparentemente no tiene relevancia en la respuesta contra la cisticercosis murina (16), se decidió entonces estudiar y evaluar la respuesta inmune celular y determinar el papel que desempeña en el desafío contra esta parasitosis.

En consecuencia, se generó la necesidad de un modelo animal para la evaluación de la respuesta inmune mediada por células. Los animales a los que se hace referencia son denominados ratones atímicos.

El timo es el primer órgano linfoide que aparece tanto en las aves como en la mayoría de los mamíferos (10). En el ratón su estructura esta completamente desarrollada después del día 10 o 12 de vida postnatal (2,5).

La linfopoyesis es un proceso que ocurre principalmente durante la vida fetal y poco después del nacimiento. En el timo se lleva a cabo la diferenciación y maduración de las células T, que luego emigran a los demás órganos linfoides, principalmente a los ganglios linfáticos y al bazo (1,5,10,21).

Existe un modelo animal espontáneo de ratones atímicos que por carecer de pelaje se denominaron desnudos (2) En estos animales la carencia congénita de timo se debe a la presencia en condición homocigota de un gen recesivo designado *nu* (4) y la consecuencia es una leucopenia extrema que los hace muy susceptibles a enfermedades (1).

En el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (IIB-UNAM) no se contaba con el modelo animal espontáneo, por lo que se desarrolló un modelo de ratón atímico inducido quirúrgicamente, realizándose una timectomía total en animales recién nacidos antes de que se haya completado la maduración de los linfocitos T, lo que conlleva a un déficit sustancial en éstos y en sus funciones (2,17,19).

El protocolo experimental demandó 3 lotes de 100 ratones cada uno de la cepa BALB/cAnN timectomizados, de ambos sexos y de 6 semanas de edad. Los animales nacieron de domingo a jueves realizando la timectomía durante los 5 días hábiles de la semana y en un tiempo no mayor a 12 horas postnacimiento; se utilizaron además 20 madres nodrizas para amamantar y criar a los ratones operados en camadas de 5 individuos cada una. Los ratones se entregaron a intervalos de 3 semanas a partir de la fecha de entrega del primer lote.

HIPOTESIS. Se propone que conociendo la eficiencia reproductiva de la cepa en cuestión y aplicando los conocimientos de la fisiología y conducta reproductiva a un programa de reproducción y crianza se obtenga el número de animales requeridos en el momento oportuno para llevar a cabo la inducción del modelo quirúrgico descrito y presente un déficit sustancial de las células dependientes del timo que lo hagan útil para los propósitos requeridos en el estudio de la cisticercosis experimental murina.

OBJETIVOS.

1. Diseñar y llevar cabo un programa de producción de ratones que satisfaga de manera eficaz y económica la cantidad y oportunidad con que se demandan éstos.

2. Inducir el modelo quirúrgico atímico mediante la timectomía neonatal y verificar la ausencia de células timo-dependientes por métodos morfológicos (14) e inmunológicos (11).



## II. MATERIAL Y METODOS.

### A) MATERIAL.

1. ANIMALES: Se emplearon un total de 50 hembras y 10 machos de 9 a 12 semanas de edad y 100 crias de menos de 24 horas de nacidas, de la cepa BALB/cAnN y un ratón congénito nu/nu, por lote.
2. ALOJAMIENTO: Se alojaron en jaulas de policarbonato tipo caja de zapato, que ofrecen un área de piso de 364 cm<sup>2</sup>, con tapas de barras de acero inoxidable y protegidos con filtros de poliester tipo Kraft (+). Se utilizaron también jaulas de acrílico tipo caja de zapato que ofrecen un área de piso de 769 cm<sup>2</sup>, con tapas de barras de metal galvanizado, así como, jaulas individuales de barras de aluminio cubiertas con malla de alambre con un área de piso de 64 cm<sup>2</sup> en donde se alojó al macho durante una etapa del programa. El material de cama utilizado fue viruta de madera estéril. Se les proporcionó una dieta específica para roedores (\*), a libre acceso agua filtrada por ósmosis reversible y acidificada hasta alcanzar un pH 2.5 (#) (9,15 26). Se mantuvieron en instalaciones convencionales ventiladas mediante la extracción forzada de aire y en donde la temperatura varía entre los 18 y 26 °C. Los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12/12 horas.
3. TECNICA QUIRURGICA: Para la cirugía se utilizó instrumental quirúrgico para microdissección, un microscopio estereoscópico (©), se diseñó una mesa de operación que incluye un sistema de + Research Equipment Co. Bryan Tx. U.S.A.  
\* Mouse Chow 5015 Ralston Purina St. Louis Mo. U.S.A.  
# Manual Tecnico Millipore. Millipor S.A. de C.V. México.  
© Microscopio estereoscópico Zeiss, Carl Zeiss de México.

fajas elásticas entrecruzadas para la sujeción del animal durante la intervención quirúrgica, un sistema de vacío conectado a un matraz con brazo lateral y este a su vez a un tubo de latex que en su extremo distal sujeta a una pipeta Pasteur, material de sutura de seda calibre 5/0 con aguja atraumática de 3/8 de círculo y una lámpara eléctrica con foco de luz de neón.

3. HISTOLOGIA. Se utilizaron frascos de vidrio con formól al 10%, un histoquinette (@), cápsulas cilíndricas de aluminio, moldes cúbicos para parafina, un microtomo (&), portaobjetos, cubreobjetos y un microscopio óptico (+).

4. INMUNOFLOURESCENCIA: Se usaron cajas de petri con amortiguador salino de fosfatos (ASF) (27), dos agujas finas, tubos de ensaye, una microcentrífuga (\*), pipetas de 5 ml, micropipetas, cámara de refrigeración a 4°C, amortiguador salino de fosfatos con albúmina sérica de bovino al 3% y azida de sodio al 0.05% (ASF-ASB), una cámara de Neubauer y un microscopio de epifluorescencia con lámpara de tungsteno (φ).

@ Histoquinette T/P 8000, Scientific Instruments. U.S.A.

& Microtomo Spencer 820, American Optical Corp. U.S.A.

+ Microscopio optico Zeiss, Carl Zeiss de México.

\* Microcentrífuga Beckman (B G 7), Fullerton Cal. U.S.A.

φ Microscopio de Epifluorescencia Zeiss, Carl Zeiss, México.

## B) METODOS.

### 1. Programa reproductivo.

Para disponer de la información relevante del rendimiento reproductivo de la cepa BALB/cANn se analizaron tres ciclos de crianza de las colonias de producción empleando el programa de computo desarrollado *per se* denominado "Análisis del rendimiento reproductivo de roedores" (#). En base al conocimiento anterior se relizaron los cálculos aritméticos para deducir el establecimiento del programa de producción y la calendarización de los eventos.

Conociendo los fenómenos reproductivos de Lee-Boot y Whitten (7,8,18), característicos de esta especie, se diseñó una estrategia para optimizar los rendimientos del programa de crianza.

Por último se desarrollaron los métodos y sistemas para la identificación y el control del proceso de crianza y del análisis de sus resultados.

### 2. Técnica quirúrgica.

Se realizó una timectomía total en ratones menores de 12 horas de nacidos según la técnica descrita por K. Sjodin (25). Para efectos prácticos del presente trabajo se modificaron algunos puntos de la técnica como a continuación se describe: Los animales se anestesiaron por hipotermia a 4°C y se colocaron sobre la mesa de operación en posición dorso ventral (figura 1-b). Toda la operación se realizó bajo el microscopio estereoscópico para incrementar el tamaño de las estructuras anatómicas a incidir (Figura 1-a).

# Lonelí F.C.: Comunicación personal. IIB-UNAM. 1990.

Se limpió y desinfectó la piel con alcohol al 70% y se realizó una incisión longitudinal sobre la línea media, comprometiendo la piel y la fascia superficial, extendiéndose desde la cintura escapular hasta el nivel de la cuarta costilla exponiendo de esta manera el esternón. Con las tijeras se practicó una incisión desde el manubrio esternal hasta el tercer espacio intercostal, cortando por la mitad el esternón. Esta incisión requiere de gran cuidado ya que pudiera comprometerse al corazón o al arco de la aorta y ocasionar la muerte del animal. Ambas partes del esternón son separadas con las pinzas curvas y la fascia superficial del mediastino es cortada longitudinalmente exponiendo de esta manera al Timo (figura 1-c). La extracción del órgano se realizó por succión a través de la pipeta Pasteur conectada al sistema de vacío (figura 1-a), removiendo un lóbulo a la vez. Completada la extirpación del timo se unieron los bordes de los tejidos incididos con un punto de sutura individual. Al postoperatorio, los animales se limpiaron de cualquier remanente de sangre y se pusieron bajo la fuente de luz aproximadamente por 1 hora para su recuperación.

### 3. Pruebas de Verificación.

Se llevaron a cabo dos pruebas de laboratorio que nos dieron información sobre el estado inmunológico y morfológico de los animales timectomizados en comparación con animales con desarrollo normal del timo. Los métodos de laboratorio seleccionados fueron: Cortes Histológicos e Inmunofluorescencia indirecta.

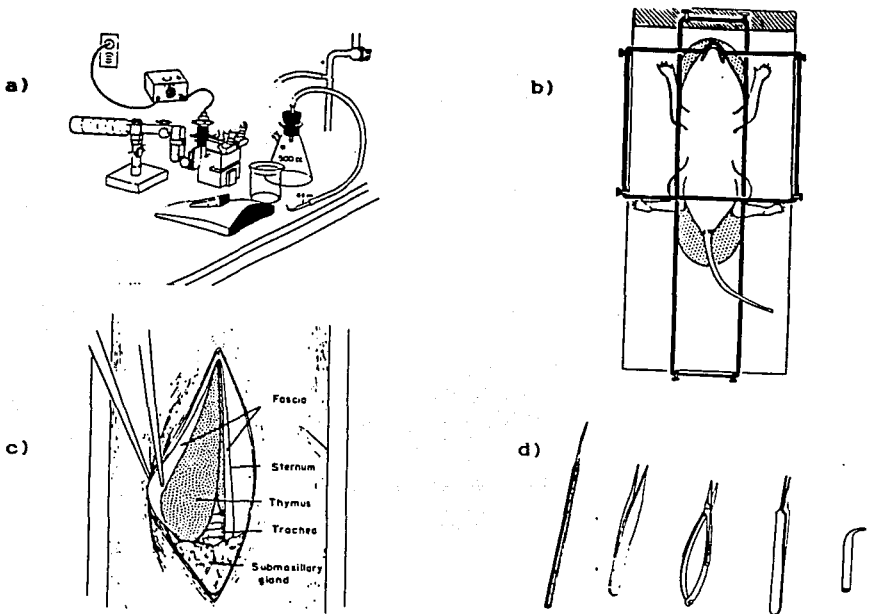


Figura 1. a: Material necesario para la cirugía. b: Posición del animal sobre la mesa de operación. c: Vista del timo y estructuras aledañas. d: Algunas piezas del instrumental usado para la timectomía.

3.1 Metodo de cortes histológicos: Se utilizó la técnica con las tinciones de hematoxilina y eosina descritas por R.D. Lillie (14) por medio de la cual se observaron las diferencias morfológicas en los nódulos de proliferación de linfocitos T presentes en ganglios linfáticos, en bazo y en placas de Peyer (Figura 2).

3.2 Metodo de Inmunofluorescencia Indirecta. Se utilizó el método descrito por Jhonstone y Thorpe (11) para determinar el porcentaje de células positivas a un antígeno pan T (Thy-1) y revelados con un anticuerpo fluoresceinado en 100 células contadas en campo claro (Figura 3).

4. Método Estadístico de Muestreo: Se llevó a cabo un muestreo aleatorio de la población de ratones timectomizados y del grupo control de cada lote según el método descrito por Snedecor y Cochran (24). Se tomaron por lote tres ratones timectomizados, designados como animales prueba, un ratón con desarrollo normal del timo denominado control positivo, y además con la ventaja de contar con un ratón desnudo (\*) como control negativo. A cada uno de estos animales se les extrajeron gánglios linfáticos y se realizaron con estos las pruebas morfológica e inmunológica, y el bazo y las placas de Peyer unicamente para la prueba morfológica.

\* Donación del Dr. Alejandro García Carranca. Investigador del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

DIAGRAMA DEL METODO DE VERIFICACION  
POR CORTES HISTOLOGICOS

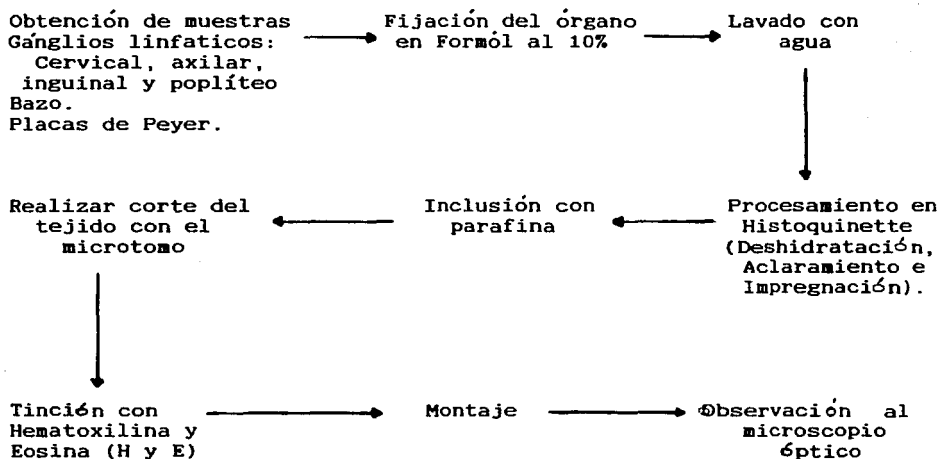


Figura 2

DIAGRAMA DEL METODO DE VERIFICACION  
POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

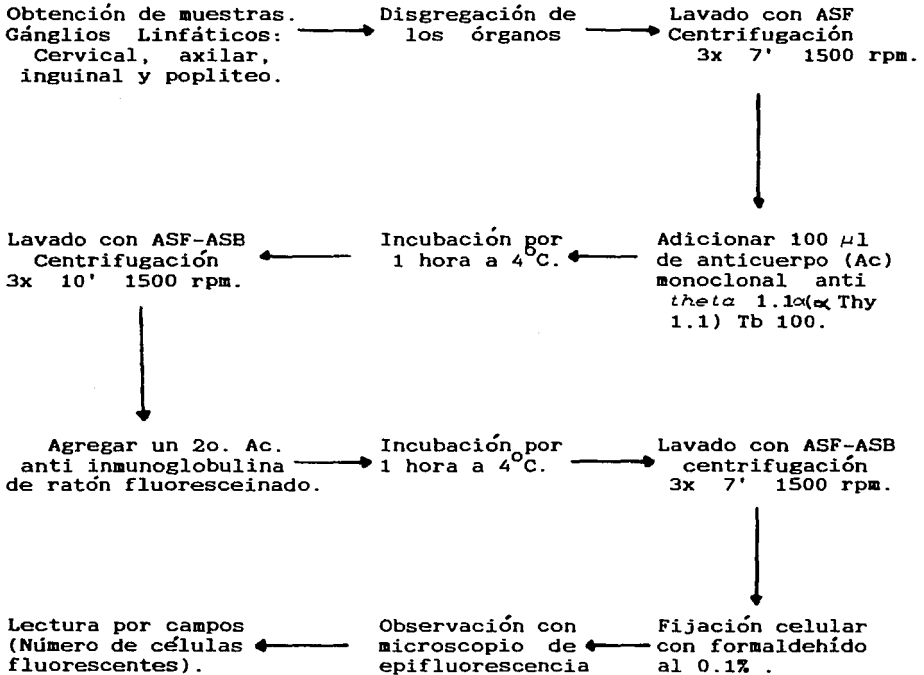


Figura 3



### III. RESULTADOS Y DISCUSION

Debido a las limitantes éticas, económicas y metodológicas para estudiar experimentalmente la cisticercosis humana causada por el cisticerco de *Taenia solium*, se comenzó a estudiar otro metacéstodo, el cisticerco de *Taenia crassiceps*, como modelo experimental, ya que filogenética y antigénicamente esta muy relacionado con el primero (12).

Una de las ventajas de este modelo radica en que el ratón es una de las especies que hospeda naturalmente al cisticerco de *Taenia crassiceps*, y tanto su inmunología, fisiología y genética son de lo mejor conocidos y más estudiados entre los mamíferos (12).

Se ha encontrado que la susceptibilidad a la cisticercosis por *T. crassiceps* esta intimamente relacionada con los genes del complejo mayor de histocompatibilidad del ratón (H-2) comprobado por la carga parasitaria encontrada en el peritoneo de las líneas endogámicas congénicas resistentes de ratones C.B6-H-2b y C.C3-H-2k, que presentan fondo genético de BALB/cAnN (haplotipo H-2d) (Tabla 1) (23).

Los resultados presentados en la tabla 1 determinaron que la cepa de ratones BALB/ cAnN fue la que mayor susceptibilidad presentó ante esta parasitosis, y debido a esta característica se seleccionó para el establecimiento del modelo atímico quirúrgico y a su vez como modelo experimental para el estudio de la respuesta inmune celular en la cisticercosis experimental ocasionada por *T. crassiceps*.

TABLA 1

SUSCEPTIBILIDAD A CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* VARIEDAD ORF  
 EN RATONES CON HAPLOTIPOS H-2 d, b y k.

CEPA	H-2 HAPLOTIPO	No. DE CISTICERCOS INOCULADOS	VIA DE INOCULACION	SEXO	CISTICERCOS RECUPERADOS 30 DIAS POSTINOCULACION	
					$\bar{X}$	* D.E.
BALB/cAnN	d	10	INTRAPERITONEAL	H	138.3	13.0
				M	18.8	4.6
C.B6-H-2b	b	10	INTRAPERITONEAL	H	52.1	17.8
				M	0.0	0.0
C.C3-H-2k	k	10	INTRAPERITONEAL	H	54.2	23.3
				M	1.7	0.9

\* Desviacion Estandar

## PROGRAMA REPRODUCTIVO.

Para determinar el número de ratones criadores necesarios para satisfacer la demanda de animales para experimentación se llevó a cabo un análisis de la eficiencia reproductiva a primer parto de tres ciclos de crianza de la colonia de producción de la cepa Balb/cAnN, tomándose una muestra de 100 cruces. Esta muestra agrupó un total de 200 hembras analizadas y el histograma que muestra la proporción de hembras según el número de crías nacidas a primer parto se muestra en la gráfica 1 y las pérdidas relacionadas con las madres en la tabla 2.

GRAFICA 1

### PROPORCION DE HEMBRAS SEGUN EL NUMERO DE CRIAS NACIDAS EN EL PRIMER PARTO

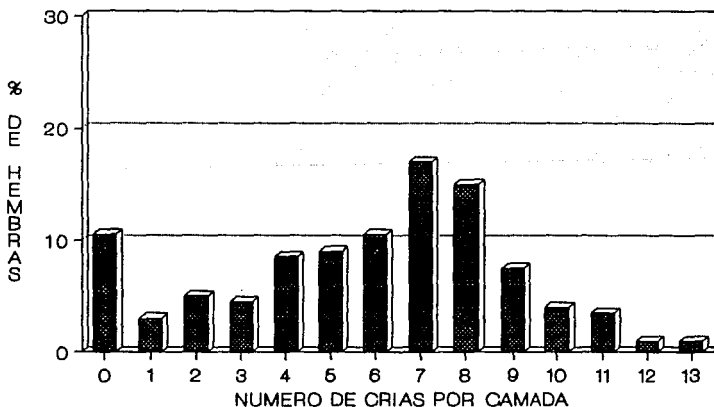


TABLA 2. Pérdidas relacionadas con las madres.

HEMBRAS	No.	%
MUERTAS POR DISTOCIA.	5	2.5
MUERTAS POR CAUSAS DESCONOCIDAS.	3	1.5
ESTERILES.	1	0.5
CANIBALES.	13	6.5
TOTALES	22	11 %

De los datos obtenidos en la gráfica 1 y la tabla 2 se estableció el siguiente resumen :

Total de crias nacidas:	1157		
Total de crias muertas:	131	%	11.322
Promedio de crias/hembra:	5.785	D.E.	3.158
Hembras con parto de 26 días o menos:	104	%	52
Hembras con parto de mas de 26 días:	96	%	48

Analizando los datos anteriores encontramos una mortalidad de crias del 11.322 % que son .654 crias, si le restamos esta cantidad a 5.785 entonces deducimos que el promedio total de crias por hembra es de 5.1 crias.

Tomando en cuenta que el ciclo estral de la hembra, en promedio dura 5 días y la gestación dura 21 días entonces tenemos animales con 26 días de parto. Considerando que el protocolo experimental nos demanda los nacimientos durante 5 días

consecutivos y si aplicamos un 52% de exactitud en relación a las hembras gestantes de 26 días , se estableció que con una población de 50 hembras por lote se satisfacen los requerimientos del programa de producción por lo siguiente:

De una población de 50 hembras el 11% , es decir, 6 hembras no son útiles (caníbales, estériles y muertas) , de las 44 restantes tenemos que el 52% , es decir 22 hembras quedan gestantes en los 26 días requeridos para la entrega de los animales y 22 no.

Teniendo 22 hembras gestantes y 5.1 crias por hembra, se obtienen 112.2 crias totales, cumpliendo de esta manera con los requerimientos de los ratones recién nacidos del protocolo experimental.

La proporción de hembras y machos en los nacimientos es de 1:1 por lo que se tienen 50% de crias de cada sexo.

Con lo que respecta a los machos a utilizar y tomando en cuenta que el sistema de apareo es poligámico juntando 5 hembras con un macho, la necesidad fue cubierta con 10 machos totales por lote.

Basándose en la información anteriormente expuesta, se diseñó un programa reproductivo (figura 4) y fué realizada una calendarización de los eventos de dicho programa (figura 5) para satisfacer de manera oportuna la demanda de ratones neonatos requeridos por el protocolo experimental.

El desarrollo del programa de producción y sus eventos se aplicaron de forma independiente para cada lote.

## PROGRAMACION

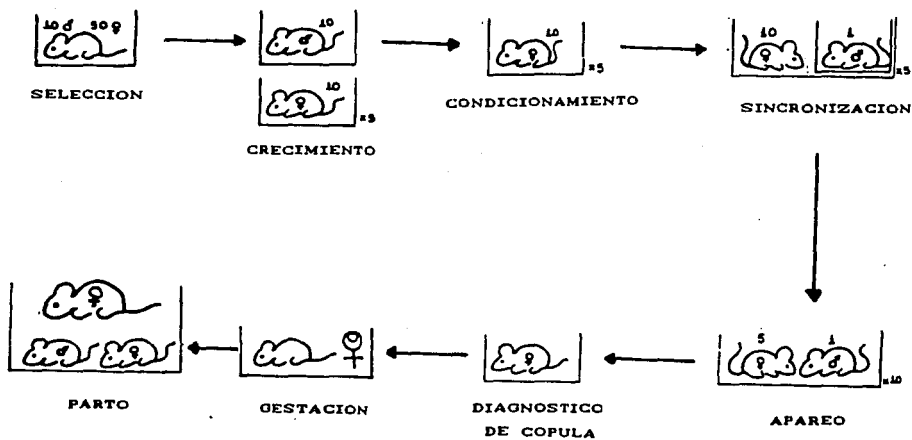


Figura 4 : Esquema del Programa Reproductivo. El número indica la cantidad de animales por jaula.

### CALENDARIO DE PROGRAMACION

DOMINGO	LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES	SABADO	ELMANA	♀	♂
		••••							
		••••							
		••••							
		□□□□□□							
		□□□□□□							
		□□□□□□							
		□□□□□□							
		□□□□□□							
•	•	•	•	•	•	•			
•	•	•	•	•	•	•			
*	*	*	*	*	*	*			
*	*	*	*	*	*	*			
••••	••••	□	□ ○ ●	□ ○ ●	□ ○ ●	□ ○ ●			
○	○	○	○	○	○	○			
○	○	○	○	○	○	○			
☆	☆ ☆	☆ ☆	☆ ☆	☆ ☆	☆				
	••	••	••	••	••				
	••	••	••	••	••				
	○	○	○	○	○				
	○	○	○	○	○				

- |                       |                        |                         |            |
|-----------------------|------------------------|-------------------------|------------|
| NACIMIENTO            | ••••                   | GESTACION               | ●★         |
| SELECCION             | □□□□□□<br>□□□□□□       | PARTO                   | ☆          |
| CRECIMIENTO           | ●                      | OPERACION               | ★          |
| CONDICIONAMIENTO      | ✱                      | PRUEBAS DE VERIFICACION | **<br>**   |
| SINCRONIZACION        | - - - - -<br>- - - - - |                         |            |
| APAREO                | □                      | ENTREGA                 | ○ ○<br>○ ○ |
| DIAGNOSTICO DE COPULA | ○                      |                         |            |

Figura 5 : Calendarizacion de los eventos del programa reproductivo.

## SELECCION.

Los criterios para la selección de los animales reproductores se determinaron en base a su edad, peso, sus características fenotípicas y al estado general de salud. Se seleccionaron animales de 3 semanas de edad, hembras y machos, de tamaño uniforme y con un peso promedio de  $10 \pm 1$  g. A través de un examen visual se evaluó la conformación física de los animales determinándose una condición adecuada para su crecimiento y su futura vida reproductiva. En las hembras se tomó en cuenta la apertura vaginal y amplitud del diámetro pélvico, con la finalidad de evitar problemas al momento de la cópula y distocias durante el parto. En el macho se observaron los caracteres masculinos externos: desarrollo del pene, buen desenvaine del mismo, color de la mucosa; testículos bien implantados dentro del saco escrotal, de buen tamaño y bien conformados, libres de traumatismos, abscesos y anormalidades.

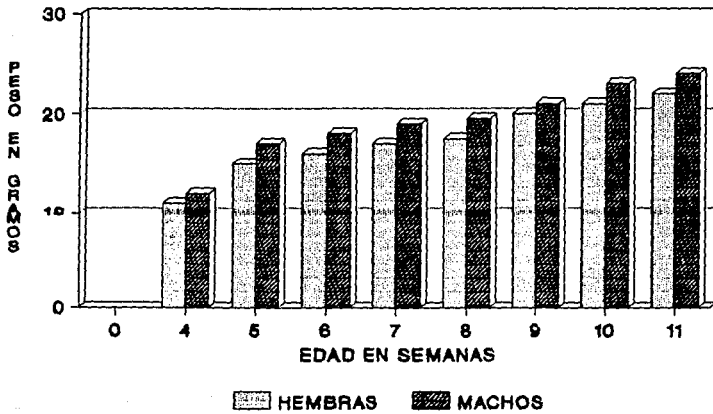
Se escogieron animales clínicamente sanos, exentos de signos de enfermedad o malformaciones incompatibles con la reproducción o la vida que pudieran alterar de manera importante los resultados del sistema de producción.

Todas estas consideraciones nos dieron la pauta para el establecimiento del método de selección del programa reproductivo, realizándose una observación cuidadosa de la apariencia externa y comportamiento de los animales, obteniendo resultados óptimos, manifestados por el crecimiento homogéneo de los animales, como se aprecia en la curva de crecimiento de la gráfica 2.



GRAFICA 2

**CURVA DE CRECIMIENTO EN RATONES DE LA  
CEPA BALB/cAnN DE 4 A 11 SEMANAS DE EDAD**



## CRECIMIENTO.

Dado que los ratones son animales gregarios y su crecimiento por lo tanto es mejor en grupo que individualmente, las hembras se colocaron inmediatamente después de la selección en grupos, brindándoles el espacio necesario según su peso corporal y de acuerdo a los lineamientos internacionalmente aceptados (18). Cada una de las hembras se identificó con un número individual a través de una pequeña perforación de las orejas, marcando las unidades en la oreja derecha y las decenas en la izquierda (figura 6), comenzando por el número 1 hasta el 50 consecutivamente (20). Los machos fueron colocados en una jaula aparte y se marcaron de igual manera que las hembras.

La edad para alcanzar la pubertad y la madurez sexual en los ratones, esta determinada por factores genéticos, nutricionales, medioambientales y sociales. Desde el destete hasta el momento del condicionamiento, se les brindó a los animales el espacio vital apropiado y se vigiló su crecimiento a través de la ganancia de peso corporal, garantizando de esta manera la presentación normal de la pubertad y la madurez sexual en los animales seleccionados. La pubertad es alcanzada a las 4 o 5 semanas de edad, caracterizada en los machos por el descenso de los testículos a los sacos escrotales y en las hembras por la apertura del orificio vaginal y la primera ovulación, generalmente asociada con atresia. La madurez sexual se presenta regularmente a las 9 semanas de edad acompañada por el desarrollo completo del aparato reproductor y por un balance hormonal entre la hormona del crecimiento y las hormonas gonadotrópicas (7,8).

Todos los animales, mantenidos bajo las condiciones anteriores, tuvieron un crecimiento en forma homogénea y un desarrollo corporal adecuado, claro está, siempre acompañado de condiciones óptimas de alimentación (Tabla 3) y control de factores medioambientales (18).

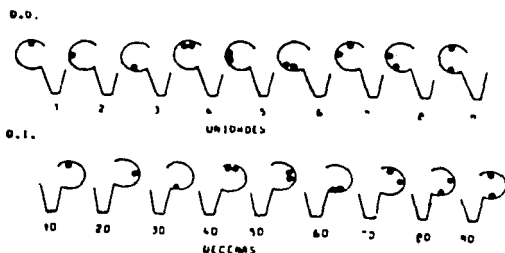


Figura 6: Código de identificación mediante perforación del pabellón auricular. O.D. (oreja derecha); O.I. (oreja izquierda).

TABLA 3. ANALISIS GARANTIZADO DEL ALIMENTO  
MOUSE CHOW 5015 (\*).

Proteína cruda no menor que.....	17.0%
Grasa cruda no menor que.....	11.0%
Fibra cruda no mayor que.....	3.0%
Cenizas no mayor que.....	6.5%
Minerales no mayor que.....	2.5%

\* Manufacturado por Ralston Purina St. Louis  
Mo. U.S.A.

## CONDICIONAMIENTO.

Los ratones hembras son mamíferos poliéstricos durante todo el año, desde la pubertad hasta la menopausia y la duración de su ciclo estral se ve influenciado de manera importante por el número de ratonas por jaula (5,7,8). El ciclo estral es un reflejo del funcionamiento del estado de los ovarios y del tracto reproductor de la hembra y su mediación a través de la secreción de hormonas. Este ciclo usualmente dura 4 a 5 días y está dividido en cuatro etapas: Proestro, estro, metaestro y diestro (8).

Cuando las hembras alcanzan su madurez sexual, entre las 9 y las 11 semanas de edad, y son confinadas en grupos y aisladas en su totalidad de cualquier estímulo odorífero del macho se ve interrumpida su ciclicidad normal entrando en un estado de anestro fisiológico. La inducción de este estado es conocido como el fenómeno de Lee-Boot (7, 8, 18). Para lograrlo, las hembras agrupadas se aislaron completamente de otras jaulas en donde hubiera machos, durante un lapso mínimo de 2 semanas.

Este fenómeno resultó ser un recurso muy útil para el desarrollo del programa de producción ya que se contó con la ventaja de manipular la presentación del ciclo estral y el tiempo de la ovulación, suspendiéndolo para después restablecerlo en el momento oportuno de acuerdo a las necesidades creadas por el programa.

#### SINCRONIZACION (ESTIMULACION).

Las feromonas juegan un papel importante en el desarrollo del proceso reproductivo normal del ratón. Estas sustancias son secretadas junto con la orina ejerciendo un estímulo a través del bulbo olfatorio y tienen la capacidad de inducir una respuesta fisiológica y conductual en individuos de la misma especie y del mismo o diferente sexo (5,6).

Basados en el proceso de condicionamiento descrito anteriormente, las hembras en anestro se colocaron bajo el estímulo del macho de tal forma que en cada jaula con 10 hembras se introdujo a un macho en una jaula de barras de menor tamaño para de esta manera permitir la exposición y contacto a las feromonas secretadas en la orina por el ratón, reinstalando el ciclo estral e induciendo sincrónicamente la ovulación. Al exponer a las ratonas en estado de anestro a dichas feromonas, la mayoría entraron en estro, ovulando 72 horas después de la exposición a estímulo con el macho. Este evento es descrito como el fenómeno de Whitten (7,8,18).

Este fenómeno fué otra herramienta importante que sirvió para inducir de manera oportuna y eficaz la presentación de estros sincrónicamente en las ratonas, eficientando de esta forma los rendimientos del programa de producción.

## APAREO.

El objetivo primario de un buen método reproductivo es producir el número máximo de ratones y al menor costo posible. Para optimizar la eficiencia del programa de producción se utilizó un método de apareamiento poligámico, el cual consistió en colocar a 5 hembras por un macho por jaula. Las hembras se pesaron y se colocaron en la jaula del macho antes de las cuatro de la tarde del primer día de apareo y se mantuvieron durante 5 noches consecutivas para de esta forma conseguir que los nacimientos ocurriesen durante 5 días consecutivos. Cuando se encuentra el macho junto con las hembras se instala una conducta copulatoria que termina hasta que el macho ha alcanzado la saciedad sexual teniendo de 3 a 10 eyaculaciones, habiéndose empleado por 3 horas en total. Posteriormente se presenta un período refractario durante el cual el macho no es influenciado por ningún estímulo sexual (8).

El primer día de apareo se contó como el día "cero" estableciéndose un control sobre el tiempo de duración de la gestación y su diagnóstico oportuno. Los pesos de las hembras se registraron individualmente en hojas de control diseñadas para recopilar la información más relevante desde la cópula hasta el momento del parto (cuadro 1).

El método de apareo poligámico nos ofreció la ventaja de obtener un número sustancial de hembras embarazadas en corto tiempo.



Los resultados presentados en los cuadros 2, 3 y 4 muestran la proporción de las hembras en las que se observó el tapón de cópula y aquellas que quedaron embarazadas por lote en relación a la edad de los animales en semanas. De estos cuadros obtenemos el siguiente resumen:

Lote 1: 50 hembras en apareo, 30 con tapón de cópula y 21 embarazadas.

Lote 2: 50 hembras en apareo, 34 con tapón de cópula y 27 embarazadas.

Lote 3: 50 hembras en apareo, 28 con tapón de cópula y 24 embarazadas.

También podemos observar que el primer día de apareo fue cuando más hembras quedaron gestantes y en los cuatro días restantes hubo una distribución homogénea de las hembras embarazadas. Esto se explica por el tiempo de utilización del macho y el número de hembras de su harem, aunado al período refractario del macho. Muchas de las hembras posiblemente no entraron en calor y esto repercute en que no se presente una adecuada receptividad del macho para la cópula.

En la gráfica 3 se muestra el porcentaje de fertilidad de cada uno de los machos utilizados en los tres lotes del programa reproductivo. Los porcentajes se expresan en relación al número de hembras gestantes por cada uno de los animales, tomando como el 100 % a las 5 hembras del harem de cada macho mantenidas en la etapa de apareo. En promedio encontramos que el porcentaje de fertilidad de los machos para el lote 1 fue de 42%, para el lote 2 de 54% y para el lote 3 de 48%

Se encontró que los machos utilizados por cinco días de apareo con cinco hembras cada uno fueron capaces de gestar de dos a tres hembras en promedio.



Cuadro 2. Hembras con tapón de cópula/Embarazadas.

LOTE I

	1	2	3	4	5	Totales
EDAD SILABAS	T.C.	T.C.	T.C.	T.C.	T.C.	T.C.
	G.	G.	G.	G.	G.	G.
9	3 2	2 1	1 1	1 1	1 1	8 6
10	4 2	1 1	0 0	0 0	6 0	5 3
11	10 5	3 3	3 3	1 1	0 0	17 12
Totales	17 9	6 5	4 4	2 2	1 1	30 21

T.C. : Tapón de cópula.

G. : Gestantes.

Cuadro 3. Hembras con tapón de cópula/embarazadas.  
 LOTE 2

	1	2	3	4	5	Totales
EDAD SEMANAS	T.C.	T.C.	T.C.	T.C.	T.C.	T.C.
	G.	G.	G.	G.	G.	G.
9	6	1	3	2	0	12
	5	1	3	2	0	11
10	4	2	1	1	1	9
	3	1	1	1	1	7
11 ó más.	2	2	2	5	2	13
	2	2	1	3	1	9
Totales	12	5	6	8	3	34
	10	4	5	6	2	27

T.C. : Tapón de cópula.

G. : Gestantes.

Cuadro 4. Hembras con tapón de cópula/Embarazadas.

LOTE 3

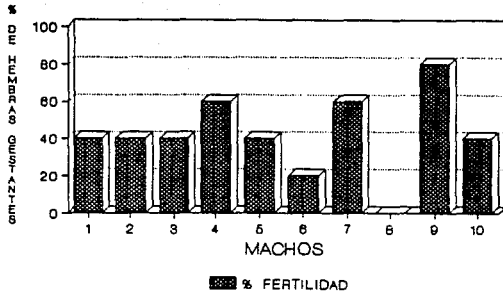
	1	2	3	4	5	Totales
EDAD SEMANAS	T.C.	T.C.	T.C.	T.C.	T.C.	T.C.
	G.	G.	G.	G.	G.	G.
9	4 4	1 1	4 4	1 1	2 1	12 11
10	3 3	2 2	0 0	2 1	1 1	8 7
11	3 3	0 0	2 2	2 1	1 0	8 6
Totales	10 10	3 3	6 6	5 3	4 2	28 24

T.C.: Tapón de cópula.

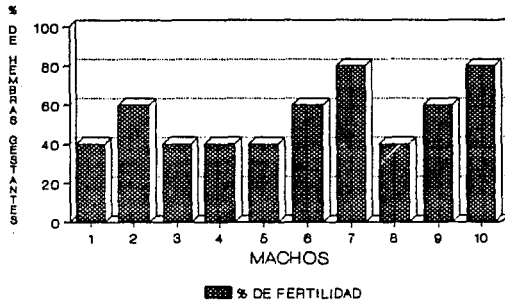
G. : Gestantes.

GRAFICA 3

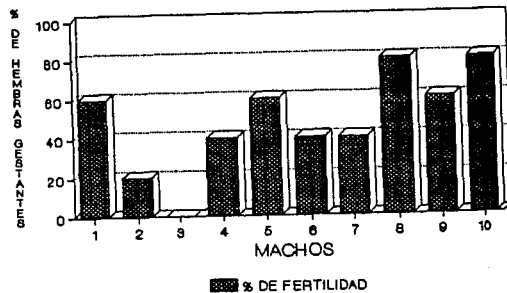
FERTILIDAD DEL MACHO  
LOTE 1



FERTILIDAD DEL MACHO  
LOTE 2



FERTILIDAD DEL MACHO  
LOTE 3



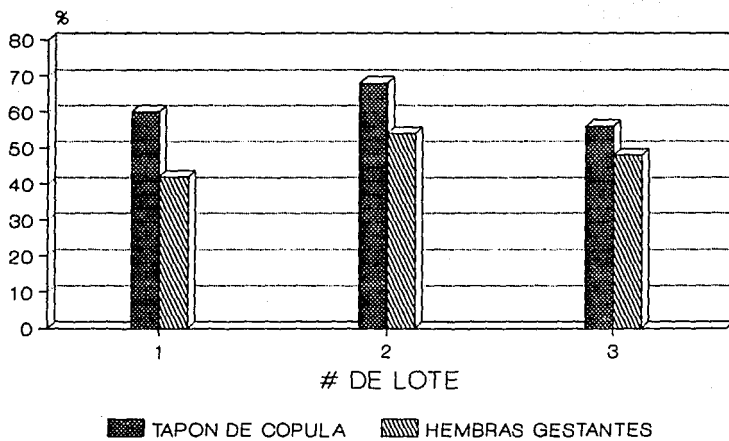
## DIAGNOSTICO DE COPULA.

Para la confirmación de la cópula se estableció una rutina a través de la identificación visual del llamado tapón de cópula. Los machos emiten en una fracción del eyaculado, una substancia de naturaleza gelatinosa producto de la secreción de las vesículas seminales y las glándulas coagulantes, la cual forma un verdadero tapón que llena el espacio entre el cuello del útero y la papila genital externa y cuya función es desencadenar el estímulo reflejo para la secreción de la hormona luteotrópica (8). La observación de dicho tapón se realizó cada mañana siguiente durante los 5 días en que se mantuvo la etapa de apareo. Las hembras positivas al tapón se registraron en la hoja de control y se fueron separando paulatinamente conforme al día en que fue observado y las hembras restantes se dejaron hasta que el macho fue retirado el quinto y último día de identificación de dicho tapón.

En la gráfica 4 se muestra la relación entre el porcentaje de tapones observados y el porcentaje de hembras gestantes por lote. Como podemos observar el tapón de cópula es un indicador confiable de que el macho copuló a la hembra y que a su vez un buen porcentaje de las hembras copuladas quedaron gestantes. Las diferencias encontradas en los porcentajes de tapón de cópula y hembras gestantes pueden ser explicadas por un fenómeno de pseudogestación producido principalmente por la estimulación del cervix y/o la vagina durante el estro. Este proceso hace que la hembra entre en un estado diestro que dura aproximadamente trece días, repercutiendo de forma importante por la presentación de cópulas infértiles en los animales.

GRAFICA 4

% DE TAPON DE COPULA/HEMBRAS GESTANTES  
LOTES 1, 2 Y 3



## GESTACION.

A través de la examinación visual se detectó la preñez alrededor del décimo día después del día de apareo, de tal manera que las hembras presentaron un agrandamiento abdominal notorio y un desarrollo mayor de las mamas. La confirmación de la gestación se realizó por medio del incremento porcentual de peso corporal. Habiendo registrado el peso de las hembras el primer día del apareo, se volvieron a pesar el decimotercer día después a la primera fecha de peso, registrando los pesos de cada hembra en la hoja de control.

En la gráfica 5 se observa el incremento de peso en gramos del día "cero" al día trece de gestación por lote y encontrando en promedio un incremento mayor a 4 gramos. Todas las hembras que presentaron este aumento de peso estaban gestantes.

Un parámetro de suma importancia para el diagnóstico de la gestación es la ganancia porcentual de peso al día trece de gestación. Aquellas hembras que presentaron un incremento por ciento de peso corporal del 22% o más se consideraron gestantes (gráfica 6).

Los resultados obtenidos en la gráfica 7 corroboran que aquellas hembras que se diagnosticaron gestantes a través del incremento porcentual de peso corporal, todas parieron por lo que se considera que este parámetro es de gran exactitud para ser utilizado como diagnóstico de gestación.

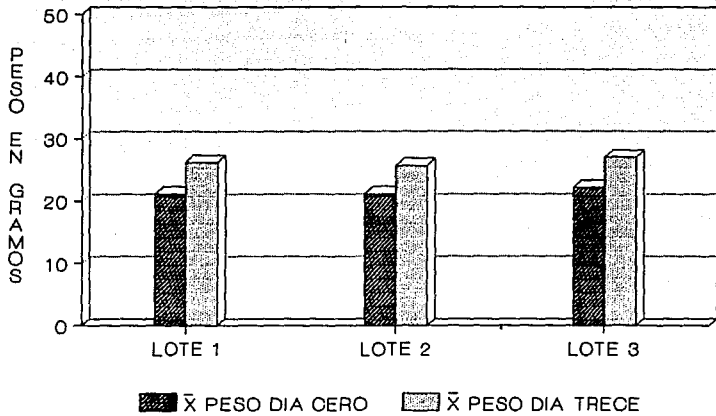
El porcentaje de fertilidad en las hembras se obtiene dividiendo el número de hembras embarazadas entre el número de hembras apareadas multiplicado por 100 y el resultado se expresa

en porcentaje. En la gráfica 8 se muestra el porcentaje de fertilidad de las hembras por lote: De 50 hembras apareadas solo 21 quedaron gestantes lo cual representa un 42% de fertilidad en el lote 1. Para el lote 2 de las 50 hembras apareadas, 27 quedaron gestantes obteniendo 54% de fertilidad y para el lote 3 de las 50 hembras 24 quedaron gestantes rindiendo un 48% de fertilidad.

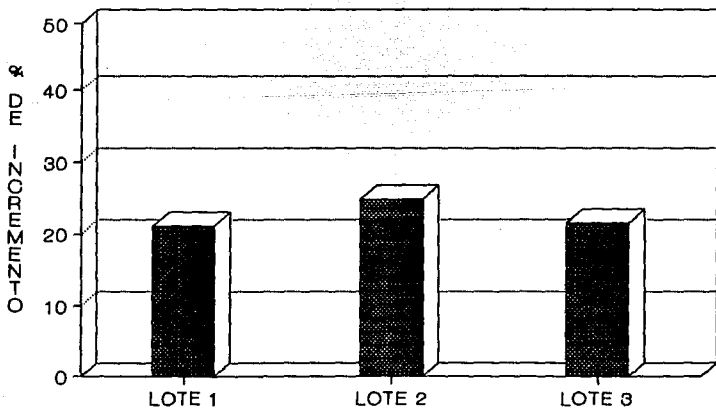
Si tomamos en cuenta que las hembras estuvieron con el macho en la etapa de apareo durante 5 días, siendo hembras de primer parto, y comparamos los resultados de la fertilidad de cada uno de los lotes con la fertilidad del análisis de la eficiencia reproductiva de la cepa, se puede observar una condición en la que la mitad de las hembras quedan gestantes y la mitad no, siendo la misma situación que se presenta en los resultados obtenidos en los tres lotes de éste trabajo experimental.



PROMEDIO DEL INCREMENTO DE PESO CORPORAL EN HEMBRAS GESTANTES

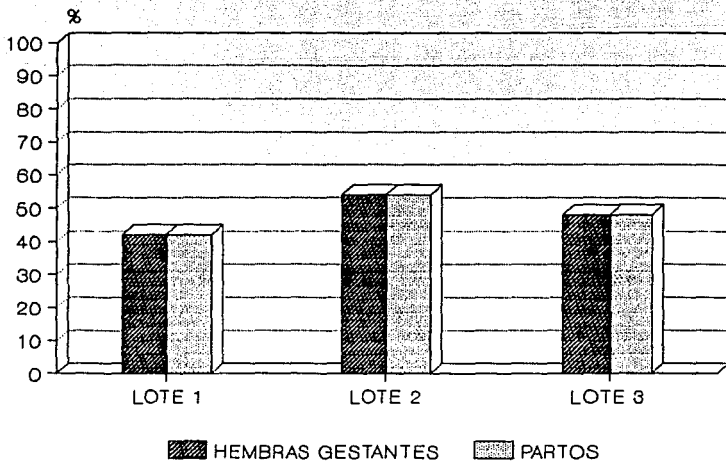


PORCENTAJE DE INCREMENTO DE PESO CORPORAL EN HEMBRAS EMBARAZADAS



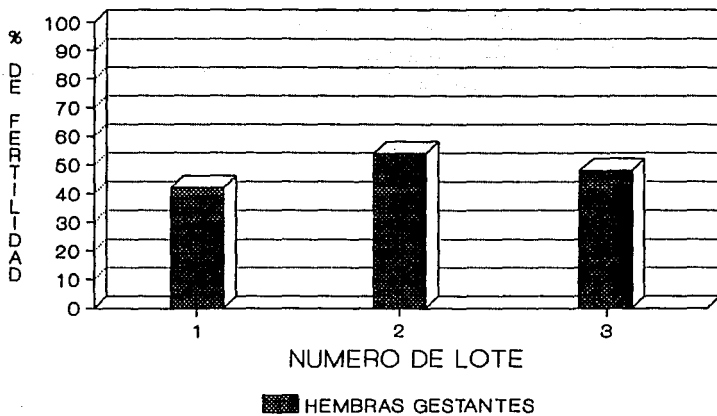
GRAFICA 7

DIAGNOSTICO DE GESTACION Y PARTOS



GRAFICA 8

% DE FERTILIDAD DE LAS HEMBRAS  
LOTES 1, 2 Y 3



## PARTO.

Las hembras se revisaron diariamente, en la mañana y en la tarde, 7 días después del diagnóstico de gestación positivo para registrar los nacimientos. El número de crias por hembra fue anotado en la hoja de control para contabilizar el total de crias nacidas por lote.

En la tabla 4 se muestran los totales de las crias nacidas por lote y como puede ser visto se cumple satisfactoriamente con la demanda de ratones recién nacidos requeridos por cada lote.

TABLA 4. Resumen de crias obtenidas por lote.

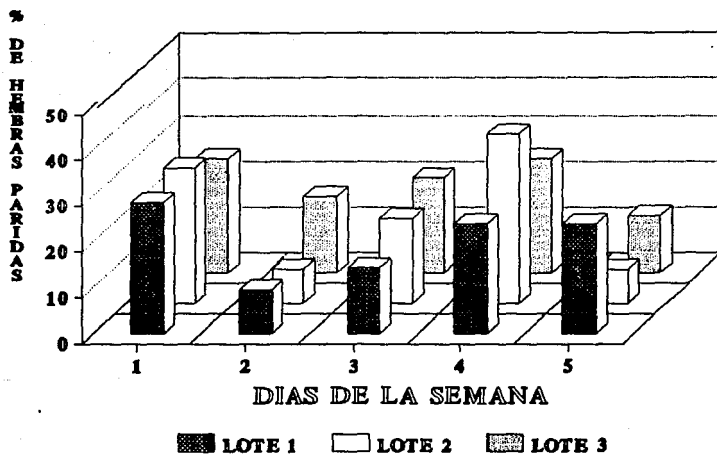
LOTES	CRIAS NACIDAS	MUERTAS AL NACIMIENTO	VIVAS TOTALES
1	129	14	115
2	138	14	124
3	153	8	145

La gráfica 9 nos presenta la distribución de partos en relación a 5 días consecutivos de la semana; las hembras comenzaron a parir en domingo (día 1), terminando las pariciones en jueves (día 5), cumpliendo de esta manera con otra de las necesidades del protocolo experimental. Otra observación de importancia es que la mayoría de los partos se suceden el primer y el cuarto día, lo que se explica parcialmente por el período refractario del macho durante el apareo que aparentemente duro dos días y posterior a este tiempo se volvió a reinstalar su actividad sexual normal.

La gráfica 10 muestra el porcentaje de crias vivas y muertas al nacimiento. El porcentaje de mortalidad en los tres lotes evaluados siempre fué menor al 10%.

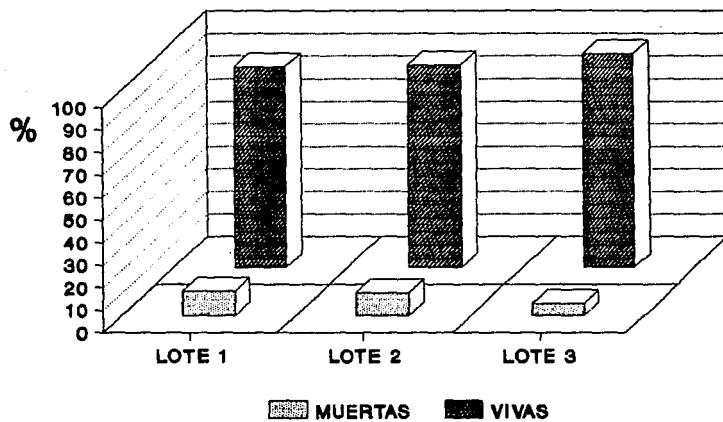
GRAFICA 9

### DISTRIBUCION DE PARTOS



GRAFICA 10

### CRIAS VIVAS Y MUERTAS AL NACIMIENTO



## TECNICA QUIRURGICA.

La timectomía se realizó en ratones de menos de 12 horas de nacidos con el fin de asegurar el máximo abatimiento de las células dependientes del timo. Durante el transcurso de la operación se presentaron algunas complicaciones que se reflejaron con la muerte de los animales. Los ratones recién nacidos son muy susceptibles a las bajas temperaturas y el efecto hipotérmico como método de anestesia resultó ser satisfactorio ya que los ratones adquirieron el efecto anestésico deseado por el tiempo necesario para llevar a cabo la cirugía. Sin embargo, si la cirugía no es realizada en un tiempo razonable (3 a 5 minutos), es decir, si rebasa éste intervalo, se corre el riesgo de que el animal se recupere del efecto anestésico complicando de esta manera la operación.

Uno de los accidentes quirúrgicos más frecuentes se debió a la regulación del la succión del sistema de vacío ya que al momento de extraer el timo se succionaba al mismo tiempo al corazón por la relación anatómica de ambos órganos. Este problema fue controlado fácilmente disminuyendo la fuerza de succión del sistema de vacío, pero con la suficiente para extraer al timo. Otra de las complicaciones que se presentó fue al momento de realizar la sutura ya que en algunos casos se llegó a rasgar la piel de los animales debido a que es en extremo delgada y muy sensible ante cualquier objeto punzocortante como es el caso de la aguja de sutura. Cabe señalar que algunos de los animales murieron al momento de la recuperación postquirúrgica.

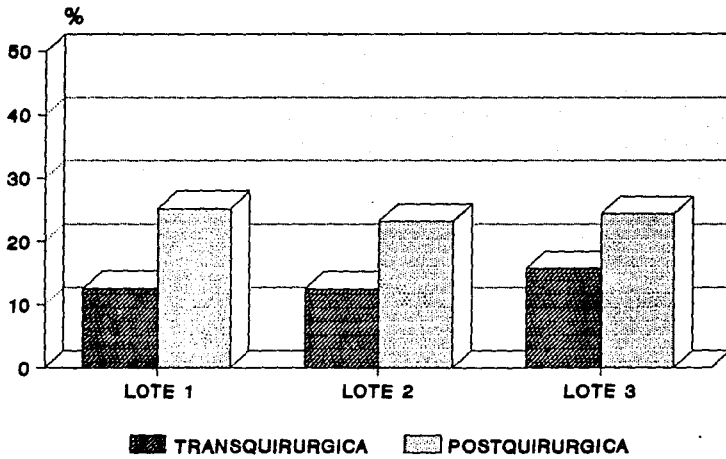
Todos los ratones operados y que resistieron la operación se conjuntaron entre si formando grupos de 5 animales para

devolverlos con cada una de las 20 madres nodrizas para terminar de ser amamantados y criados hasta su destete. Primero se colocaron los ratones recién operados en una jaula completamente estéril y después se realizó una manipulación con la madre a manera de que orinara sobre las crias para que así, las identificara como propias y evitar un rechazo manifestado por canibalismo de las madres. Sin embargo aun con todos estos cuidados no fue posible evitar que muchas de las madres canibalizaran a las crias.

Como se observa en la gráfica 9 se tuvo un porcentaje de mortalidad transquirúrgica promedio del 13% mientras que la mortalidad por causas postquirúrgicas presentó un promedio del 24%. Cabe señalar que la mayor parte de éste porcentaje se debió principalmente a canibalismo por la hembras.

GRAFICA 11

### MORTALIDAD TRANS Y POSTQUIRURGICA





## VERIFICACION INMUNOLOGICA

En sistemas celulares procedentes de ratones, los linfocitos que entran al timo adquieren un antígeno de superficie, previamente llamado *theta* (thy 1). Este antígeno se ha considerado como un marcador específico para detectar la población de linfocitos T en el tejido linfoide periférico de ratones. La presencia del antígeno *theta* se pone de manifiesto merced a la aplicación de una técnica inmunológica muy sensible (inmunofluorescencia) y a la aplicación de un anticuerpo monoclonal, denominado anti theta 1.1 ( $\alpha$  thy 1.1), específico para este antígeno (19).

De los animales muestreados en el lote 1, obtuvimos que dos de los ratones timectomizados presentaron valores de fluorescencia elevados (16 y 18% respectivamente) similar al valor representado por el ratón no timectomizado (7%) (control positivo). Un tercer animal timectomizado no mostró fluorescencia, al igual que el ratón atímico congénito (control negativo) (Gráfica 12-a).

En el lote 2, uno de los animales timectomizados respondió con un valor de fluorescencia (12.2%) similar al presentado por el control positivo (10%). Los otros dos ratones timectomizados revelaron una respuesta igual a la manifestada por el control negativo con ausencia de fluorescencia (Gráfica 12-b).

El lote 3 tuvo un comportamiento similar al lote 2. Un ratón timectomizado con valor de fluorescencia (11%) semejante al control positivo (10%) y los otros dos animales timectomizados sin presentar fluorescencia como el control negativo (Gráfica 12-c).

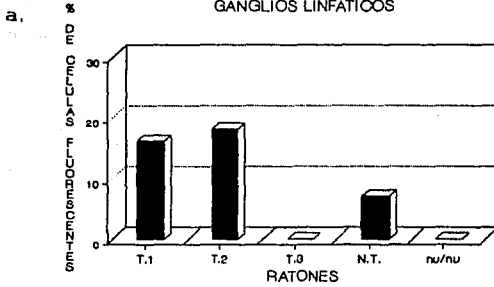
Los resultados de la prueba de Inmunofluorescencia demuestran que hay una marcada depresión de linfocitos T en los gánglios linfáticos de ratones timectomizados. Sin embargo, en algunos de los animales operados se encontró una población suficiente de células T en relación a los animales no timectomizados. Esta respuesta puede explicarse por varias causas: Las diferencias en las horas de nacimiento de los ratones, influenció de manera importante el tiempo durante el cual se realizó la timectomía, es decir, unos animales se operaron 2 o 3 horas después de nacidos y otros hasta las 12 horas postnacimiento, lo cual, si consideramos que el tiempo de migración de la primera oleada de células T al tejido linfoide periférico es durante las primeras horas después del nacimiento, además de que los animales se muestrearon aleatoriamente, entonces pudieron darse resultados de positividad a la prueba de inmunofluorescencia como es el caso de los expuestos en las gráficas de este experimento.

Otra de las causas se refiere a la habilidad para la realización de la técnica quirúrgica. Habiéndose dejado una remanencia del Timo después de la operación, con esta pequeña porción de órgano es posible que se estableciera una población basta de células T en el tejido linfoide de los animales.

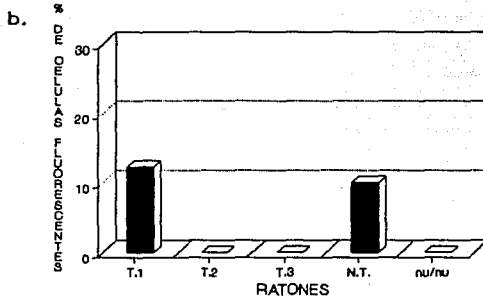
A pesar de estas premisas, los resultados indican que el 70% de los animales timectomizados muestran una severa depresión de los linfocitos dependientes del timo en los gánglios linfáticos que albergan a esta población de células.

## GRAFICA 12

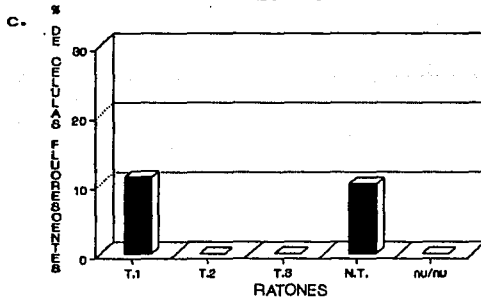
RESPUESTA AL ANTIGENO DE SUPERFICIE TETA  
DE LINFOCITOS T A PARTIR DE MUESTRAS DE  
GANGLIOS LINFATICOS



LOTE 2



LOTE 3



## VERIFICACION MORFOLOGICA

La evaluación morfológica de los cambios histológicos ocurridos en los gánglios linfáticos y bazo de los animales timentomizados y atímicos congénitos (nu/nu) se realiza a través de la comparación con animales con desarrollo normal del timo.

Para que el desarrollo de esta etapa cumpliera con su cometido, se estableció una clasificación de los cambios histológicos más significativos, en relación a la ausencia de cambios patológicos aparentes, encontrados en los organos a evaluar. En los cuadros 5, 6, 7 y 8 se presenta la relación de los gánglios linfáticos evaluados y si hubo o no cambios en su estructura. La evaluación del Bazo se observa en los resultados mostrados en el cuadro 9.

Los números en forma de quebrado expresan lo siguiente:

observación estructural/órganos muestreados

Como se puede observar en la gran mayoría de los gánglios linfáticos de los ratones timentomizados presentaron cambios significativos en su estructura lo cual sugiere que sí se manifestó una depresión de las células T, en las zonas de colonización celular, siendo en algunos casos severa y en otros casos una depresión moderada.

Con respecto a los gánglios linfáticos de los ratones atímicos congénitos encontramos que la estructura completa de los órganos estaba alterada y con una severa depresión de las zonas de albergue de los linfocitos T.

En relación al bazo los cambios encontrados en los ratones timentomizados fueron mas aparentes mostrando en algunos

casos una depleción completa de las células timodependientes en la zona de concentración de las mismas.

Al igual que los gánglios linfáticos de los ratones atímicos congénitos, en el bazo de éstos también se encontró una alteración total de la estructura normal del órgano encontrando una marcada depleción en la zona de permanencia de las células T.

En las placas de Peyer no se observaron cambios ni en la estructura ni en la población celular por lo que se consideró un órgano que no representa significancia para la prueba histológica. Esto se debió posiblemente al tiempo de migración y de ocupación de las células dependientes del timo en éste órgano.

Cuadro 5. Cambios Histológicos en gánglios linfáticos cervicales de los animales muestreados.

GANGLIOS CERVICALES		CONTROL	ATIMICO QUIRURGICO	ATIMICO CONGENITO
POBLACION CELULAR EN ZONA PARACORTICAL.	NORMAL	3/3		
	DISMINUIDA		4/6	
	AUSENTE			2/2
TEJIDO CONJUNTIVO EN ZONA PARACORTICAL.	ABUNDANTE		2/6	2/2
	ESCASO			
	AUSENTE	3/3		
TAMAÑO DE NODULOS.	NORMAL	3/3		
	PEQUEÑOS		4/6	2/2
ORGANIZACION NODULAR.	NORMAL	3/3		
	ALTERADA		3/6	2/2
No. DE NODULOS.	NORMAL	3/3		
	ESCASO		3/6	2/2
SIN CAMBIOS.		3/3		

Cuadro 6. Cambios histológicos en gánglios linfáticos axilares de los animales muestreados.

GANGLIOS AXILARES		CONTROL	ATIMICO QUIRURGICO	ATIMICO CONGENITO
POBLACION CELULAR EN ZONA PARACORTICAL.	NORMAL	3/3		
	DISMINUIDA		2/5	
	AUSENTE		2/5	2/2
TEJIDO CONJUNTIVO EN ZONA PARACORTICAL.	ABUNDANTE		1/5	2/2
	ESCASO			
	AUSENTE	3/3		
TAMAÑO DE NODULOS.	NORMAL	3/3		
	PEQUEÑOS		4/5	2/2
ORGANIZACION NODULAR.	NORMAL	3/3		
	ALTERADA		4/5	2/2
No. DE NODULOS.	NORMAL	3/3		
	ESCASO		3/5	2/2
SIN CAMBIOS.		3/3		

Cuadro 7. Cambios histológicos en gánглиos linfáticos inguinales de los animales muestreados.

GANGLIOS INGUINALES		CONTROL	ATIMICO QUIRURGICO	ATIMICO CONGENITO
POBLACION CELULAR EN ZONA PARACORTICAL.	NORMAL	2/2		
	DISMINUIDA		3/3	
	AUSENTE			2/2
TEJIDO CONJUNTIVO EN ZONA PARACORTICAL.	ABUNDANTE			2/2
	ESCASO		1/3	
	AUSENTE	2/2		
TAMAÑO DE NODULOS.	NORMAL	2/2		
	PEQUEÑOS		2/3	2/2
ORGANIZACION NODULAR.	NORMAL	2/2		
	ALTERADA		3/3	2/2
No. DE NODULOS.	NORMAL	2/2		
	ESCASO		2/3	2/2
SIN CAMBIOS.		2/2		

Cuadro 8. Cambios histológicos en gánглиos linfáticos poplíteos de los animales muestreados.

GANGLIOS POPLITEOS		CONTROL	ATIMICO QUIRURGICO	ATIMICO CONGENITO
POBLACION CELULAR EN ZONA PARACORTICAL.	NORMAL	2/2		
	DISMINUIDA		3/3	
	AUSENTE			2/2
TEJIDO CONJUNTIVO EN ZONA PARACORTICAL.	ABUNDANTE			2/2
	ESCASO		1/3	
	AUSENTE	2/2		
TAMAÑO DE NODULOS.	NORMAL	2/2		
	PEQUEÑOS		2/3	2/2
ORGANIZACION NODULAR.	NORMAL	2/2		
	ALTERADA		3/3	2/2
No. DE NODULOS.	NORMAL	2/2		
	ESCASO		2/3	2/2
SIN CAMBIOS.		2/2		

**Cuadro 9. Cambios histológicos en el bazo de los animales muestreados.**

BAZO		CONTROL	ATIMICO QUIRURGICO	ATIMICO CONGENITO
ORGANIZACION NODULAR	NORMAL	3/3		
	ALTERADO		7/9	2/2
POBLACION CELULAR PERIARTERIOLAR	PRESENCIA	3/3		
	DEFLECCION		6/9	2/2
No. DE NODULOS	NORMAL	3/3		
	ESCASO		6/9	2/2
TAMAÑO DE NODULOS	NORMAL	3/3		
	DISMINUIDO		1/9	2/2
FORMA DE LOS NODULOS	NORMAL	3/3		
	ALARGADO		6/9	
SIN CAMBIOS		3/3	2/9	



#### IV. CONCLUSIONES.

1. El método de análisis de la eficiencia reproductiva y el cálculo hipotético aritmético deductivo para determinar el número de criadores necesarios y la programación de eventos reproductivos resultaron apropiados para la producción calendarizada de ratones satisfaciendo la demanda de la investigación científica.

2. La timectomía neonatal realizada de acuerdo a la técnica descrita por K.Sjodin (25) con las modificaciones que se mencionan en el desarrollo del trabajo resultó satisfactoria para obtener los números de animales carentes de timo requeridos, aunque la eficacia para causar depleción de células timodependientes se vió modificada por el momento de la intervención quirúrgica en relación al momento del parto. La mayoría de las muertes ocurrieron después de la operación y la causa principal fue el canibalismo de las madres provocado por la herida quirúrgica de las crías.

3. El marcador pan T Theta 1 resulta muy útil para identificar a las células T por el método de inmunofluorescencia indirecta. El porcentaje de células positivas varió en los diferentes animales de los distintos lotes y la tendencia fué a reducirse reflejando una depuración de la técnica. También se debe considerar que hay una unión inespecífica de fluoresceína y que los controles negativos fueron ratones atímicos congénitos *nu/nu*.

4. Se encuentran diferencias notables en relación a la estructura histológica de ratones timectomizados en comparación con animales con desarrollo normal del timo. Los cambios observados y de mayor apariencia fué la depresion de las células dependientes del timo en los nichos de proliferación de éstas en los gánglios linfáticos y en el bazo, siendo en éste último más notorios los cambios encontrados. Sin embargo no todos los órganos muestreados de los diferentes ratones en los distintos lotes mostraron los mismos cambios, en algunos órganos la depresión fué moderada y en otros casos severa. En las placas de Peyer no se encontraron cambios significativos que denotaran alguna diferencia en relación a los cortes de ratones normales. La estructura histológica de los bazos y gánglios linfáticos de los ratones atímicos congénitos se encontró completamente diferente a la conformación normal de estos órganos manifestada por una severa depresión de las zonas de colonización de los linfocitos timodependientes.

5. La utilización del modelo espontáneo de alto costo de adquisición y tecnología especializada para su manutención, comparado con el modelo atímico inducido quirúrgicamente, es una alternativa útil, aunque el porcentaje de células timodependientes evaluado por inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal anti teta 1.1 y la depresión de estas células de sus nichos de proliferación en los ganglios linfáticos y bazo, varía según la edad en horas del animal y la escisión total del timo.

## V. LITERATURA CITADA.

1. Bernard, H.J.: Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 18th. ed. W.B. Saunders Company. U.S.A. 1991.
2. Farreras, P.V. and Rozman, C.: Medicina Interna: Inmunología. 11a. ed. Doyna, S.A. Barcelona, España. 1988.
3. Flisher, A., and Larralde, C.: Cysticercosis. In Schantz, P. et al. Inmunodiagnosis of Parasitic Infections. 1: 109-16 (1986).
4. Fogh, H. and Giovanella, B.C.: The nude mouse in experimental and clinical research. VOL.I. Academic Press INC.. U.S.A. 1978.
5. Foster, H.L., Small, J.D. and Fox, J.G.: The mouse in biomedical research 1th. ed. Academic Press INC., U.S.A. 1981.
6. Fox, J.G., Cohen, B.J. and Loew, F.M.: Laboratory animal medicine. Academic Press INC., London 1984.
7. Green, E.L.: Biology of the laboratory mouse. 2th. ed. McGraw-Hill Book Company. U.S.A. 1987.
8. Hafez, E.S.E.: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Lea and Febiger. U.S.A. 1970.
9. Hall, E.H. and White, W.J. and Lang, C.M.: Acidification of drinking water: its effects on selected biologic phenomena in male mice. Lab. Anim. Sc., 30: 643-651 (1980).
10. Ham, A.W.: Tratado de histología. 8a. ed. Interamericana. México, D.F. 1984.
11. Johnstone, A. and Thorpe, F.: Immunochemistry in practice. Blackwel Sc. Publ.. 1th. ed. 1982.

12. Larralde, C., Sciutto, E., Grun, J., Diaz, M.L., Govezensky, T. and Montoya, R.M.: Biological determinants of host-parasite relationship in mouse cysticercosis caused by Taenia crassiceps: influence of sex, major histocompatibility complex and vaccination In: Cell Function and Disease, Eds. Luis Cañedo et al., Plenum Press. 353-362. N.Y. U.S.A. 1989.
13. Larralde, C., Siutto, E., Huerta, L., Terrazas, I., Frago, G., Trueba, L., Lemus, D., Lomeli, C., Tapia, G., Montoya, R.M., Diaz, M.L. and Govezensky, T. : Experimental cysticercosis by Taenia crassiceps in mice: Factors involved in susceptibility. Acta Leidensia. In press.
14. Lillie, R.D. Histopathologic Technic and practical histochemistry. McGraw-Hill Book Company., U.S.A. 1954.
15. McPherson, C.W.: Reduction of Pseudomona aeruginosa and coliform bacteria in mouse drinking water following treatment with hydrochloric acid or chlorine. Lab. Anim. Care., 13: 737-744 (1963).
16. Montoya, R.M., Diaz, L.M., Sciutto, E., Frago, G., Govezensky, T., Lomeli, C. y Larralde, C.: La irrelevancia de los anticuerpos en la determinación de la susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina. Memorias IX Congreso Latino Americano de Parasitología. Asc. Venezolana de Parasitología. Caracas, Venezuela. 1989.
17. Parrott, D.M.V., De Sousa, M.A.BB., and East, J.: Thymus dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. J. Exp. Med., 123: 191-201 (1966).

18. Pool, T.: The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 6th ed. Longman Scientific and Technical. U.S.A. 1987.
19. Raff, M.C. and Wortis, H.H.: Thymus dependence of Teta-bearing cells in the peripheral Lymphoid Tissues of mice. Inmunology., 18: 931-942 (1969).
20. Ramirez, S.: Aplicación de un método reproductivo y un sistema genético para ratones endogámicos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot., 1992.
21. Roitt, I.M.: Essential Immunology. 5th ed. Blackwell Scientific Publications. U.S.A. 1984.
22. Sciutto, E., Fragoso, G., Trueba, L. Lemus, D., Montoya, R.M., Diaz, M.L., Govezensky, T., Lomeli, C., Tapia, G. and Larralde, C.: Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with T. solium antigens against experimental murine T. cassiceps cysticercosis. Parasite Immunology. 12:687-696 (1990).
23. Sciutto, E., Fragoso, G., Diaz, M.L., Valdez, F., Montoya, R.M., Govezensky, T., Lomeli, C., and Larralde, C.: Murine Taenia crassiceps cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. Parasitol Res. 77:243-246 . (1991).
24. Snedecor, C.W. y Cochran, W.G.: Métodos Estadísticos. 6a. ed. Cia. Editorial Continental, S.A. de C.V. México, D.F. 1982.
25. Sjodin, K., Dalmaso, A.P., Smith, J.M. and Martinez, C.: Thymectomy in newborn and adult mice. Transplantation., 1: 521-525 (1963).

26. Wensick, R., Vanbekkum, D.W. and Renaud, H.: The prevention of Pseudomona aeruginosa infections in irradiated mice and rats., Radiation Res., 7: 491-499 (19577).

27. Williams C.A. and Merrill C.W.: Methods in immunology a immunochemistry. 1th. ed. vol.III Academic Press INC. U.S.A. 1968.