

Comparación de las constantes fisiológicas sanguíneas de los ratones CD1, heterocigótico et/+ y desnudo et/et*

Francisco Javier Basurto-Alcántara **
Rosa Luz Mondragón Vargas ***
Daniel Atilano-López **
Juan Antonio Montaraz Crespo +
María José Marques Dos Santos ++
Patricia Rosas Saucedo °
Rubén Marroquín-Segura °°

Abstract

In this paper the normal blood values of a new naked mice mutant known as et/et were compared vs CD1 and heterocigotic et/+. Leukocyte and differential counts showed that total leukocytes, lymphocytes, monocytes and eosinophils were significantly higher ($P < 0.05$) in the et/et mice than in the CD1, and that there was no difference with the et/+ ones. In 89% of the naked mice, neutrophil hypersegmentation was observed, while only a 10% of the heterocigotes presented it, and it was not observed in CD1 mice. Total lymphocytes CD3+ and CD8+ populations, was higher in et/et ($P < 0.05$) than in CD1 mice, and without difference in et/+ mice. Hematocrite values were higher ($P < 0.05$) in the et/et mice than in CD1 ones. In the plasma protein count, the et/et mice had less density as compared to the CD1 ones. The et/et males presented a significantly higher ($P < 0.05$) concentration in the alphaglobulin fraction than in the et/et females ($8.94\% \pm 1.81$ vs $3.49\% \pm 0.69$). There were significant differences in the spleen lymphoid cell count between the et/et mice which had 43 cells/50 μ l compared to 97.5 in the CD1 mice. Meanwhile et/+ mice had an intermediate value that lacked statistical significance. With the results in the analyses it is concluded that: the et/et mice have within their genetic characteristics a leukocytosis with lymphocytosis monocytosis and circulating eosinophilia, and lymphopenia in the spleen, as well as a neutrophil hypersegmentation. This finding is considered as an associated possibility to adrenal hypertrophy reported by others authors.

Key words: ET/ET MICE, NUDE MICE, HYPERSEGMENTED NEUTROPHILS, ADRENAL HYPERTROPHY, HEMOGRAM, IMMUNODEFICIENT MICE, GLYCOCORTICOID HYPERSECRETION.

Resumen

En este estudio se analizaron los valores sanguíneos normales de una mutante de ratones desnudos conocidos como et/et, se compararon con ratones CD1, cepa de la cual surgió y con los heterocigóticos et/+. Los conteos leucocitarios y diferenciales mostraron que las poblaciones de leucocitos totales, linfocitos, monocitos y eosinófilos fueron significativamente mayores en los ratones et/et que en los CD1 ($P < 0.05$); en los ratones desnudos, 89% presentó hipersegmentación de neutrófilos, mientras que sólo 10% de los heterocigóticos lo manifestó y no se observó en los ratones CD1. En la población de linfocitos T totales CD3+

Recibido el 14 de enero de 2000 y aceptado el 22 de junio de 2000.

* El presente trabajo es parte de la tesis de maestría del primer autor

** Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

*** Departamento de Patología Clínica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

+ Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus I, Laboratorio de Inmunología, Avenida Primero de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, 54700, Estado de México, México.

++ Carrera de Ingeniería Química, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus II, Batallón 5 de Mayo s/n, Col. Ejército de Oriente, 09230, México, D. F.

° Laboratorio de Biología de la Reproducción, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus II, Batallón 5 de Mayo s/n, Col. Ejército de Oriente, 09230, México, D. F.

°° Laboratorio de Inmunología, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus II, Batallón 5 de Mayo s/n, Col. Ejército de Oriente, 09230, México, D. F.

y en los CD8+ resultaron superiores los valores de los ratones et/et a los CD1 ($P < 0.05$) y sin diferencia respecto a los et/+. Los valores en el hematocrito fueron mayores en los ratones et/et respecto de los CD1 ($P < 0.05$). En la cuantificación de proteínas plasmáticas, los ratones et/et presentaron menor densidad que los ratones CD1. La fracción alfa globulina del suero mostró diferencias en los ratones et/et, donde los machos presentan una concentración significativamente mayor ($P < 0.05$) a las hembras ($8.94\% \pm 1.81$ vs $3.49\% \pm 0.69$). En el estudio del número de células linfoides en bazo, se observaron diferencias significativas en los ratones et/et que presentaron 43 células/50 μ l, contra 97.5 en los ratones CD1, mientras que los et/+ presentaron un valor intermedio sin significancia estadística. Con el análisis de resultados se concluye que los ratones et/et presentan dentro de sus características genéticas, una leucocitosis circulante con linfocitosis, monocitosis, eosinofilia y una linfopenia en bazo, así como la hipersegmentación de neutrófilos; lo anterior probablemente esté asociado a la hipersecreción adrenal que han descrito otros autores en los ratones et/et.

Palabras clave: RATÓN ET/ET, RATÓN DESNUDO, NEUTRÓFILOS HIPERSEGMENTADOS, HIPERTROFIA ADRENAL, HEMOGRAMA, RATONES INMUNODEFICIENTES, HIPERSECRECIÓN GLUCOCORTICOIDE.

Introducción

El ratón desnudo et/et fue observado en 1985 en una colonia cerrada no consanguínea de ratones de la cepa CD1 en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, de la Universidad Nacional Autónoma de México.¹

Durante el estudio de los ratones et/et se ha observado que en animales adultos, los machos se caracterizan por presentar un timo histológicamente igual al de los ratones normales, pero con un tamaño y peso menor, por lo que se les definió como hipotímicos, mientras que las hembras presentan un rudimento tímico, el cual se asemeja histológicamente a un nódulo linfoide, por lo que están catalogadas como atímicas.^{1,2} Estudios recientes muestran que las características histológicas del timo en la hembra se presentan sólo en la etapa adulta, no en la prepúber.

En animales jóvenes al destete, la única observación macroscópica es el tamaño más reducido del timo. Sin embargo, se ha observado que estos animales presentan un periodo de vida mayor a los ratones desnudos atímicos nu/nu en condiciones convencionales de mantenimiento. No hay diferencias entre el ratón CD1 y el et/et en lo que respecta al rechazo de xenoinjertos.^{1,2}

Durante el desarrollo de la colonia se ha observado tanto en machos como en hembras, una marcada susceptibilidad a problemas cutáneos como abscesos, dermatitis bacteriana y dermatomicosis, así como un incremento en la frecuencia de parasitosis por *Eimeria* spp, neumonías, uveítis (cataratas) y signos clínicos de envejecimiento prematuro.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar los valores normales sanguíneos de los ratones et/et y compararlos contra los de los CD1 y los portadores heterocigóticos et/+.

Material y métodos

Los valores a determinar en las tres variedades de ratones fueron: hematocrito, leucocitos circulantes totales, cuentas diferenciales de leucocitos circulantes, concentración de proteínas plasmáticas, subpoblaciones de linfocitos T circulantes, número de células linfoides en bazo, fracciones electroforéticas de proteínas séricas.

Se emplearon animales adultos de dos a tres meses de edad, clínicamente sanos, mantenidos bajo las condiciones normales de bioterio, con control de ciclo de luz-oscuridad, cambio de cama de viruta de madera cuatro veces por semana, agua y alimento comercial *ad libitum*. La muestra de población (n) se ajustó a cada experimento.

Los animales fueron identificados según su genotipo y antecedentes de crianza en: ratones normales cepa CD1, ratones desnudos hipotímicos et/et y los heterocigóticos o portadores et/+. Se distribuyeron según el parámetro por analizar en: 55 [10 machos (M) y 7 hembras (H) CD1, 10M y 9H et/+ y 10M y 9H et/et] para la determinación de hematocrito, leucocitos totales, cuentas diferenciales de leucocitos circulantes y proteínas plasmáticas; 60 (10 M y 10 H CD1, 10 M y 10 H et/+ y 10 M y 10 H et/et) para la determinación de subpoblaciones de linfocitos T; 60 (10 M y 10 H CD1, 10 M y 10 H et/+ y 10 M y 10 H et/et) para determinar la población de células linfoides en bazo; 60 (8 M y 10 H CD1, 13 M y 9 H et/+ y 10 M y 10 H et/et) para la determinación de las fracciones electroforéticas de proteínas séricas.

Las pruebas estadísticas se seleccionaron de acuerdo con la distribución de datos y homogeneidad de varianzas. Las pruebas paramétricas se aplicaron con el criterio de homogeneidad de varianzas ($P > 0.05$ por la prueba de Bartlett) y que los datos mostraran una

distribución normal; mientras que la no paramétrica se aplicó cuando no hubo homogeneidad de varianzas ($P \leq 0.05$ por la prueba de Bartlett) o que no se cumpliera el supuesto de normalidad en la distribución de los datos.³

La determinación del hematócrito se hizo mediante la técnica de microhematócrito.⁴ Los resultados se evaluaron mediante el análisis de varianza de un factor (genotipo de ratones) seguido de la prueba de Tukey, mientras que para las diferencias por sexo se aplicó la prueba de "t" Student.³

La determinación de las poblaciones de células sanguíneas se logró mediante la aplicación de la metodología descrita para el hemograma y conteos diferenciales.⁴ Los resultados se evaluaron mediante las pruebas "U" de Mann-Whitney y el análisis de varianza de Kruskal-Wallis, debido a que los datos no cumplen con el supuesto de normalidad.

En la determinación de las poblaciones de linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+ se utilizó un citofluorómetro de flujo* y conjugados** contra los marcadores de superficie CD4, CD8 y CD3 con la aplicación de la siguiente metodología: Se tomaron muestras de 1 ml de sangre con anticoagulante etilendinitrilotetracetato disódico (EDTA) al 2% mediante punción cardiaca. Para producir la reacción antígeno anticuerpo se utilizaron cuatro tubos de ensayo que fueron identificados. Para evitar daños celulares se colocaron los tubos en un baño de hielo.

En cada tubo se colocaron, según su identificación 4 μ l de conjugado anti CD3-FITC*** (FITC = isotiocianato de fluoresceína), anti CD4-PE*** (ficoeritina) y anti CD8 (Lyt-2)-FITC[†] y 50 μ l de sangre de la muestra correspondiente y se agitaron.

Se incubaron los tubos durante 30 minutos en baño frío a 4°C con agitaciones cada 10 minutos. Se agregaron 2 ml de lisante ortho para eliminar los eritrocitos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifugaron las muestras a 300 g durante 10 minutos; posteriormente se desechó el sobrenadante con una bomba de vacío.

El paquete celular se resuspendió en solución salina amortiguadora de fosfatos para obtener la lectura del porcentaje de cada subpoblación en un citofluorómetro de flujo.^{††} Para las lecturas de los porcentajes de los leucocitos, se siguió el programa ABS versión 1.7, en el cual se seleccionó manualmente la ventana de la nube de linfocitos de los ratones CD1; esto último se realizó

con la ayuda de la cuenta diferencial de leucocitos, de tal manera que debieron corresponder las cuentas encontradas en la ventana seleccionada con el porcentaje de linfocitos obtenidos mediante la cuenta diferencial.

Se evaluaron las poblaciones de linfocitos CD3+ (linfocitos T totales), CD4+, CD8+ y proporción CD4:CD8 con la aplicación de las metodologías estadísticas de Kruskal-Wallis y la "U" de Mann-Whitney.³

Para determinar el número de células linfoides se extrajo el bazo y se disgregó sobre una malla de acero inoxidable de 0.5 mm de diámetro y el émbolo de una jeringa de plástico; las células se resuspendieron en 4 ml de medio mínimo esencial para cultivo celular. Se eliminaron los eritrocitos con lisante ortho y se cuantificaron los linfocitos en los cuadros grandes de las esquinas del hemocitómetro.

La evaluación estadística se hizo con las pruebas de Kruskal-Wallis y la "U" de Mann-Whitney. La concentración de proteínas plasmáticas se determinó mediante la técnica de densitometría.⁴

Los resultados se evaluaron mediante las pruebas: Análisis de varianza con un factor (genotipo) y la prueba de Tukey para establecer diferencias entre grupo; asimismo, se utilizó la prueba "t" de Student con muestras independientes, para registrar las diferencias entre sexos.³

La evaluación de las fracciones séricas se hizo mediante la técnica de electroforesis en cellogel descrita en el manual de uso del espectrodensitómetro.^{†††} Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción del seno infraorbitario con un tubo capilar. El suero se obtuvo al centrifugar la sangre a 1 200 g durante 15 minutos utilizando una centrífuga clínica.

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza de Kruskal-Wallis y la prueba de "U" de Mann-Whitney.³

Resultados

El análisis de varianza aplicado a los datos de hematócrito dio diferencia significativa ($P < 0.05$) y al realizar la prueba de Tukey se encontraron únicamente diferencias entre los grupos CD1 y et/et (Cuadro 1).

Variable	CD1	et/+	et/et
Hematócrito	* 36.5294 \pm 1.385	39.9211 \pm 0.934	42.1579 \pm 0.683
*P < 0.01 CD1 vs et/et			

* Cytron Absolute Ortho Auto Biosampler®.

** Serotec®.

*** Gibco BRL.

† Becton & Dickinson.

†† Cytron Absolute Ortho Auto Biosampler®.

††† Cellomatic Junior.

Cuadro 2

VALORES DE LAS MEDIAS Y ERROR ESTÁNDAR DE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS DE LOS RATONES CD1, et/+ y et/et

Población celular	CD1	et/+	et/et
Leucocitos	*6 305.88 ± 718.2	7471.05 ± 700.2	*9000 ± 742.5
Linfocitos	*3 675.41 ± 503.6	4767.79 ± 507.9	*5 670.26 ± 580.8
Monocitos	*305.52 ± 60.0	542.26 ± 132.8	*644.57 ± 91.3
Neutrófilos segmentados	2 151.24 ± 344.9	1849.21 ± 229.9	2 221.16 ± 262.0
Neutrófilos en banda	4.23 ± 2.7	18.05 ± 8.4	25.73 ± 14.2
Eosinófilos	*154.88 ± 46.4	293.73 ± 66.5	*432.05 ± 114.9
Basófilos	14.58 ± 7.5	0 ± 0.0	2.63 ± 2.6

*P < 0.05 et/et vs CD1

Cuadro 3

VALORES DE LAS MEDIAS Y ERROR ESTÁNDAR DE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS DE LOS RATONES CD 1, et/+ y et/et

Población celular	CD1		et/+		et/et	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Leucocitos	5 675.00 ± 426.9	7 207.14 ± 608.122	6 480.00 ± 824.8	8 572.22 ± 091.3	7 755.56 ± 906.6	1 0120.00 ± 1069.2
Linfocitos	2837.00 ± 356.1	^a 4 873.14 ± 439.8	3 984.50 ± 636.7	5 638.11 ± 733.9	4 467.89 ± 606.7	^b 6 752.40 ± 844.2
Monocitos	378.90 ± 97.7	200.71 ± 40.0	314.80 ± 87.7	795.00 ± 242.8	501.22 ± 116.2	773.60 ± 130.4
Segmentados	2 319.70 ± 394.0	1 910.57 ± 265.5	1 801.50 ± 123.5	1 902.22 ± 480.9	2 144.67 ± 425.5	2 290.00 ± 339.1
Bandas	7.20 ± 4.8	0.00 ± 0.0	15.30 ± 7.8	21.11 ± 16.1	46.66 ± 28.3	6.9 ± 6.9
Eosinófilos	132.2 ± 54.7	187.28 ± 91.8	363.9 ± 115.5	215.77 ± 53.9	589.55 ± 223.6	290.30 ± 73.7
Basófilos	0 ± 0.0	^c 35.42 ± 17.1	0 ± 0.0	0 ± 0.0	5.55 ± 5.5	0 ± 0.0

^aP < 0.01 hembras CD1 vs machos CD1.^bP < 0.05 hembras et/et vs machos et/et.^cP < 0.05 hembras CD1 vs machos CD1.

Cuadro 4

VALORES DE LAS MEDIAS Y ERROR ESTÁNDAR DE LOS PORCENTAJES Y PROPORCIONES DE LAS DIVERSAS POBLACIONES DE LINFOCITOS T DE LOS RATONES CD 1, et/+ y et/et

Población celular	CD 1	et/+	et/et
Linfocitos T4	511.6 ± 84.3	346.8 ± 33.1	375 ± 48.3
Linfocitos T8	169.45 ± 22.3	214.7 ± 34.2	249.95 ± 30.6
Proporción T4:T8	2.54 ± 0.15	1.97 ± 0.15	2.14 ± 0.21
Linfocitos T totales	704.45 ± 114.2	618.7 ± 57.0	(*) 925.75 ± 85.3

*P < 0.05 et/et vs CD 1 y et/+.

Respecto de las poblaciones de células sanguíneas observados en este trabajo se muestran en el Cuadro 2, donde el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los ratones et/et y los CD1 en la población de leucocitos (P = 0.028), así como en los diferenciales de linfocitos (P = 0.047), monocitos (P = 0.018) y eosinófilos (P = 0.027), donde el valor mayor correspondió a los ratones et/et y el menor a los CD1 y no hubo diferencia entre estos dos extremos con los ratones et/+. No se encontraron diferencias en las poblaciones de basófilos, neutrófilos en banda y segmentados; sin embargo, se observó la presencia de neutrófilos con hipersegmentación en 16 de 17 muestras de los ratones et/et, en 2 de 19 de los ratones et/+ y no estuvieron presentes en los CD1; no se observaron diferencias en las poblaciones de células sanguíneas

de los ratones et/+ con relación a los et/et o a los CD1, y sus valores siempre fueron intermedios.

En el estudio estadístico de las poblaciones de células según el sexo de los animales, sólo se encontraron diferencias entre machos y hembras en la población de linfocitos para el grupo CD1 ($P = 0.00728$) y para el grupo et/et ($P = 0.0373$). En los basófilos solamente se encontraron diferencias entre machos y hembras para el grupo CD1 ($P = 0.0334$). No se observaron diferencias para el resto de las poblaciones de células sanguíneas (Cuadro 3).

En el Cuadro 4 se presenta la comparación de las medias de linfocitos T obtenidas al estudiar esta población celular por citofluorometría; al igual que en la biometría hemática se observó un aumento en los linfocitos T totales de los ratones et/et en comparación con las mismas células de los ratones CD1 y et/+; los resultados observados en la proporción de linfocitos T4:T8 no hubo diferencias significativas con los portadores et/+ ni con los CD1; no hubo diferencias en la población de linfocitos T4 y T8 entre las tres variedades de ratón.

Cuadro 5
VALORES DE LAS MEDIAS Y ERROR ESTÁNDAR DE LAS DIVERSAS POBLACIONES DE LINFOCITOS T DE MACHOS Y HEMBRAS DE LOS RATONES CD1 et/+ y et/et

Población celular	CD1		et/+		et/et	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Linfocitos T4	^a 336 ± 36.6	687.3 ± 147.7	317 ± 44.7	376.7 ± 49.2	356.2 ± 47.4	393.8 ± 86.9
Linfocitos T8	150 ± 28.8	188.9 ± 34.5	152.2 ± 21.3	277.2 ± 60.2	202.3 ± 24.7	297.6 ± 53.4
Proporción T4:T8	2.33 ± 0.18	2.75 ± 0.22	1.89 ± 0.16	2.066 ± 0.28	2.3 ± 0.32	1.9 ± 0.29
Linfocitos T totales	^a 442.5 ± 100.6	935 ± 187.8	^b 494.9 ± 47.0	742.5 ± 90.1	809.4 ± 77.1	1442.1 ± 355.6

^a P < 0.05 machos CD 1 vs hembras CD 1.
^b P < 0.05 machos et/+ vs hembras et/+.

Cuadro 6
VALORES DE LAS MEDIANAS DE LOS CONTEOS CELULARES DE BAZO DE RATONES CD 1, et/+ y et/et

	CD1	et/+	et/et
Células de bazo/50 µl	97.5	92	* 43

* P < 0.05 et/et vs CD1

En el Cuadro 5 se resumen los resultados obtenidos por sexo en la citofluorometría de los linfocitos T en los ratones CD1 et/+ y et/et; donde se indica que hubo diferencias en la población de ratones machos CD1 con relación a las hembras CD1 en los grupos celulares CD4 y linfocitos T totales CD3+ ($P \leq 0.05$); asimismo, se observó diferencia en los linfocitos T totales CD3+ de los ratones et/+. No se encontraron diferencias entre los machos y hembras de los ratones et/et.

Una característica importante a resaltar es que en la mayoría de los resultados (excepto en la relación T4:T8

Cuadro 7
VALORES DE LAS MEDIANAS DE LOS CONTEOS CELULARES DE BAZO * DE RATONES MACHOS Y HEMBRAS CD 1 et/+ y et/et

Población celular	CD 1		Et/+		Et/et	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Células de bazo/50 µl	79	122	108	60	34	44.5

* P > 0.05 No hubo diferencias entre los machos y las hembras del mismo genotipo.

de las hembras et/et) el valor mayor correspondió a las hembras en las tres variedades de ratones.

En la cuantificación de las células linfoides en bazo se observaron diferencias significativas al evaluar los resultados (Cuadro 6), donde se puede apreciar un valor menor en el número de células de bazo de los ratones et/et en concomitancia con los CD1.

En la evaluación por sexo de las células de bazo no se encontraron diferencia significativas en los ratones CD1, et/+ y et/et (Cuadro 7).

En el Cuadro 8 se presentan los resultados de la evaluación estadística de las medias de la concentra-

ción de proteínas plasmáticas de los ratones CD 1, et/+ y et/et, donde se observó que el valor de la concentración media de proteínas de los ratones et/et fue significativamente menor con relación a los ratones et/+ y CD1 al aplicar la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Asimismo, en la evaluación por sexo se pudo apreciar que hubo diferencias ($P = 0.04$) en las hembras de los ratones CD1 con relación a los machos de la misma variedad (Cuadro 9). No se observaron diferencias según el sexo de los ratones et/+ y et/et.

Los valores de las medias de los porcentajes de proteína de las fracciones electroforéticas de los rato-

Cuadro 8			
VALORES DE LAS MEDIAS Y ERROR ESTÁNDAR DE LA CONCENTRACIÓN (G/DL) DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EN RATONES CD1, et/+ y et/et			
Variable	CD1	et/+	et/et
Proteínas plasmáticas	7.2 ± 0.139 g/dL	7.3 ± 0.166 g/dL	* 6.8 ± 0.145 g/dL
P < 0.05 et/et vs CD1 y et/+			

Cuadro 9					
VALORES DE LAS MEDIAS Y ERROR ESTÁNDAR DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS g/dl ENTRE MACHOS Y HEMBRAS DE LOS RATONES CD1 et/+ y et/et					
CD1		et/et		et/et	
Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
7.51 ± 0.173	(*) 6.96 ± 0.105	7.26 ± 0.175	7.28 ± 0.157	6.76 ± 0.163	6.70 ± 0.127
* P < 0.05 hembras CD1 vs machos CD1					

Cuadro 10			
VALORES DE LAS MEDIAS Y ERROR ESTÁNDAR DE LOS PORCENTAJES DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DE PROTEÍNAS SÉRICAS* DE LOS RATONES CD 1, et/+ y et/et			
Fracción proteínica	Variedad de ratón		
	CD 1 %	et/+ %	et/et %
Albumina	63.23 ± 2.8	64.82 ± 2.5	62.44 ± 2.8
Alfaglobulinas	5.73 ± 0.7	4.14 ± 1.1	6.21 ± 1.2
Betaglobulinas	22.42 ± 1.6	22.02 ± 1.6	21.82 ± 1.5
Gammaglobulinas	9.22 ± 1.5	9.05 ± 1.3	9.43 ± 1.4
* P > 0.05. No hubo diferencias entre los tres genotipos de ratones.			

Cuadro 11
VALORES DE LAS MEDIAS Y ERROR ESTÁNDAR DE LOS PORCENTAJES DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS SÉRICAS DE MACHOS Y HEMBRAS DE LOS RATONES CD1, et/+ y et/et

Fracción proteínica	CD1 %		Et/+ %		Et/et %	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Albúmina	64.11 ± 2.92	62.15 ± 2.89	63.26 ± 3.29	65.90 ± 1.82	60.43 ± 3.04	64.46 ± 2.75
Alfaglobulinas	6.48 ± 0.80	4.80 ± 0.78	5.46 ± 2.75	3.22 ± 0.56	* 8.94 ± 1.81	3.49 ± 0.69
Betaglobulinas	20.59 ± 1.57	24.72 ± 1.79	22.80 ± 2.06	21.49 ± 1.14	22.40 ± 1.35	21.25 ± 1.65
Gammaglobulinas	8.82 ± 1.30	9.72 ± 1.70	8.57 ± 1.29	9.37 ± 1.41	8.27 ± 1.49	10.59 ± 1.43

* P < 0.05 machos et/et contra hembras et/et.

nes CD1, et/+ y et/et se muestran en el Cuadro 10, donde se observó que no hubo diferencias significativas entre los tres grupos de animales.

Al analizar estadísticamente las diferencias de las medias de la concentración de las fracciones de proteína sérica para machos y hembras no se observaron diferencias significativas en los ratones CD1, et/+, pero sí las hubo en los machos et/et en relación con las hembras en la fracción alfaglobulina (Cuadro 11).

Discusión

Aunque el ratón desnudo et/et presenta valores normales para la especie en las poblaciones celulares sanguíneas y de proteínas, se aprecia una clara diferencia con respecto al ratón CD1.

Krzych *et al.*⁵ señalan que en las diferentes etapas del ciclo estral hay variaciones importantes en el número de células blancas, como la etapa de metaestro, en la que el número de leucocitos de la hembra se asemeja al del macho. Las hembras de las tres variedades de ratones presentaron mayor número de leucocitos que los machos, característica que probablemente se debió a la fase del ciclo estral en que se encontraban los animales.⁵

Duncan y Prase⁶ informan que la hipersegmentación de neutrófilos puede deberse a tres causas: a) A un hiperadrenocortisismo primario o secundario; b) a una terapia prolongada con glucocorticoides; y c) a una deficiencia de vitamina B¹², ácido fólico o cobalto, pero esta última sólo se ha registrado en rumiantes. Con base en la información anterior, la presencia de neutrófilos con hipersegmentación del núcleo (5 < n < 10) en los ratones et/et y en los ratones et/+ se deduce que se debe a la hipersecreción glucocorticoide que se ha registrado en el ratón et/et.

Los trabajos de Rosas¹ y Rosas *et al.*⁷ indican que la hipersecreción de glucocorticoides en los ratones des-

nudos, afectan directamente a la fisiología de los granulocitos de los ratones et/et, lo que también es indicativo de la elevada predisposición a los procesos infecciosos por una deficiencia en los mecanismos de fagocitosis de estas células.⁸⁻¹⁰ El hecho de que el número de monocitos y eosinófilos se encuentre aumentado, apoya la teoría de un mecanismo compensador de la fagocitosis.

El efecto de los glucocorticoides en los linfocitos de los ratones et/et es contrario a lo que señala la literatura¹¹ en la fisiología de esta hormona, ya que se apreció un aumento considerable de la población de estas células en circulación, lo cual podría ser señal de la posible existencia de un mecanismo tímico compensador ante la hipersecreción de hormonas glucocorticoides o a la deficiencia en síntesis o funcionalidad de moléculas de adhesión (integrinas y selectinas) para fijarlos a los órganos linfoides secundarios;¹² si esta última hipótesis es cierta, probablemente la falla radique en las selectinas de los órganos linfoides secundarios, ya que como lo mencionan Dustin y Springer,¹³ las moléculas de adhesión tienen diversas funciones, además de la de fijar las células a los órganos linfoides secundarios, como la locomoción a través de órganos,¹⁴ la interacción entre células en la presentación de antígenos y la adhesión al endotelio vascular y linfático; esta opción se considera como la más viable debido a las observaciones realizadas, donde los ratones et/et presentaron el menor número de células linfoides en bazo.

El incremento en la hemoconcentración observada en los ratones et/et durante la evaluación del hematócrito puede deberse a diversas causas; una de ellas es la elevada predisposición a la deshidratación que tienen los ratones et/et, la cual ha sido observada durante la recría de los animales. Chastain¹¹ menciona un efecto diurético de los glucocorticoides y un bloqueo del ingreso de agua a las células, lo cual podría justificar la deshidratación que se ha observado durante la recría de los animales, pero, por otro lado, se puede producir una policitemia

secundaria inapropiada por un hiperadrenocortisismo donde la policitemia se debe al efecto compensador del cortisol sobre la eritropoyetina en la médula ósea, lo cual también es mencionado por Chastain;¹¹ cualquiera de las dos justificaciones sobre la concentración de células sanguíneas se consideran viables debido a que también se presentó en los ratones portadores et/+, los cuales también manifestaron efecto glucocorticoide al presentar neutrófilos con hipersegmentación.

No existen alteraciones en la inmunidad humoral de los ratones et/et ni en los et/+, ya que todos los valores de la fracción gamma son semejantes en las tres líneas de ratones.

En suma el análisis de los resultados indican que: a) Los ratones et/et presentan dentro de sus características genéticas una leucocitosis circulante con linfocitosis, monocitosis y eosinofilia y una linfopenia en bazo, así como la hipersegmentación de neutrófilos; se considera como una posibilidad que esta última característica sea el factor involucrado en la predisposición de los ratones et/et a los procesos infecciosos por una deficiencia en los procesos fagocíticos; b) algunos de los valores del hemograma pueden ser útiles en la identificación de la heterocigosis de los ratones portadores del gen et.

Agradecimientos

A Mario Cruz Cruz, por su apoyo en el trabajo de laboratorio y a Jorge Salgado García, por el apoyo brindado en el cuidado y mantenimiento de los animales empleados en esta investigación.

Referencias

1. Rosas P. Estudio de las características reproductoras de ratones desnudos hipotímicos y la vinculación del timo con la regulación neuroendocrina de la reproducción (tesis de doctorado). México (DF) México: Facultad de Ciencias. UNAM, 1990.

2. Rosas P, Castellanos P, Dominguez R. The existence of spontaneous hairless (nude) hypothyroid mutant mice from the CD1 strain reared under conventional animal house conditions. *Med Sci Res* 1987;15:553-554.
3. Marques de Cantú MJ. Probabilidad y estadística para las ciencias químico-biológicas. Predicción. México (DF): McGraw-Hill, 1990.
4. Davidsohn I, Bernard HJ. Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6a ed. México (DF): Salvat Editores, S.A. 1978.
5. Krzych U, Strausser H, Bressler J, Goldstein A. Effects of sex hormones on some T and B cell functions as evidenced by differential immune expression between male and female mice and cyclic pattern of immune responsiveness during the estrous cycle. In: Liss A, editor. *Reproductive immunology*. New York: Alan R. Liss Inc., 1981:145-150.
6. Duncan JR, Prase KW. *Veterinary laboratory medicine*. 2nd ed. Ames (Ia): Iowa State University Press, 1988.
7. Rosas P, Chavez R, Cruz ME, Dominguez R. Sex differences in serum corticosterone levels and circadian rhythms between hairless et/et mutant and CD 1 adult mice. *Med Sci Res* 1989;17:283-284.
8. Daynes RA, Araneo BA, Hennebold J, Enioutina E, Mu HH. Steroids as essential regulators of the mammalian immune response. *J Invest Derm* 1995;105:14S-19S.
9. Felsburg PJ. Overview of the immune system and immunodeficiency diseases. *Vet Clin North Am* 1994;24:629-654.
10. Minton JE, Blecha F. Effect of acute stressors on endocrinological and immunological functions in lambs. *J Anim Sci* 1990;68:3 145-3 151.
11. Chastain C.B. Corticoterapia. En: Ettinger SJ, editor. *Tratado de medicina interna veterinaria*. Tomo I. 3a ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Intermédica, 1992:443-459.
12. Molad Y, Haines KA, Anderson DC, Buyon JP, Cronstein BN. Immunocomplexes stimulate different signaling events to chemoattractants in the neutrophil and regulate L-selectin and beta 2-integrin expression differently. *Biochemistry* 1994;299:881-887.
13. Dustin M, Springer TA. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Ann Rev Immunol* 1991;9:27-66.
14. Collins T. Adhesion molecules in leucocyte emigration. *Sci Med* 1995;2:28-37.