



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA**

**MECANISMO DE ACCION DEL FACTOR TIMICO  
QUE MODULA LA ESTEROIDOGENESIS  
EN EL TESTICULO DE LA RATA**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**BIOLOGO**

**P R E S E N T A**  
**ADRIANA MONICA MEJIA CARRILLO**



**MEXICO, 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.

## INDICE

RESUMEN -----	1
INTRODUCCION -----	3
Inmunidad -----	3
Timo -----	4
Función del Timo -----	8
Hormonas Tímicas -----	11
Mecanismo de acción de las hormonas del Timo -----	14
Influencia del sistema endócrino sobre el Timo -----	15
Influencia del Timo sobre las glándulas del aparato reproductor -----	18
Testículo -----	23
Células de Leydig -----	24
Características de la hormona luteinizante (LH) y de la Gonadotropina corionica humana (hCG) -----	27
Mecanismo de acción de LH/hCG a nivel de la gónada masculina -----	27
Antecedentes experimentales -----	33
HIPOTESIS -----	35
OBJETIVOS -----	36
MATERIALES Y METODOS -----	37
Animales -----	37
Medio de incubación -----	37
Cromatografía de filtración molecular -----	38
Bioensayo en suspensión en células testiculares -----	40

Preincubación -----	41
Radioinmunoanálisis de testosterona -----	44
Estadística -----	44
<b>RESULTADOS</b> -----	<b>45</b>
Estandarización de técnicas -----	45
Estudios de la actividad de la Fracción del medio incubación de timo (FrMIT) -----	45
Efecto de la Fracción del medio de incubación de timo (FrMIT) sobre la esteroidogénesis estimulada con forskolin -----	50
Efecto de la Fracción del medio de incubación de timo (FrMIT) sobre la esteroidogénesis estimulada con Adenosín monofosfato cíclico (AMPC) -----	52
Efecto de la preincubación de las células de testículo y de la Fracción del medio de incubación de timo (FrMIT) (FrMIT) sobre la esteroidogénesis estimulada con hCG ---	56
<b>DISCUSION</b> -----	<b>61</b>
<b>CONCLUSION</b> -----	<b>66</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> -----	<b>67</b>

## RESUMEN

El timo es capaz de producir una serie de factores u hormonas entre ellas, la timulina, y la timopoyetina las cuales participan principalmente en la regulación de la función inmunológica, además de tener influencia sobre otros sistemas como el nervioso y el endócrino.

Se ha mostrado la presencia de un Factor Timico (FT) de naturaleza protéica con peso molecular cercano a los 30 kDa en el extracto acetónico del timo de ratas macho prepúberes, que es capaz de inhibir *in vitro* la esteroidogénesis estimulada con hCG en una suspensión de células de testículo de rata adulta. Este Factor Timicoproduce una inhibición de tipo competitiva con el receptor, sin afectar el número de receptores para la LH en el testículo.

En la presente tesis se profundizó en el estudio del mecanismo por el cual el Factor Timico afecta la producción de testosterona dependiente de hCG en el testículo de la rata.

Mediante cromatografía de filtración molecular se obtuvo una fracción de aproximadamente 30 kDa del medio de incubación del timo (FrMIT). Se investigó la actividad de esta fracción sobre la secreción de testosterona utilizando el bioensayo de células de testículo. La testosterona fue cuantificada mediante la técnica de radioinmunoanálisis.

Los resultados mostraron que la actividad biológica del FrMIT y del FT es igual aun cuando la obtención de estos factores sea por métodos diferentes, y que la FrMIT es capaz de modular la secreción de testosterona inducida con forskolin y 8-bromo AMPc. La preincubación de las células testiculares en presencia de la FrMIT produce una desensibilización de las mismas a la estimulación posterior con hCG. Para que este efecto se produzca es necesario que las células sean expuestas a la FrMIT por un tiempo de dos horas o más. Estos resultados en conjunto sugieren que la FrMIT disminuye la respuesta a hCG desensibilizando a las células testiculares al estímulo con esta gonadotropina.

## INTRODUCCION

### INMUNIDAD

La inmunidad es la capacidad que tiene el organismo de contrarrestar mediante mecanismos fisiológicos aquellos estímulos ambientales dañinos que, con frecuencia, son microorganismos patógenos o sus toxinas. Mediante el sistema inmunológico el sujeto es capaz de reconocer y distinguir entre lo propio y lo ajeno a sí mismo, eliminando selectivamente a los elementos extraños (Tortora y Anagnostakos, 1984).

El sistema inmune puede ser subdividido en sistema inmune no específico, (también conocido como sistema innato o natural), y el sistema inmune específico (conocido como sistema inmune adquirido). El no específico comprende todas las reacciones que no son antígeno-dependientes, e incluye, fagocitosis de bacterias y otros invasores por los glóbulos blancos y las células de los tejidos del sistema de macrófagos, resistencia de la piel a la invasión por gérmenes, presencia en la sangre de ciertos compuestos químicos que se fijan en los microorganismos extraños o a las toxinas y los destruyen, mientras que en las reacciones del sistema inmune específico están involucradas las células T, las células B y los anticuerpos; todos ellos funcionan por un mecanismo antígeno-dependiente (Robbins, 1975). La inmunidad adquirida está basada en las propiedades especiales de los linfocitos, los cuales pueden responder selectivamente a diferentes antígenos o moléculas extrañas; además tiene la capacidad de originar una memoria específica y un patrón

de respuesta adaptativa. En la mayoría de las ocasiones se ejercen interacciones entre los anticuerpos con el complemento y las células fagocíticas; e interacciones de los linfocitos T con los macrófagos para dar una respuesta inmunológica más eficaz ante un agente extraño.

Existen dos tipos básicos, en uno de ellos la inmunidad depende de la síntesis de anticuerpos por los linfocitos B (inmunidad humoral), el segundo tipo se logra por formación de gran número de linfocitos activados programados de manera específica para destruir al agente extraño, siendo mediado por linfocitos T (inmunidad celular) (Hood y Hood, 1978; Roitt, 1980).

#### TIMO

El timo es uno de los órganos linfoides más importantes del sistema inmune, se encuentra situado en la porción superior del mediastino anterior y superior, por delante de los grandes vasos que salen del corazón. Al frente y lateralmente el timo limita con los bordes de los pulmones, por detrás con la tráquea y por debajo llega hasta el pericardio (Ham y Cormack, 1987).

La porción endodérmica se origina del tercer par de bolsas faríngeas, las cuales penetra junto con el ectodermo adherido al mesodermo circundante, iniciándose así la formación del timo junto con la de las glándulas paratiroides (Langman, 1976). El timo rudimentario migra hacia abajo para localizarse en la cavidad pleural; posteriormente células mesodérmicas lo penetran. Durante



su migración, el timo es poblado por linfoblastos, antecesoras de los linfocitos T. Estas células precursoras provienen del tejido hematopoyético de la médula ósea, y se observa que durante el desarrollo posterior del timo, estas células se organizan dentro de la capa cortical, que tiene un grosor de 2 a 10 células, y comienzan a dividirse para generar los diferentes tipos de linfocitos del timo (Goldstein y col. 1972). En la madurez del órgano el 99% del tejido que lo forma está constituido por linfocitos. En condiciones normales, los linfocitos tímicos se clasifican en grandes linfocitos de la corteza externa (5%), pequeños linfocitos o linfocitos maduros (85%), localizados tanto en la corteza como en la médula, y linfocitos medulares medianos (10%) (Hood y Hood, 1978; Klein, 1982).

El timo maduro es una glándula organizada en dos lóbulos constituidos por una malla de células epiteliales, que forman espacios perivasculares entre el endotelio capilar y la envoltura epitelial; en esta malla de células epiteliales se encuentran dispuestos los linfocitos. Los lóbulos al tabicarse por el tejido conectivo se dividen en lobulillos; la tabicación no es completa y permite cierta continuidad entre éstos. En cada lobulillo se pueden distinguir dos zonas; una interna que es la médula y una externa que es la corteza; esta última se puede dividir, desde un punto de vista histológico, en dos subzonas; La corteza externa y la corteza profunda (Bellanti, 1978; Hood y Hood, 1978).

Corteza.-la inmensa mayoría de la población celular de la corteza está constituida por linfocitos. Entre ellos se encuentran formas grandes, medianas y pequeñas. Los macrófagos representan un componente pequeño, pero constante de la población celular cortical; están diseminados por la corteza y en la mayoría de los mamífero, con excepción del ratón, aumentan en número en la frontera entre la corteza y la médula. Las células reticuloepiteliales son de forma estrellada y poseen características endócrinas ya que secretan polipéptidos como la timopoyetina, que es un inductor de la maduración de los linfocitos T (Bellanti, 1978; Hood y Hood, 1978).

Médula.- Las células reticuloepiteliales son aquí extremadamente variables en su forma. En algunas áreas, mantienen su figura estrellada y contienen numerosos haces de filamentos intermedios. En otras, son más grandes y tienen un citoplasma pálido y una infinidad de prolongaciones citoplasmáticas; algunas son redondas, otras aplanadas y enrolladas unas sobre otras, dando origen a las estructuras conocidas como corpúsculos tímicos o corpúsculos de Hassall. A su vez las células de la pared central de un corpúsculo de Hassall pueden degenerar o calcificarse. Los linfocitos de la médula son mucho menos abundantes que los de la corteza y predomina la variedad pequeña. En la médula del timo llegan a encontrarse algunos granulocitos en particular eosinófilos, en número pequeño; los macrófagos son raros y las células plasmáticas están ausentes (Fig.1) (Hood y Hood, 1978).

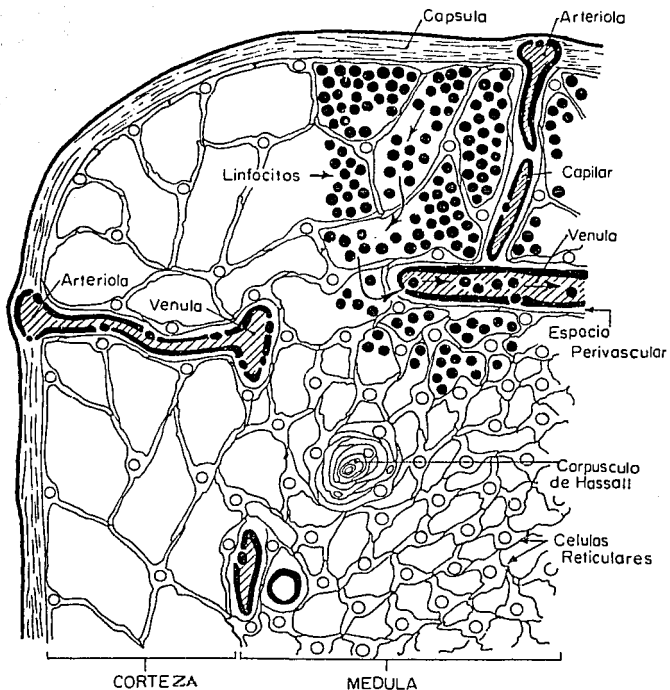


Fig. 1: Representación de la glándula del timo y de las estructuras presentes tanto en la Médula como en la Corteza de cada lobulillo. Tomada de Bellanti, 1978.

El tamaño del timo depende de la edad del individuo, así se ha reportado que esta glándula alcanza su tamaño máximo hasta la pubertad. Después de ésta etapa comienza a involucionar, fenómeno que continua hasta la senectud. En el humano al nacer la glándula pesa entre 10 a 15 g y de 30 a 40 g en la pubertad. Durante la involución del timo se produce en primer término una pérdida gradual de los linfocitos de la corteza y como resultado se borran los límites entre corteza y médula. Los timocitos y las células reticulares son substituidas paulatinamente por tejido adiposo. Algunos elementos constitutivos del timo, como son los corpusculos de Hassal, aún pueden apreciarse en edad avanzada (Bellanti, 1978; Golstein y col. 1972).

#### FUNCION DEL TIMO

Se ha demostrado la existencia de una interdependencia entre el timo y el mecanismo de respuesta inmunológica, ya que la extirpación del timo en animales recién nacidos ocasiona alteraciones como son pérdida de peso, seguida por deterioro de las condiciones físicas y reducción de la población de linfocitos en ganglios, bazo y en la sangre con pérdida de algunas respuestas inmunológicas tales como el rechazo a un transplante heterólogo de tejido, incapacidad para producir anticuerpos y finalmente se produce la muerte. (Miller, 1964; Miller y Osoba, 1967; Osoba, 1965a). Se ha reportado que estos cambios pueden revertirse total o parcialmente con el implante del timo o al administrar algunos extractos que han sido obtenidos de este órgano, si se realizan en

los 2 o 3 días posnatales (Asanuma y col. 1969; Goldstein y col. 1971).

En la Tabla 1 se muestran algunas de las funciones del timo y algunos desórdenes relacionados con deficiencias de este órgano. Se ha reportado en ratones timectomizados al nacimiento una recuperación efectiva de la capacidad inmunológica, cuando se les injertan cápsulas Millipore en el tejido subcutáneo, las cuales contienen timos obtenidos de ratones de 1 a 8 días de nacimiento. Estos resultados apoyan la idea de que el timo produce factores u hormonas que poseen actividad inmunológica, los cuales participan en la maduración del sistema inmune por un mecanismo endócrino, ya que la cápsula no permite el paso de células. La causa de dicha recuperación podría atribuirse entonces a los factores endocrinos que libera el timo (Osoba, 1965b; Osoba y Miller, 1964).

Trainin en 1974 propuso la existencia de un factor producido por el timo que podría actuar sobre el sistema linfóide estimulando la linfopoyesis, induciendo inmunocompetencia en los linfocitos circulantes o por ambos mecanismos de forma simultánea.

Se ha demostrado ya ampliamente que el timo tiene varias funciones importantes en la inmunidad. Una de ellas es la participación en el proceso de proliferación y/o diferenciación de prolinfocitos, que bajo su influencia, secreta polipéptidos del tipo de la timopoyetina, maduran transformándose en linfocitos T. Otra función importante es la producción de uno o varios factores

**Tabla 1 .- Síndromes clínicos relacionados con deficiencias en el timo.**

FUNCIONES NORMALES DEL TIMO.	MANIFESTACIONES PATOLÓGICAS DE DEFICIENCIAS.
Desarrollo de competencia inmunológica.	Síndrome de deficiencia inmunológica.
Regeneración de competencia inmunológica.	Enfermedades Autoinmunes.
Mantenimiento de competencia inmunológica.	Neoplasias relacionadas a la falta de respuesta -- autoinmune.
Producción de factores estimulantes de la médula ósea.	Timoma, agamaglobulinemia con aplasia eritroide.
Regulación de la actividad endócrina en hipotálamo, hipófisis suprarrenal, tiroides y gónadas.	Disgenesia ovárica, infertilidad.
Producción de factor hipoglucemiante	Hipoglucemia en leucemia.
Producción de factor de permeabilidad.	Reacciones de hipersensibilidad retardada.
Producción de factores inhibitorios de la -- transmisión retardada.	Mieloma grave.

Tomada de Ambrus v Ambrus, 1973

u hormonas, esenciales para la maduración de los linfocitos T inmunocompetentes (Asanuma y col. 1969; Osoba y Miller, 1964; Trainin, 1974).

#### HORMONAS TIMICAS

El timo es un órgano endocrino que participa en los mecanismos inmunitarios a través de los linfocitos T. y de la por la liberación de péptidos. Ejemplos de éstos son: una familia de péptidos acidícos llamados timosinas el Factor Tímico Humoral (FTH), el Factor Tímico X (FTX) y la Timoestimulina (Goldstein y col. 1981; Trainin y col. 1983). En la tabla 2, se presentan algunas de las características de estas hormonas tímicas.

En 1975 fué estandarizada la fracción 5 de Timosina por Hooper y Goldstein; usando el método de enfoque isoeléctrico de dicha fracción de timosina se reveló la presencia de cierto número de componentes en la preparación; como la Timosina  $\alpha_1$ , que se localiza en las células epiteliales de la médula del timo y es el primer péptido presente en la región alfa. Este péptido es potencialmente activo en la amplificación de la inmunidad de los linfocitos T y en la modulación de la expresión de la desoxinucleotidiltransferasa terminal (Tdt) (Goldstein y col. 1977; Low y col. 1979; Dames y col. 1987).

La timosina  $\beta_4$ , que se localiza en las células de la superficie cortical, es el primer péptido activo de la región beta de la fracción 5 de la timosina (Low y col. 1981).

Tabla 2.- Preparaciones tímicas y sus efectos biológicos.

PREPARACION TÍMICA.	PROPIEDADES QUÍMICAS.	EFFECTOS BIOLÓGICOS.
Fracción 3 de Timosina.	Familia de polipéptidos ácidos estables al -- calor P.M. 1000-15000.	Induce la diferenciación de cél. T, incrementa incapacidades del sistema inmune
Timosina $\alpha 1$	Polipéptido de 28 ---- residuos P.M. 2102 P.I. 4.2, secuenciado.	modula actividad Idi de timocitos, 10 veces más potente en algunas de - las acciones de la fra- cción 3 de timosina.
Timosina $\beta 4$	43 residuos P.M. 4082 P.I. 5.1, secuenciado.	Induce actividad Idi in vivo e in vitro - en células de médula Ósea en ratón normal y atímico.
Timosina $\alpha 7$	P.M. 25000 P.I. 3.5	Induce la maduración de células T ----- supresoras.
Factor Tímico Humoral (FTH)	P.M. 8200 P.I. 5.7 secuenciado.	Aumenta los timocitos promueve la maduración de células T observadas por aloreactividad y - reacción mitógena.
Timopoyetina.	49 residuos P.M. -- 5562 secuenciado.	Induce marcadores de - células T en un grupo- de células de la médula Ósea, aumenta la ---- función de varias ---- células T.
Factor Tímico X	Polipéptido P.M. - 4200 secuenciado.	Incrementa el número de células T en sangre y - retrasa la ----- hipersensibilidad.
Hormona Tímica	Glicopéptido P.M.- 1800-2500.	Suprime el deterioro -- que causa la timectomía y restaura la ----- hipersensibilidad.
Factor Tímico (FT).	Proteína de aprox. 90 kDa P.I. 4.7 secuenciado.	Modula la producción de testosterona y LH in vitro

Tomada de Goldstein y col. 1981.



La timosina  $\alpha$  7 que se observa en los corpúsculos de Hassall y células epiteliales adyacentes a los mismos es un potente inductor de las células T supresoras (Tanka, 1986).

En otros experimentos, Goldstein y col. (1978) demostraron la efectividad de la fracción 5 de timosina para inducir la diferenciación de subclases específicas de timocitos T (Células asesinas, coadyuvantes y supresoras).

Además de las timosinas, otros factores con actividad humoral han sido aislados del tejido tímico y de la sangre; como el Factor Tímico Sérico (FTS), la Timopoyetina, el FTX (que incrementa el número de células T y la recuperación de la hipersensibilidad retardada *in vitro* e *in vivo*), y la Hormona Tímica homeostática (HTH) (Goldstein y col.1981). En el humano desde el nacimiento hasta los 13 años de edad, el timo tiene una alta concentración de timosina  $\alpha$ 1, la cual va disminuyendo en los sujetos conforme avanza el proceso de envejecimiento. La fracción 5 de timosina decae hasta después de los 30 años de edad. (Hirokawa y col. 1982; Schuurman y col.1985).

Comsa (1973), observó que la HTH en la rata decae después de los 30 días de edad; en humanos la máxima actividad de esta hormona se observa antes del primer año de vida, y disminuye en forma paulatina conforme los sujetos se acercan a la pubertad.

## MECANISMO DE ACCION DE LAS HORMONAS DEL TIMO.

Es muy poco lo que se conoce acerca del mecanismo de acción de las hormonas del timo. Se ha observado que el FTS en los linfocitos T promueve una elevación del AMPc intracelular (Bach y Dardenne, 1975). El FTH también incrementa las concentraciones de AMPc y simultáneamente incrementa la inmunocompetencia de las células del bazo. De acuerdo con Kook y Trainin (1974), el nucleótido cíclico actuaría como segundo mensajero ya que su concentración se eleva rápidamente desde los primeros minutos.

En los linfocitos de los animales timentomizados en la etapa neonatal, se encuentra muy disminuida la actividad de la adenilato ciclasa la que aumenta en presencia del FTS (Kook y Trainin, 1974). La timopoyetina es otra de las hormonas tímicas que aumenta el AMPc intracelular. Las timosinas actúan aumentando el GMPc en los timocitos murinos, sin alterar el AMPc, para que se obtenga la máxima respuesta a estas hormonas, que se alcanza entre los 5-10 minutos, para lo cual requiere de calcio en el medio (Naylor y col. 1979).

Dates y Goldstein (1984) han observado que tanto la fracción 5 de timosina como la Timosina  $\alpha 1$ , estimulan la síntesis de PGE2 en linfocitos inmaduros. El FTH induce la adquisición de la respuesta inmune que consiste en una serie de eventos bioquímicos, incluyendo el incremento rápido en la actividad de la adenilato ciclasa y de las concentraciones intracelulares de AMPc (Trainin y col. 1983).

El mecanismo de acción molecular que utilizan las hormonas Tímicas es muy controvertido, debido fundamentalmente a la variada población que es blanco de su acción (Bach y Goldstein, 1980). En la tabla 3 se detallan los cambios que inducen algunas de estas hormonas en los nucleótidos cíclicos (Trainin y col. 1983).

#### INFLUENCIA DEL SISTEMA ENDOCRINO SOBRE EL TIMO

Puesto que un órgano endócrino puede funcionar de manera sinérgica y/o antagónica con otros órganos endócrinos, es entonces razonable que al extraer las gónadas se produzcan alteraciones en el desarrollo y función de otros órganos endócrinos. Esto se ha comunicado ya desde el siglo pasado por Calzolari (1898), quien observó que la castración en conejos produce un incremento significativo en la masa del timo. En ratas prepúberes la castración retarda la atrofia del timo e incluso causa hipertrofia tímica (Castro, 1974; Chiodi, 1940). Por otro lado, si la castración es realizada después de la pubertad se revierte la atrofia del timo, y éste incrementa su peso (Chiodi, 1976; Castro, 1974). Cuando se castran ratas viejas, el timo se regenera y se observa una imagen histológica cercana a la normal, está vascularizado y lleno de timocitos. Estos cambios se hacen evidentes alrededor de 30 días después de la castración (Fitzpatrick y col. 1985).

La magnitud de la regeneración del timo parece ser de cierta manera dependiente del sexo, ya que al gonadectomizar ratas de diferente sexo, se observa que la regeneración del timo es más

pronunciada en machos que en hembras, produciéndose no solamente hipertrofia tímica sino también un incremento en la población de células T y B del bazo (Utsuyama y Hirokawa, 1989).

Se ha reportado que la involución del timo se debe a factores hormonales, específicamente a los esteroides secretados por las gónadas y las adrenales. Así el tratamiento con esteroides gonadales en animales prepúberes previamente castrados, reduce significativamente el tamaño del timo, siendo los más efectivos la testosterona y el estradiol (Fitzpatrick y Greenstein, 1987; Gillete y Gillete, 1979). La administración de estradiol durante la vida fetal o en la etapa neonatal origina involución del timo, lo que provoca asimismo alteraciones en la inmunidad celular y disminución de la población de linfocitos tímicos (Screpanti y col. 1982). Se ha demostrado la existencia de receptores a andrógenos, estrógenos y progesterona en la matriz epitelial del retículo tímico, lo que apoya la posibilidad de que los responsables de la atrofia tímica, que se inicia después de la pubertad, sean los esteroides sexuales (Fitzpatrick y col. 1985; Grossman y col. 1979; Pearce y col. 1983).

Stimson y Crilly (1981) trabajaron con cultivos de células retículo-epiteliales de timo de rata a los que agregaron varias concentraciones de estradiol, de testosterona o de progesterona. Evaluaron el efecto del sobrenadante, ensayándolo sobre células del timo, nódulo linfóide y bazo y encontraron que a excepción de la progesterona, los esteroides indujeron cambios en

la secreción de factores inmunorreguladores siendo el efecto dosis- dependiente Este estudio no solamente confirma la producción de factores reguladores por el cultivo de células reticulo-epiteliales, sino que además muestra que la secreción de éstos es modulada por la presencia de estrógenos y andrógenos.

Savino y col. (1988), cultivaron células epiteliales tímicas de humanos y ratas demostrando que todos los esteroides gonadales en un rango de dosis fisiológica, estimulan la producción de timulina siendo los más eficientes progesterona y estradiol; probando así que las hormonas esteroides pueden actuar directamente sobre células epiteliales tímicas modulando la producción endocrina.

Dardenne y col. (1986), observaron que al castrar ratas macho las concentraciones de Timulina en suero decrecen a medida que transcurre el tiempo. Simultáneamente observaron que al administrar andrógenos en los mismos se restauran las concentraciones de Timulina a valores normales, lo que sugiere un papel estimulatorio para los esteroides sexuales en la regulación de la producción de hormonas tímicas que puede involucrar un control regulado por el eje hipótalamo-hipófisis-gónada-timo. Estos resultados se ven apoyados a su vez por Grossman (1985), el cual observa también la interrelación de la regulación de los sistemas inmunológico y reproductivo.

## INFLUENCIA DEL TIMO SOBRE LAS GLANDULAS DEL APARATO REPRODUCTOR

El concepto de regulación unidireccional del timo por las gónadas, ha sido ampliado por evidencias experimentales que sugieren que esta regulación no es únicamente uni sino bidireccional ya que se ha demostrado que el timo es necesario para el buen desarrollo de la gónada.

En el ratón macho timectomizado en la etapa neonatal, no se observaron cambios aparentes en el testículo, ni en peso, ni en la citoarquitectura de los túbulos seminíferos o de las células de Leydig (Nishisuka y Sakakura, 1969;1971). Sin embargo, más recientemente Hattori y Brandon (1979), observaron que las ratas timectomizadas en el periodo neonatal presentan testículos pequeños con un intersticio edematoso, reducción en el diámetro de los túbulos seminíferos, completa ausencia de espermatogénesis y desaparición de espermatozoides del epidídimo. También describieron infiltración linfocítica en la hipófisis, tiroides y próstata, lo que en general sugiere que en estos animales se presenta esterilidad. Asimismo Deschaux y col. (1979) encontraron reducción del peso testicular al timectomizar ratones en etapa neonatal.

La timectomía realizada en ratas hembras en la etapa neonatal produce una considerable disgenesia ovárica, caracterizada por rápida pérdida de ovocitos y subsecuente disminución en el número de folículos y cuerpos lúteos (Nishisuka

y Sakakura, 1969;1971). Se observó además, una disminución de las concentraciones séricas de la hormona luteinizante (LH), hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona del crecimiento (GH). Estos efectos se podían prevenir si se realizaban injertos tempranos de timo, bazo o bien por inyecciones de una suspensión celular de estos órganos linfoides (Michael, 1979; Michael y col.1980).

En los ratones hembra congénitamente atímicos *nude* también se observa disgenesia ovárica y retraso en el desarrollo puberal, caracterizado por apertura vaginal retardada y marcada disminución de la fertilidad; además presentan disminución de la producción de gonadotropinas (Rebar y col.1980). Todo lo anterior se corrige con transplante de timo en el período neonatal, (Rebar y col.1981).

En los ratones macho *nude* se ha observado una disminución en la producción de gonadotropinas, que es mayor a los 40 días, momento previo a la maduración sexual, y que persiste hasta la madurez. También se produce una disminución en las concentraciones séricas de testosterona probablemente secundarios a la falta de estimulación por las gonadotropinas. En esta cepa, los machos son fértiles, a diferencia de las hembras que presentan problemas de fertilidad. Aunque precariamente, la disminución en la producción de gonadotropinas también puede prevenirse mediante el transplante temprano de timo (Rebar, 1982). Por lo anterior, se infiere que el modelo *nude* no se comporta exactamente igual que el de los animales timentomizados, lo cual enfatiza la complejidad de la interacción Timo-Sistema reproductor y de la dificultad de su estudio.

Farrokhi y col. (1988) encuentra en sus estudios substanciales diferencias entre comportamiento hormonal de ratas hembras y machos. Al timectomizar en el periodo neonatal ratas macho y hembra observó que las concentraciones de LH y Prolactina (PRL) en plasma no se modificaron en los machos, pero si en las hembras en el periodo pre y postpuberal. Las gonadotropinas de la hipófisis no se alteraron en hembras timectomizadas, excepto a los 90 días de edad. En cambio en los machos timectomizados de 60 y 90 días de edad la concentración de LH y PRL disminuyo significativamente.

Michael y col. (1980), encontraron que en ratones hembra timectomizados neonatalmente produjo disgenesia del ovario entre los 20 a 24 días de edad, observandose también una importante disminución de las gonadotropinas hipofisiarias LH, FSH y GH entre los días 19 y 20 de edad.

Experimentos *in vitro* utilizando un modelo de perfusión para el sistema hipotálamo-hipófisis muestran que dos hormonas tímicas, la fracción de Timosina 5 y la timosina B 4, estimulan la liberación de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo. estimulando a su vez la liberación de LH por la hipófisis. ( Spangelo y col. 1987). La Fig.2 muestra un esquema de la interacción bidireccional Timo-Glándulas endocrinas, en el que la activación de la liberación de GnRH del hipotálamo por las hormonas tímicas estimula la liberación de LH de la hipófisis y a su vez esta hormona estimula la producción de esteroides sexuales



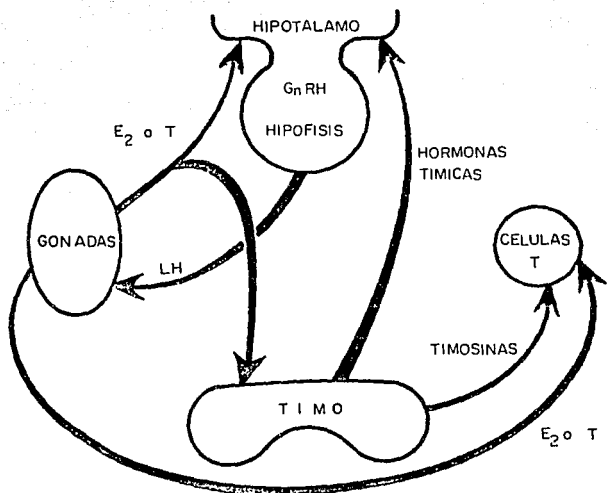


Fig. 2: Representación de la interacción bidireccional Timo-Glándulas endocrinas, donde la liberación de GnRH estimula la liberación de LH y está estimula la producción de esteroides sexuales, los que a su vez afectan al timo a la manera de un mecanismo de retroalimentación negativa. Tomada de Grossman y Roselle, 1983.

**TABLA 3.- Cambios que inducen algunas hormonas tímicas en los nucleótidos cíclicos.**

FACTOR TÍMICO	ELEVACION DE AMPc.	ELEVACION DE GMPc.	RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS.
Fracción 5 de Timosina.	-	+	Timo
$\alpha 1$	-	-	
$\beta 1$	-	-	
Timopoyetina	+ -	+	Nodulo linfoide
THF	+	N.R	Timo
FST	-	N.R	

(-) No produce cambios.

(+) Incrementa los niveles del nucleótido.

NR No reportado.

Tomada de Trainin y col. 1983.

por la gónada, los que afectan a su vez al timo; a la manera de un mecanismo de retroalimentación negativo (Grossman y Roselle, 1983; Michael y Chapman, 1990).

#### TESTICULO.

Los testículos son parte del aparato reproductor masculino, junto con diversos conductos que almacenan y transportan el semen y algunas glándulas accesorias, como las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales (glándulas de Cowper) (Tortora y Anagnostakos, 1984).

El testículo es una glándula lobular compuesta, rodeada por una gruesa cápsula fibrosa, la túnica albugínea, que se extiende en sentido interno y divide a cada testículo en un conjunto de compartimientos internos a los que se denomina lobulillos testiculares. Cada lobulillo está constituido por uno o cuatro túbulos seminíferos sumamente retorcidos, éstos constituyen la porción exócrina del testículo, que es en esencia una glándula citógena, cuyo producto de secreción holocrina está formada en gran parte por células completas, los espermatozoides, los que allí inician su desplazamiento en un conjunto de conductos. Las células de Sertoli que se encuentran incluidas entre los espermatozoides en desarrollo en los túbulos, producen secreciones que aportan nutrientes a los propios espermatozoides. Entre uno y otro túbulo seminífero se observan agrupamientos de células intersticiales o de Leydig, las cuales constituyen el tejido endocrino del testículo (Fawcett, 1988).

El testículo secreta principalmente esteroides andrógenicos, de los cuales el más importante es la testosterona; produce además androstenediona y dihidroepiandrosterona. Además de andrógenos el testículo secreta estrógenos, los cuales son producidos tanto por la célula de Leydig como por la de Sertoli por aromatización de la testosterona (Dufau, 1988; Eik-Nes y Hall, 1965).

Los testículos se desarrollan en una fase temprana de la vida embrionaria a partir de la pared dorsal de la cavidad abdominal y más tarde descienden hacia el escroto, que es la estructura de sostén de los testículos.

#### CELULAS DE LEYDIG

Las células de Leydig son el componente endócrino del testículo, se localizan en los espacios angulosos situados entre los tortuosos túbulos seminíferos. Las células de Leydig son ordinariamente de forma poliédrica irregular, de 14 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro cuando están apretadas unas contra otras; pero en la periferia de los grupos o cuando aparecen separadas, pueden ser alargadas o fusiformes. El gran núcleo esférico contiene una pequeña cantidad de heterocromatina dispuesta periféricamente y uno o dos nucleolos llamativos; son frecuentes las células binucleadas. Junto al núcleo, hay un área grande y clara que está ocupada por un aparato de Golgi bien desarrollado. Las mitocondrias son abundantes y muy variables de forma y de tamaño. El citoplasma es acidófilo en las preparaciones ordinarias y puede

contener varias vacuolas, de las que han sido extraídas las gotitas de lípidos por los solventes utilizados en las preparaciones histológicas. Estas vesículas contienen ésteres de colesterol, los cuales son hidrolizados por esterasas solubles en el citoplasma que rodea a las inclusiones lipídicas, proveyendo de esta manera el colesterol libre necesario para la biosíntesis de esteroides. Al igual que en otras células endocrinas secretoras de esteroides, el rasgo estructural más llamativo de las células intersticiales es la riqueza en retículo endoplásmico liso. Esta vasta área contiene muchas de las enzimas necesarias para la biosíntesis de esteroides, lo que permite a las células de Leydig secretar en promedio 10000 moléculas de testosterona por segundo.

Las células de Leydig sintetizan y liberan la hormona sexual masculina, la testosterona, que tiene una concentración local alta para mantener la espermatogénesis de los túbulos seminíferos. Además de esta acción local, la testosterona que circula en la sangre es esencial para mantener la función de las glándulas accesorias del aparato reproductor masculino; también es responsable del desarrollo y mantenimiento de los rasgos sexuales secundarios masculinos (Fawcet, 1988).

Las células de Leydig se diferencian y funcionan en medios endocrinológicos distintos (en útero y período post-natal) en los cuales existen diferencias en los factores que regulan la esteroideogénesis. La presencia de receptores específicos a LH y hCG durante el desarrollo de las células de Leydig es un

prerrequisito para la síntesis de testosterona y la organogénesis masculina. El primer evento que ocurre en la diferenciación de la célula de Leydig es la síntesis de receptores para que se inicie la producción de testosterona (Frowein y Engel, 1974). La capacidad de unión de los receptores con respecto a la hCG, la respuesta máxima a la hormona, así como la producción de testosterona basal, y la producción de AMPc es similar en la población de las células de Leydig del periodo prenatal y los del postnatal. La producción de testosterona disminuye posteriormente entre el nacimiento y el día 15 (Huhtaniemi y col. 1980). Sin embargo las dos poblaciones responden de manera distinta a la hiperestimulación con hCG; la fetal no presenta el fenómeno de desensibilización de receptores descrito para las células adultas. Este fenómeno empieza a aparecer entre los 10 y 20 días de vida postnatal; en el tiempo de transición entre la población fetal y la adulta. Las diferencias entre el tipo de respuesta de las dos poblaciones ante la estimulación con hCG puede deberse a que en la población fetal no existen receptores a estradiol, hormona que causa el bloqueo en la producción de testosterona. En el adulto en cambio, la regulación por estradiol controla las concentraciones de andrógenos lo que resultará inapropiado en la etapa fetal en la que no sería fisiológicamente adecuado, dado que se necesitan concentraciones altas de andrógenos para la diferenciación de los genitales masculinos y del Sistema Nervioso Central (Huhtaniemi y col. 1982).

## CARACTERISTICAS DE LAS HORMONAS LUTEINIZANTES (LH Y GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (hCG).

La LH y la hCG son glucoproteínas constituidas por dos cadenas, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  unidas en forma no covalente por puentes disulfuro. La subunidad  $\alpha$  de la LH consta de 89 aminoácidos, con cinco puentes disulfuro; en ambas hormonas esta subunidad es estructuralmente similar, con microheterogeneidades en la secuencia NH<sub>2</sub>-Terminal (Saxena y Rathnam, 1976).

La Subunidad  $\beta$  de la LH tiene 115 aminoácidos, con 6 puentes disulfuro, también es homóloga a la de la hCG pero la de ésta última posee 30 aminoácidos adicionales en el grupo carboxilo terminal. La subunidad  $\beta$  determina el reconocimiento específico de la hormona por su receptor (Bahl y Moyle, 1978).

La LH y la hCG comparten el receptor de la célula de Leydig con afinidades comparables. Estructuralmente son casi idénticas y su mayor diferencia es el lugar anatómico de síntesis, la hipófisis y la placenta, respectivamente. (Dufau y Catt, 1978).

### MECANISMO DE ACCION DE LH/hCG A NIVEL DE LA GONADA MASCULINA

La regulación fisiológica de la secreción de gonadotropinas se lleva a cabo a través de una interrelación funcional entre el hipotálamo, la hipófisis anterior y la célula de Leydig. Este fenómeno se desencadena por la acción de la GnRH la cual, en los mamíferos es sintetizada en el hipotálamo (Nowak y col. 1984;

Schally, 1978), y es transportada luego por el sistema porta hacia la adenohipófisis. La GnRH actúa sobre receptores específicos de las células basófilas de la adenohipófisis y éstas en respuesta liberan LH (Bardin, 1979).

La LH actúa sobre receptores membranales específicos de la célula de Leydig, que son los mismos que los de la hCG (Catt y Dufau, 1978; Dufau y col. 1984; Tanka, 1986).

En la figura 3 se presenta la vía biosintética en la cual el colesterol es el sustrato primario para la síntesis de la testosterona; éste normalmente es almacenado en el citoplasma de la célula de Leydig, ya que lo toma del espacio extracelular o bien puede sintetizarlo a partir de acetato (Loza y col. 1988).

Para iniciar la esteroidogénesis, es necesario que el colesterol sea trasladado a la mitocondria. El siguiente paso consiste en la conversión del colesterol a pregnenolona, en esta reacción participan además del complejo enzimático citocromo P450 el NADPH y el oxígeno molecular. Esta primera reacción es el paso limitante de la biosíntesis y es regulada por la LH. La esteroidogénesis continúa en el retículo endoplásmico liso (REL), es decir ya no es mitocondrial sino microsomal. En el REL se produce la conversión de pregnenolona a progesterona, en esta etapa participan las enzimas  $\Delta^5-3 \beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la  $\Delta^5 \Delta^4$  isomerasa. El NAD es el aceptor de los hidrógenos que se liberan en la reacción.



MODELO DE ACTIVACION DE LA LH-hCG. ACCION DE LA HORMONA  
SODRE LA ESTEROIDOGENESIS

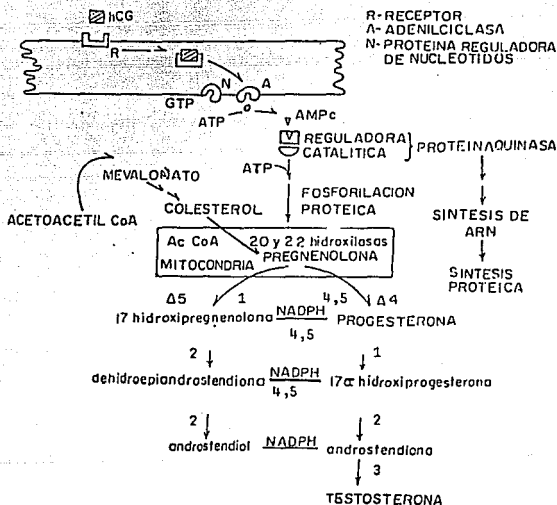


Fig. 3: La hCG y la LH interactúan con los receptores membranales de la célula de Leydig, los cuales unen el ligando con alta afinidad, actuando el sistema de la adenil-ciclase, via AMPc y los sistemas enzimáticos que traducen la señal hormonal en una respuesta aguda de la célula, en este caso la síntesis de testosterona. Los numeros indican las enzimas que catalizan cada secuencia. 1) 17 $\alpha$ -esteroide hidroxilasa; 2) 17,20-esteroide liasa (desmolasa); 3) 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 4)  $\Delta^5$ -3  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 5) 3-cetoesteroide  $\Delta^4$ - $\Delta^5$ -isomerasa. Tomada de Loza y col., 1988

La Conversión de progesterona a 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona se realiza mediante la participación de la enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa. Para que la reacción se realice se requiere la presencia del oxígeno molecular y del NADPH. La 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona es ya un producto de secreción intermedia de la célula de Leydig.

El siguiente paso es la conversión de la 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona en  $\Delta^4$  androsteno-3,17-diona, en la cual participan las enzimas 17-20 líasa, que remueve la cadena de dos carbonos, y la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Finalmente se lleva a cabo la conversión de la androstendiona a testosterona, por mediación de la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Hall, 1988, Melner y col. 1982).

El mecanismo dependiente del AMPc es la vía principal por medio de la cual las células de Leydig responden a la estimulación trófica (Catt y col. 1979; Mendelson y col. 1975). Al actuar la LH/hCG sobre el testículo se estimula la adenilato ciclasa y se libera AMPc. Este nucleótido o análogos del mismo como el dibutiril-AMPc y el 8-Bromo AMPc inducen la formación de testosterona por activación de la proteína quinasa y la subsecuente fosforilación de proteínas. (Huhtaniemi y col. 1980). Se ha observado que la activación de AMPc depende principalmente de la proteína quinasa y no tanto de la presencia de calcio, encontrándose que el efecto de éste es más probable después de la activación de la proteína quinasa. Sin embargo, es necesaria la

presencia de calcio para la producción de testosterona, pues se ha visto que en ausencia de este ión la producción de testosterona decreció aproximadamente 1 a 3 veces, en comparación con el grupo control que contenía calcio 2.5 mM (Dave y col. 1987; Iida y col. 1986; Janszen y col. 1976; Sullivan y Cooke 1986).

Asimismo, la incubación de células de Leydig con forskolin, el cual activa directamente a la adenilato ciclasa, da como resultado un incremento en los niveles de AMPc intracelular (Darfler y col. 1982; Ealey y col. 1987; Frandkin y col. 1982; Moger y Anakwe, 1983; Moriwak y col. 1982; Themmen y col. 1985).

Las hormonas LH/hCG provocan un incremento en la actividad de la esterasa de colesterol y fosforilación del sistema del citocromo P-450; también inducen una mayor actividad de las enzimas encargadas de la conversión de la pregnenolona a testosterona ( $17\alpha$ -hidroxilasa y  $17-20$  liasa, desmolasa); de la  $17\beta$ -hidroxiesteroidehidrogenasa y  $3\beta$ hidroxiesteroidehidrogenasa. A su vez, estas hormonas promueven el reciclamiento de los receptores y producen, en determinadas condiciones desensibilización de los mismos (Dufau y col. 1984).

El mantenimiento de la función y el número de receptores para LH/hCG está regulado por un mecanismo homólogo, del que es responsable la concentración de LH o hCG circulante, y por otro heterólogo dependiente de otras hormonas como la PRL, la FSH, la HG, la GnRH y probablemente de hormonas esteroideas como el

estradiol (Catt y Dufau, 1978).

Las células de Leydig maduras son capaces de autorregular la cantidad de sus propios receptores a LH, mediante un mecanismo de desensibilización de los mismos ante el estímulo hormonal. Es suficiente la administración *in vivo* de una sola dosis suprafisiológica de hCG, LH o GnRH para que se produzca el fenómeno, que consiste en la pérdida de receptores y la disminución de la respuesta esteroidogénica ante una nueva estimulación con hCG *in vitro*. La depleción de receptores se observa 18 horas después de la inyección inicial, siendo precedida por un aumento del 50% en el número de receptores a las 6 horas. El efecto desensibilizante se observa con dosis de hCG de entre 0.4 y 19  $\mu\text{g}$  (Dufau y col. 1979; Habberfield y col. 1986; Kuhn-Veltorn y Staib, 1984). Al mismo tiempo la estimulación con hCG produce un aumento inicial en la producción de testosterona la cual es seguida por un periodo refractario donde la respuesta a hCG o AMPc queda alterada por horas o días (Catt y col. 1979). Otro tipo de desensibilización se produce a nivel enzimático por desactivación de las enzimas de la vía sintética, mediante su fosforilación, mecanismo que al parecer esta mediado por estradiol y fosfatidilinositol. La desensibilización enzimática puede ser de dos tipos; uno, llamado 'temprano' es originado por dosis altas de hCG (5 a 10  $\mu\text{g}$ ) y se caracteriza por una disminución de la síntesis de pregnenolona. Este tipo de lesión no es inducida por el GnRH. Algunos autores consideran que esta lesión se debe a un bloqueo de las enzimas que participan en el proceso de síntesis de

esteroides, más que a un decremento en el colesterol disponible (Aquilano y col. 1985); el segundo tipo de desensibilización enzimática llamada 'tardía', se presenta con dosis más bajas de hCG (2 a 4 µg), y origina un bloqueo parcial de las enzimas 17α-hidrolasa y 17-20 desmolasa, con la consiguiente acumulación de los esteroides correspondientes en el testículo. Se ha observado también que hay un aumento en las concentraciones circulantes de los precursores progesterona y 17α-progesterona sin existir alteración de la producción de pregnenolona. Este tipo de lesión es producida también por la administración de GnRH (100ng). (Dufau y col 1979; Nozu y col. 1982; Perking y Payne, 1984; Quinn y Payne, 1984). Otro tipo de desensibilización se presenta también por alteraciones en la adenilato ciclasa. Estudios con forskolin y con toxina del cólera, las cuales estimulan a la adenilato ciclasa sugieren que la regulación negativa homóloga y heteróloga es ocasionada por lesiones antes y después de la subunidad estimuladora de la proteína G durante el proceso de activación de la adenilciclasa (Dix y col.1984).

#### ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

Se ha encontrado en el timo un factor, obtenido a partir del polvo acetónico de este órgano, que tiene actividad inhibitoria sobre la producción de testosterona estimulada con hormona gonadotrofina corionica (HCG). Este factor tiene un peso molecular aproximado de 30 KDa. y es de naturaleza proteica, se le ha denominado Factor Tímico (FT). (Pedernera y col.1986). Se ha

demostrado que este factor modula la respuesta de las células de Leydig a la hCG, mediante una inhibición de tipo competitiva en la unión de esta hormona a su receptor específico (Hiriart y Romano, 1986).

Romano y Martín (1992) estudiaron el efecto de medios condicionados obtenidos de células reticuloepiteliales del timo sobre la esteroidogénesis inducida por hCG, en suspensión de células de testículo de rata adulta, observando que el medio condicionado de estas células reproduce el efecto del FT obtenido a partir del extracto cetónico de timo. Estos datos sugieren que se trata de la misma molécula y que el FT es producido por las células reticuloepiteliales del timo.

También se ha probado el FT sobre células dispersas de ovarios maduros y se observó que disminuye la liberación estimulada de testosterona, progesterona y estradiol (Aguilera y Romzno, 1989). Así también se ha observado que potencia el efecto de la GnRH sobre las células adenohipofisarias en cultivo (Mendoza y Romano, 1989).

Se ha demostrado que el FT es dependiente de la edad, alcanzando un pico de liberación a los tres días del nacimiento. (Reyes-Esparzas y Romano, 1989).

## HIPOTESIS

Se ha demostrado que en el timo de la rata prepúber, existe un factor con un peso aproximado de 30 kDa que modifica la respuesta de las células testiculares a la hCG al competir por el mismo receptor, observando una disminución en la secreción de testosterona inducida por esta hormona.

En la presente tesis se decidió profundizar en el estudio del efecto directo del Factor Tímico sobre las células testiculares. Se postuló que es posible que la presencia del Factor modificara otros niveles de la esteroidogénesis, como por ejemplo la adenilato adenilato ciclasa o bien que su efecto pueda ser mediado a través de segundos mensajeros. Se investigó si el Factor Tímico inactiva toda la vía o si es posible revertir el efecto a través de activar directamente a la adenilato ciclasa con forskolin o a la vía esteroidogénica con segundos mensajeros como el AMPc.

#### OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el mecanismo por el cual la fracción de medio de incubación de timo (FrMIT) modula la producción de testosterona en las células testiculares *in vitro*

#### OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Estudiar el efecto de la FrMIT cuando se estimula la esteroidogénesis actuando sobre el sistema de la adenilato ciclasa.
- 2.- Analizar si la FrMIT interacciona con el AMPc modificando el efecto de este nucleótido sobre la producción basal y estimulada de testosterona.
- 3.- Estudiar el efecto que produce la FrMIT en una preincubación de células testiculares estimuladas y no con hCG sobre una subsiguiente exposición a estas a la gonadotropina.



## MATERIALES Y METODOS

### ANIMALES:

Los timos se obtuvieron de ratas macho Wistar de 14 días de edad y para los bioensayos de células testiculares se utilizaron animales de 3 a 4 meses de edad.

### MEDIO DE INCUBACION:

Para la obtención del timo, ratas de 14 días de edad se anestesiaron con éter o cloroformo. Se realizó una incisión toraxica por donde se extrajo el timo, el cual se lavó dos veces en medio de cultivo (Medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, DMEM). Se retiraron restos de otros tejidos y la cápsula conectiva que lo cubre, se cortó en fragmentos de 3mm aproximadamente que se lavaron nuevamente en DMEM para disminuir la cantidad de linfocitos. Se escurrió el medio de lavado, absorbiéndose el exceso con papel filtro; los trozos tímicos así tratados se pesaron inmediatamente e incubaron a razón de 500 mg de timo por 20 ml de DMEM, que contenía además Albúmina sérica bovina al 0.1%, durante dos horas en un matraz cerrado a 37°C, con agitación de 60 ciclos por minuto.

Posteriormente, se centrifugó la suspensión a 3000 rpm. durante 10 minutos, colectándose el sobrenadante al que se llamo Medio de Incubación de Timo (MIT) el cual se liofilizó y conservó a una temperatura de -20°C hasta utilizarse.

## CROMATOGRAFIA DE FILTRACION MOLECULAR.

Esta cromatografía se utilizó para separar la fracción correspondiente a los 30 kDa; la resina empleada fué Sephadex G75 (farmacia). La resina fué hidratada con buffer de elución Tris 0.05M + NaCl 0.1M pH de 7.4 y empacada en una columna de vidrio de 1.6 x 100 cm.

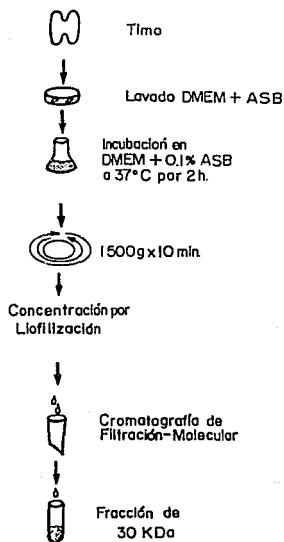
La columna se calibró mediante una mezcla de proteínas de peso molecular conocido, Hemoglobina P.M. 60 kDa, Media Hemoglobina P.M. 30 kDa y Citocromo C, P.M. 12 kDa El volumen muerto de la columna se determinó inyectando junto con los estándares Azul Dextran P.M. de 1000 kDa; el flujo de la columna fué de 20 ml/h y se corrió en cuarto frío a una temperatura de 4°C.

El MIT se resuspendió en 4 ml del buffer de elución. Esta suspensión se eluyó a través de la columna de filtración molecular a una temperatura de 4°C y un flujo de 20 ml/h, colectando fracciones de 4 ml.

Las fracciones con peso molecular cercano a 30 Kd, (Fracción de Medio de Incubación de Timo (FrMIT)), se liofilizarón y guardaron a una temperatura de -20°C, hasta la realización del bioensayo.

La figura 4 muestra esquemáticamente la metodología descrita para la obtención del FrMIT a partir del MIT.

## PREPARACION DE FrMIT



**Fig. 4:** Esquema de la metodología seguida para la obtención del FrMIT a partir del MIT.

## BIDENSAYO EN SUSPENSION DE CELULAS TESTICULARES

Se utilizaron ratas adultas de 3 a 4 meses de edad que fueron anestesiadas con éter o cloroformo, se diseccionaron los testículos y se retiró la capa albugínea. La masa testicular se incubó en una solución de DMEM con Albúmina 0.1% y Colagenasa 0.145 mg/ml, 10 ml/testículo, a 35°C con agitación de 190 ciclos por min, durante 15 min.

Posteriormente, se agregó a la suspensión celular un volumen igual de DMEM con Albúmina sérica bovina 0.1% y se filtró a través de una malla de nylon. la suspensión así obtenida se centrifugó a 800 rpm durante 10 min resuspendiéndose la pastilla celular en DMEM con Albúmina sérica bovina 0.1% e isobutil-metilxantina 0.1 mM a razón de 1 ml/100µl de pastilla. De esta suspensión celular se sembraron 200 µl en matraces que contenían DMEM + Albúmina 0.1% + isobutil metilxantina 0.1mM En los grupos control las células recibieron buffer de elución y las problema FRMIT al 20% v/v. En algunos grupos la esteroidogénesis se estimuló con hCG (1 mU/ml), Forskolín (15 µM) o bien con 8 bromo AMPc (1.5 mM). En otros no se agregaron sustancias estimulantes y se consideró que expresaban la secreción basal o espontánea de testosterona.

Las muestras se expusieron a CO<sub>2</sub> + aire (5 y 95%) e incubaron a 34°C durante 2 horas con agitación de 60 ciclos/min. Al finalizar, el medio se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se colectó el sobrenadante que fue usado para cuantificar testosterona (Hiriart y Romano, 1986).

La figura 5 muestra esquemáticamente la metodología descrita anteriormente.

## PREINCUBACION:

Para estos experimentos las células testiculares se incubaron en 2 tiempos de 2 hr cada uno. El primer tiempo que se llamó de preincubación, se realizó de la siguiente manera: A) DMEM solo, B) DMEM + FrMIT, C) DMEM + hCG 1mU/ml, D) DMEM + hCG + FrMIT. Al finalizar este primer período la suspensión celular se centrifugó a 800 rpm durante 10 min para separar las células que todavía permanecían en él. El sobrenadante se almacenó a 4°C hasta que se midió la concentración de testosterona. La pastilla celular se resuspendió en DMEM más Albúmina sérica bovina y se centrifugó nuevamente a 800 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y la pastilla celular se resuspendió en DMEM más Albúmina sérica bovina 0.1% y 1 mM de isobutil-xantina, para utilizarse en la segunda fase del experimento -incubación-

Del grupo A de la preincubación se formaron 4 subgrupos Aa) DMEM solo. Ab) DMEM + FrMIT, Ac) DMEM + hCG 1mU/ml, Ad) DMEM + hCG + FrMIT. Del grupo B se originaron 2 subgrupos Ba) DMEM sólo y Bb) DMEM + hCG 1mU/ml El grupo C originó 2 subgrupos Ca) DMEM sólo y Cb) Dulbecco + hCG 1 mU/ml. Finalmente el grupo D originó un subgrupo Da cuyas células fueron incubadas en DMEM sin ningún agregado.

La figura 6 muestra en forma esquemática los pasos que se siguieron para estos experimentos.

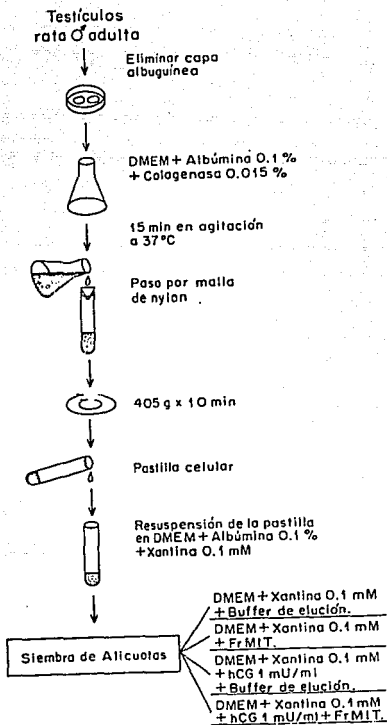


Fig. 5: Esquema de la metodología seguida para la obtención de la suspensión testicular, y la manera en que se dividieron estas para la realización del bioensayo.

La incubación se realizó en las mismas condiciones descritas anteriormente, es decir durante 2 horas a 34 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> + aire (5% ; 95%). Al terminar esta segunda incubación se centrifugaron las suspensiones celulares a 3000 rpm durante 10 minutos, se colectaron los sobrenadantes y se almacenaron a 4°C hasta determinar la concentración de testosterona presente en ellos.

**PREINCUBACION (2h)**

**INCUBACION (2h)**

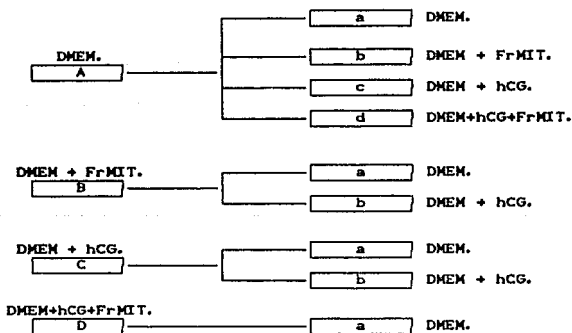


Figura 6: Esquema de la metodología seguida en los experimentos en los que un periodo de preincubación en diferentes condiciones experimentales, precedió a la incubación típica de 2 hrs que se describe al comienzo de esta sección.

#### RADIOINMUNOANALISIS DE TESTOSTERONA:

Para cuantificar testosterona, se utilizó un anticuerpo de alta especificidad de Radioassay y testosterona tritiada de Amersham como trazador. La concentración hormonal de las muestras se cuantificó mediante una curva estándar de testosterona. Se graficó el logaritmo de las concentraciones conocidas de los estándares de testosterona contra el logaritmo de 'Y', donde 'Y' es la relación entre la unión total y la unión en presencia de la hormona fría (Bedolla y col., 1984). Se incubó la reacción durante 24 h a 4°C, el exceso de testosterona tritiada fué eliminado con carbón activado.

La radioactividad de las muestras se leyó en un contador  $\beta$  de centelleo.

#### ESTADISTICA:

Para determinar la significancia estadística de las diferencias entre medias obtenidas, se realizaron pruebas de t de Student ó análisis de variancia (ANDEVA) seguida de la prueba de Duncan. Los grupos se consideraron diferentes cuando la probabilidad fue menor de al 5 % ( $p < 0.05$ ). (Snedecor y Cochran, 1979).



## RESULTADOS.

### ESTANDARIZACION DE TECNICAS:

Con el fin de conocer la dosis de hCG adecuada para estimular la secreción de testosterona, hCG-dependiente en las células testiculares, se realizó una curva dosis-respuesta a esta hormona. Como se puede observar en la Fig.7 la máxima respuesta se obtuvo con una dosis de 1.25 mU/ml de hCG; dosis mayores causaron un descenso en la magnitud de la respuesta. Se decidió utilizar una dosis submáxima de 1 mU/ml con la cual se obtuvo una estimulación de al menos 7 veces el valor de la secreción en condiciones basales.

Se estandarizó así mismo la técnica de radioinmunoanálisis mediante la linearización de una curva estandar donde  $r = 0.991$ ,  $m = -2.34$  y  $b = 4.8$ .

### ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD DE LA FrMIT.

En la Fig. 8 se muestra el resultado de un experimento representativo donde se observa el efecto de un grupo de fracciones de medio de incubación de timo (FrMIT) que corresponde a pesos moleculares entre 28 y 30 kDa eluidas por la columna de filtración sobre la producción de testosterona dependiente de hCG. Se aprecia que la producción de testosterona fue 30 a 40% menor que el grupo control, en los grupos que se incubaron en presencia de las fracciones 28,29 y 30 (20 % v/v), las cuales corresponden

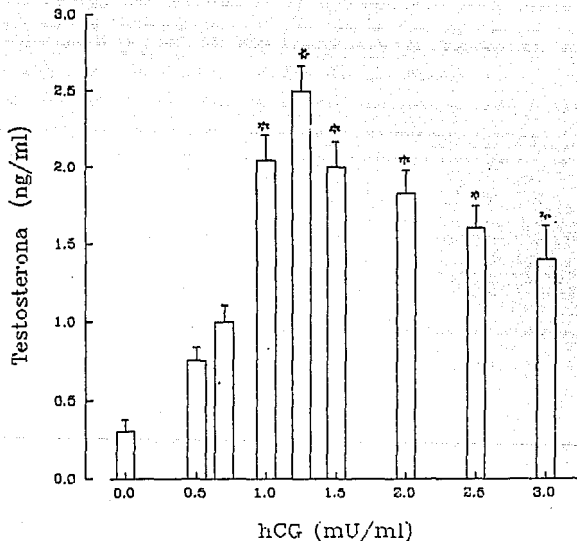


Fig. 7: Efecto de diferentes dosis de hCG sobre la producción de testosterona ( $\bar{x}$  + p.s.m.) en bioensayos de células de testículo de rata adulta. \* <P 0.05 vs grupo basal (prueba de ANDEVA).

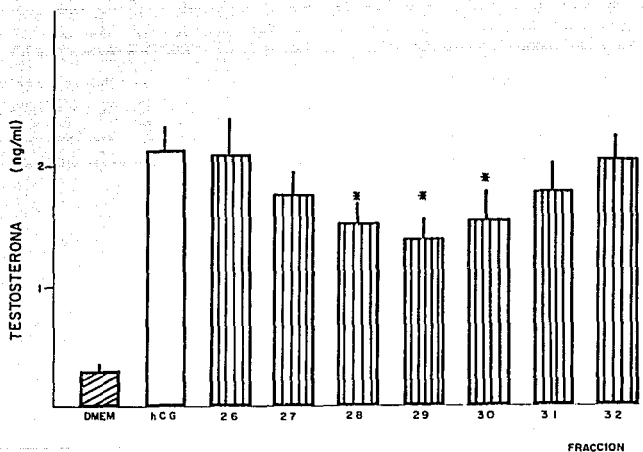


Fig. B: Estudio del efecto de las fracciones del medio de incubación de tino con peso molecular cercano a 30kDa sobre la producción de testosterona ( $\bar{x}$  + D.S.M) por las células de testículo de rata adulta, estimuladas con 1 mU/ml de hCG. \* <math>P < 0.05</math> vs grupo control (prueba de ANDEVA).

al peso molecular mencionado arriba de acuerdo a la calibración de la columna. Posteriormente se investigó el efecto de la FrMIT sobre la secreción basal de testosterona. Simultáneamente se incluyeron grupos de células testiculares estimuladas con hCG, como control de actividad de la FrMIT.

En la fig 9 podemos observar que la FrMIT fue capaz nuevamente de inhibir en un 30% aproximadamente ( $P < 0.05$ ) la secreción de testosterona dependiente de hCG, pero no así la producción basal de este esteroide.

Estos datos nos indicaron que el FT se encontró presente en el MIT y que eluyó como lo hace dicho Factor cuando se obtiene a partir de polvo acetonico de timo. Asimismo la FrMIT así obtenida se comporta como el FT en cuando a que inhibe la secreción de testosterona dependiente de hCG, sin alterar la basal. Además la FrMIT apareció exactamente en las mismas fracciones en que se encontró la actividad inhibitoria del FT extraído del polvo acetónico de timo. Por lo tanto estos experimentos sugieren que el timo es capaz de secretar al medio una substancia que inhibe la esteroidogénesis dependiente de hCG.

Con estos resultados y para profundizar en el estudio del mecanismo de acción a través del cual se produce dicha inhibición, se decidió estudiar en los sucesivos experimentos el efecto del FrMIT sobre la esteroidogénesis cuando fue estimulada con forskolin y AMPC.

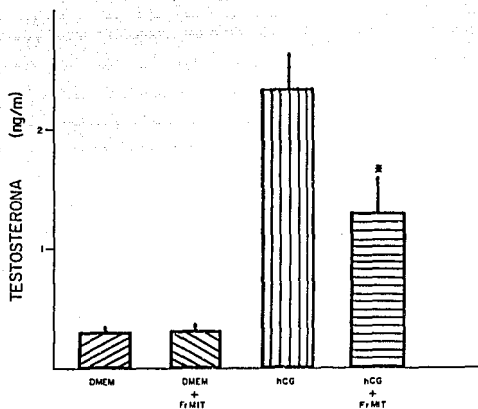


Fig. 9: Efecto de la fracción del medio de incubación de timo (FrMIT), de ratas de 14 días de edad, sobre la producción de testosterona ( $\bar{x}$  + D.S.M) por las células de testículo en condiciones basales o estimuladas con 1mU/ml de hCG +  $P < 0.05$  vs grupo con hCG (prueba de t de Student).

EFFECTO DE LA FRMIT SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS ESTIMULADA  
CON FORSKOLIN.

Se decidió utilizar forskolin para estudiar el efecto de la FRMIT sobre la esteroidogénesis testicular ya que éste estimula directamente a la adenilato ciclasa.

Se realizaron experimentos para encontrar la dosis más adecuada de forskolin para el modelo que se utilizó en este estudio ya que en la literatura se cita que la concentración de éste puede variar dependiendo de la preparación. Se probaron concentraciones de 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20, 30 y 50  $\mu\text{M}$  de forskolin.

En la Fig 10 se muestra el efecto de diferentes dosis de forskolin sobre la producción de testosterona por la suspensión de células de testículo. Se observa que la máxima respuesta esteroidogénica se alcanzó con la dosis de 15  $\mu\text{M}$ . Dosis mayores provocaron un descenso de la producción de testosterona, que aunque fue mayor que la del grupo control, resultó estadísticamente menor si se le comparaba con la de 15 $\mu\text{M}$ .

Se decidió utilizar la dosis de 15  $\mu\text{M}$  en los experimentos posteriores, ya que con ella obtuvimos una respuesta similar a la obtenida con 1 mU/ml de hCG en nuestra preparación.

La Fig 11 muestra la respuesta de la suspensión testicular a la estimulación con forskolin. Como se puede observar, este compuesto

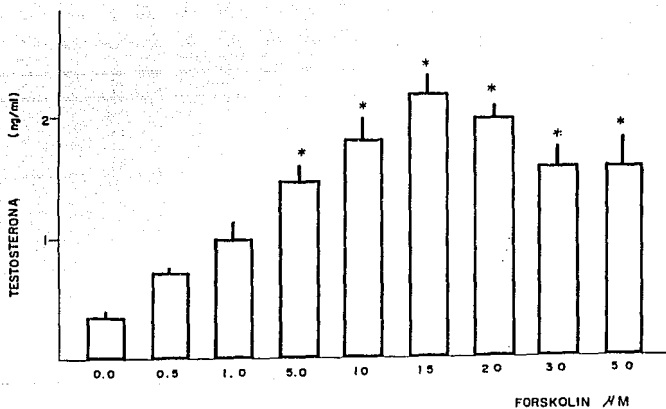


Fig. 10: Efecto de diferentes dosis de forskolin sobre la producción de testosterona ( $\bar{x}$  + D.S.M.) por células de testículo de rata \*  $P < 0.05$  vs grupo basal (prueba de ANDEVA).

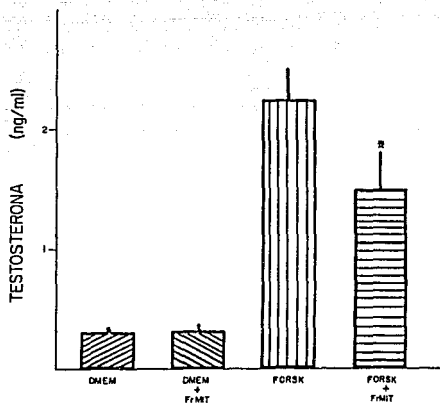


Fig. 11: Efecto de la fracción del medio de incubación de timo (FrMIT), sobre la producción de testosterona ( $\bar{x}$  + d.s.m), por las células de testículo de rata adulta en condiciones basales o estimuladas con 15  $\mu$ M forskolin \* ( $P < 0.05$  vs grupo control (prueba de t de Student)).



a la dosis de 15  $\mu$ M aumentó la secreción de testosterona 7 veces. En presencia de la FrMIT, la producción basal de testosterona no se alteró. Sin embargo, la respuesta a este compuesto fué significativamente menor que en el grupo que solo recibió forskolin.

#### EFEECTO DE LA FrMIT SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS ESTIMULADA CON AMPc.

Se utilizó 8-Bromo-AMPc a la concentración de 1.5 mM, con la cual se obtuvo una respuesta esteroidogénica similar a la que se produce con 1mU/ml de hCG en nuestra preparación testicular. Al igual que se hizo en el caso del forskolin, un grupo de células se trato con 8-bromo AMPc, y otro con este compuesto en presencia y ausencia de FrMIT.

Como era previsible el 8-Bromo-AMPc (1.5 mM) estimuló significativamente la producción de testosterona en las células testiculares, aumentando 7 veces la secreción basal (Fig. 12). Sin embargo la respuesta a este compuesto fué significativamente menor cuando la FrMIT al 20% (v/v) estuvo presente en el medio de incubación de las células testiculares.

Los resultados sugieren entonces que la FrMIT fué capaz de inhibir la esteroidogénesis estimulada con hCG, forskolin o AMPc. En la Fig 13 resumimos los resultados de la respuesta celular a hCG, forskolin y AMPc en las dosis descritas, ésto en presencia y ausencia de la FrMIT. Las tres substancias produjeron un incremento semejante (6 a 7 veces la basal) en la concentración de

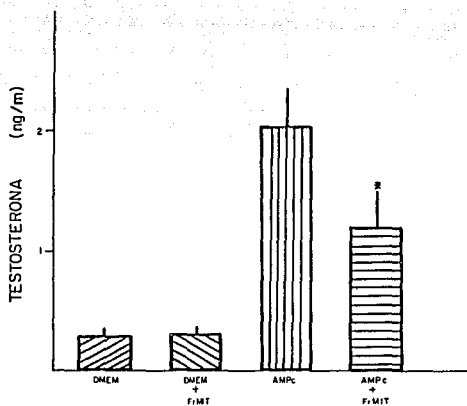


Fig.12: Efecto de la Fracción del medio de incubación de timo (FrMIT) sobre la producción de testosterona ( $\bar{x}$  + D.S.N), por las células de testículo de rata adulta, en condiciones basales o estimuladas con 1.5 mM de 8-bromo-AMPC. \*  $P < 0.05$  vs grupo control (prueba t de Student).

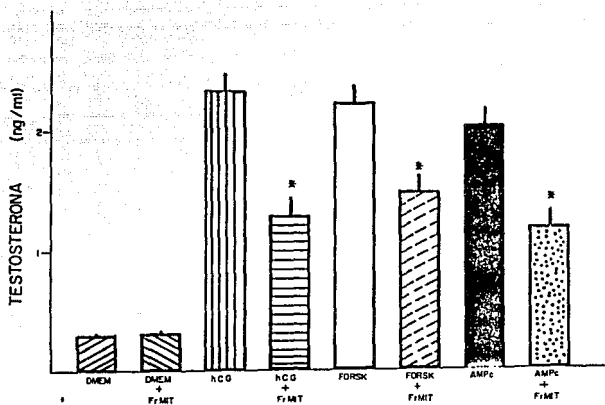


Fig.13: Comparación del efecto de la Fracción del medio de incubación de tимо (FrMIT) sobre la producción de testosteroona ( $\bar{x} \pm D.S.M$ ), por las células de testículo de rata en condiciones basales o estimuladas con 1mU/ml de hCG, forskolin 15 $\mu$ M y 1.5mM de 8-bromo-AMPc \*  $P < 0.05$  vs grupo control (prueba t de Student).

testosterona en el medio de la suspensión testicular. Asimismo, la respuesta a cualquiera de los tres estimulantes de la secreción de testosterona disminuyó en una magnitud similar (40 a 50%) en presencia de la fracción tímica.

#### EFFECTO DE LA PREINCUBACION DE LAS CELULAS DE TESTICULO Y EL FrMIT SOBRE LA ESTERIDOGENESIS ESTIMULADA CON hCG.

Se sabe que la célula de Leydig puede ser desensibilizada, tanto *in vivo* como *in vitro*, por una exposición prolongada o bien por altas concentraciones de hCG (Aquilano y col., 1985; Kuhn-Veltorn y Staib, 1984). De tal forma que ante una subsiguiente exposición a esta hormona la respuesta esteroidogénica o bien no se presenta o es menor.

Por otra parte los resultados expuestos más arriba indican que la FrMIT inhibe no sólo la esteroidogénesis estimulada con hCG sino además, la inducida con forskolin y AMPC. Por tanto se decidió investigar si la FrMIT se comporta como un análogo a hCG y también desensibiliza a la célula de Leydig. Para esto se investigó en primer lugar si la actividad inhibitoria de la FrMIT cesaba después de retirarla del medio de incubación, o bien si la preincubación de las células de Leydig en presencia de la FrMIT, era capaz de inducir desensibilización celular ante un nuevo estímulo con hCG.

Como ya se mencionó en la metodología, se trabajó en dos etapas, una de preincubación que a su vez se separó en 4 grupos experimentales, y a continuación otra de incubación de los diferentes subgrupos provenientes de la primera etapa.

Como era de esperarse luego de la primera etapa de preincubación, la actividad inhibitoria de la FrMIT fué similar a la descrita anteriormente. Esto se muestra en la Fig 14 en la que se observa que la producción basal de testosterona por la suspensión testicular fué similar en presencia (B) o ausencia (A) del medio de incubación de timo. En cambio, la producción de testosterona dependiente de hCG disminuyó significativamente en presencia de la FrMIT (D) con respecto al grupo que recibió el buffer de elución y hCG (C).

Luego del período de incubación, el grupo que en la preincubación se usó como control, que sólo recibió DMEM + hCG, reprodujo los resultados de la preincubación, es decir, que la presencia de la FrMIT no alteró la producción basal de testosterona. Nuevamente se observó una inhibición de la respuesta de las células testiculares cuando se incubaron con hCG + FrMIT (Fig.14).

En el grupo que en la preincubación se expuso a la FrMIT se observaron los siguientes resultados: El grupo (Ba) no se diferenció de los grupos (Aa) y (Ab) o sea que la producción basal de testosterona no se alteró por la preincubación con FrMIT. El

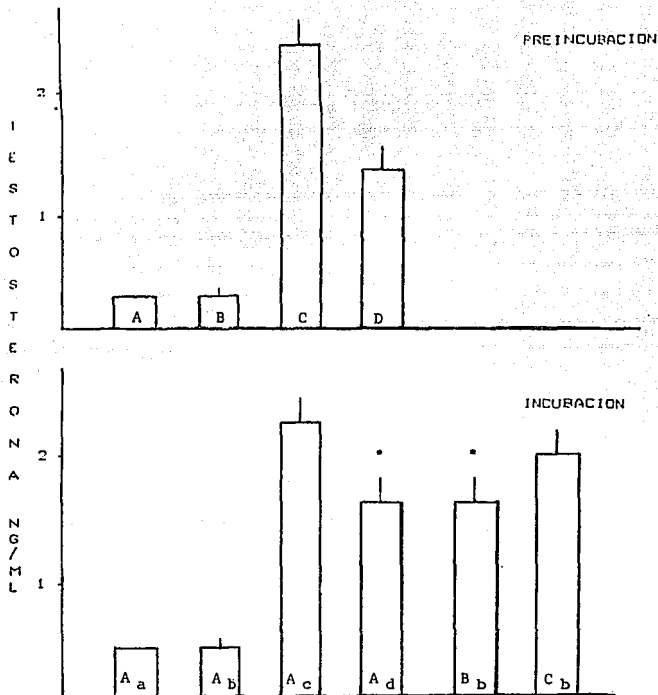


Fig.14: Efecto de la preincubación en presencia de la Fracción del medio de incubación de timo (FrMIT) sobre la producción de testosterona ( $\bar{x}$  + D.S.M), por las células de testículo de rata adulta los dos grupos basales son (A) en ausencia y (B) presencia de la FrMIT, y dos estimulados con 1 mU/ml de hCG, en ausencia (C) y presencia de la FrMIT (D). En la segunda etapa (incubación) se formaron los grupos (Aa) basal, (Ab) basal+FrMIT, (Ac) hCG, (Ad) hCG+FrMIT, (Bb) hCG, y (Cb) hCG. \*  $P < 0.05$  vs su respectivo grupo control (Sin efecto de FrMIT) (prueba de t de Student).

grupo (Bb) presentó una respuesta disminuida a la hCG que no se diferencia del grupo que había recibido hCG más FrMIT en la incubación. El grupo que fué incubado las dos veces en presencia de hCG presentó una respuesta intermedia, es decir respondió menos que el grupo que sólo se incubó con hCG en el segundo período y más que el grupo incubado en presencia de hCG más la FrMIT y que el grupo preincubado con FrMIT e incubado en presencia de hCG.

Estos resultados indican que la preexposición a hCG produce una desensibilización ya que las células tienden a responder menos en la siguiente exposición a esta hormona.

Por otra parte, se realizaron experimentos para analizar el curso temporal del efecto de la preincubación con FrMIT sobre la respuesta a hCG, luego de eliminar esta fracción del medio de las células. Para esto se preincubaron las células en presencia y ausencia de la FrMIT (20% v/v) durante 30, 60, 120 y 180 minutos (Fig.15 ). En todos los tiempos estudiados se investigó si la secreción basal era afectada por la preincubación en presencia de la FrMIT y se observó que este procedimiento no afecta la secreción basal de testosterona en el período siguiente (incubación).

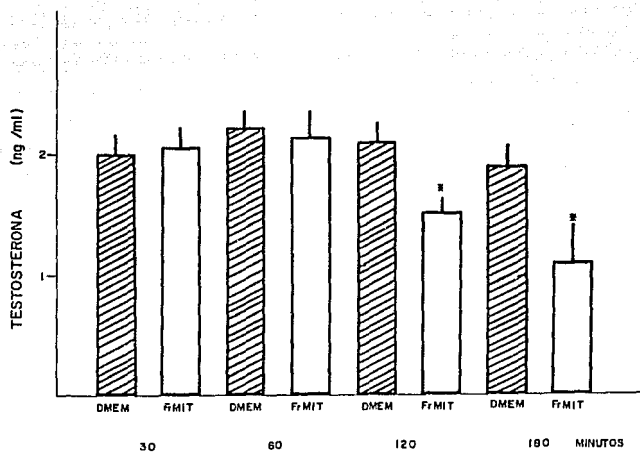


Fig. 15: Efecto de la preincubación durante diferentes tiempos (30,60,120 y 180 min.) en presencia de la Fracción del medio de incubación de timo sobre la producción de testosterona ( $\bar{x}$  + D.S.M) por las células de testículo de rata adulta \*  $P < 0.05$  vs grupo control (prueba de t de Student).



## DISCUSION

Los resultados obtenidos indican que la FrMIT inhibe la esteroidogénesis estimulada con forskolin en una proporción similar a la que se produce cuando es inducida con hCG. Lo anterior llevó a analizar si solamente la adenilato ciclasa estaba inactivada y por lo tanto no era capaz de elevar los niveles de AMPc, paso indispensable para obtener un aumento en la síntesis de esteroides, o bien si aún el AMPc era incapaz de estimular la esteroidogénesis en presencia del FrMIT porque toda la vía esteroidogénica estaba desensibilizada. Para aclarar este punto se estimuló la síntesis de testosterona con 8-bromo-AMPc a una dosis de 1.5mM. Esta dosis es similar a la que otros autores han utilizado y con la que han demostrado que es efectiva para inducir secreción de testosterona en las células de Leydig. (Perkins y payne, 1987) Con esta dosis se logró en las células control estimular la producción de testosterona con valores similares a los obtenidos con 1mU de hCG o 15µM de forskolin. Los resultados sugieren que las células tratadas con la FrMIT son incapaces de responder al estímulo directo con 8-bromo AMPc. Asimismo los datos obtenidos indicaron que el efecto de la FrMIT sobre la esteroidogénesis estimulada no se debe tampoco a una disminución del AMPc por inactivación del complejo receptor-adenilato-ciclasa. Aparentemente la vía esteroidogénica estaría afectada a nivel de las enzimas involucradas en la síntesis de esteroides.

A este respecto se ha descrito que la hCG es capaz de producir una desensibilización de la vía esteroidogénica, cuando se administra *in vivo* e *in vitro*, en grandes dosis o por largos periodos de tiempo. (Dufau y col.,1984, Chasalow y col.,1979).

Pensando en la posibilidad de un proceso de desensibilización por la FrMIT en las células de testículo se decidió preincubar la suspensión testicular en presencia de esta fracción, con el objeto de estudiar si el tiempo de incubación en presencia de FrMIT modificaba la posterior respuesta a la hCG. Observamos que cuando se preincuba en tiempos menores a 120 minutos no se presentaba el efecto inhibitorio y que este creció al aumentar el tiempo de incubación con la fracción. Se seleccionó el período de dos horas, ya que si bien en tiempos mayores se obtenía inhibiciones mayores, al mismo tiempo aumentaban las células muertas

Estos experimentos permitieron hacer varias observaciones. Cuantificando el número de células vivas y muertas con la técnica de azul de tripan en los grupos preincubados con la FrMIT y sin ella, se observó que la presencia de la fracción no cambia el número ni la proporción de células vivas. La técnica utilizada no descarta alteraciones finas en el funcionamiento celular, sin embargo, sugiere que la FrMIT no produce efectos tóxicos severos o deletéreos sobre las células. Por otra parte, la preincubación de la suspensión testicular en presencia de la FrMIT también produjo desensibilización de las células de Leydig de manera que responden con una menor producción de testosterona cuando se las estimula a continuación con hCG. Resultados que llevan a plantear que el

efecto de la FrMIT no se debe a alteraciones de la molécula de hCG inducidas por la misma, ya que el efecto se observa aun cuando la FrMIT no se agrega simultáneamente con dicha hormona. Tal vez la proteína tímica se una a un receptor membranal que podría ser el de hCG alterando la unión de la gonadotropina a su receptor como lo proponen Hiriart y Romano (1986) porque la célula continúa desensibilizada a pesar de haberse retirado el medio que contenía la FrMIT. Una posibilidad es que la molécula permanezca fuertemente unida a la membrana; otra es que los cambios intracelulares que produjo la exposición de las células a la FrMIT perduren por largos periodos como lo es para el caso de la hCG. (Kuhn-Vertern y Staib, 1984, Habberfield y col. 1986)

Se realizaron también experimentos en los que la FrMIT se colocó simultáneamente con hCG y luego se lavaron las células para eliminar ambas moléculas y estudiar si el efecto de la FrMIT sobre la producción de la testosterona dependiente de hCG era reversible. Pero nos encontramos con el problema de que aún las células del grupo control que solamente recibió hCG, no respondieron a una segunda incubación con hCG, es decir, que como ha sido reportado por Nozu y col. (1982) la hormona por sí misma desensibiliza a las células de Leydig. Dado que en el modelo utilizado la viabilidad celular no va más allá de 6 a 8 horas después de la siembra, no es posible estudiar en plazos más prolongados si existe recuperación del efecto de hCG. Para resolver este problema es necesario trabajar con un modelo de células en cultivo, adheridas al sustrato, que por un lado

facilitan los lavados evitando frecuentes centrifugaciones, y por el otro, pueden permanecer viables por períodos más largos.

En conjunto nuestros resultados, en el estudio del mecanismo por el que la FrMIT actúa sobre el testículo, muestran que es posible que dicha fracción inhiba la esteroidogénesis estimulada actuando a nivel del receptor; lo que produciría desensibilización de las células por alteraciones en pasos posteriores a la síntesis de AMPc. Esto llevaría a plantear una serie de preguntas y consideraciones. Por la naturaleza proteica y el peso molecular el FrMIT no puede pasar la membrana celular sin que se active un proceso de endocitosis; por tanto debería actuar en primera instancia a nivel de receptores membranales. No sabemos si sólo actúa a través del receptor para LH/hCG (Hiriart y Romano, 1986), o si tiene además un receptor específico para el mismo. Se podría suponer que la fracción del medio de incubación del timo actúa como un agonista parcial de la hCG, el cual en ausencia del agonista natural, (hCG), produciría algunos de los efectos del mismo a través de sus receptores. Sin embargo, el hecho de que la FrMIT no estimule por si misma la producción de testosterona descartaría esta interpretación.

No se puede dejar de considerar además la posibilidad de estar viendo dos acciones diferentes, inducidas por dos moléculas distintas. En la FrMIT existen varias moléculas con peso molecular cercano a los 30 KDa; el efecto de inhibición competitiva podría estar dado por una de ellas y el de desensibilización por otra. Es

necesario avanzar en la purificación del factor Tímico, para poder aclarar este punto. Además será necesario realizar experimentos que nos indiquen si la vía de síntesis de la testosterona se encuentra alterada, y si es así, a qué nivel de la misma ocurre el bloqueo.

## CONCLUSIONES

El timo es capaz de producir y secretar al medio factores capaces de modular, *in vitro*, la esteroidogénesis en el testículo.

La FrMIT inhibe la producción de testosterona estimulada con hCG sin alterar la producción basal de este esteroide.

La FrMIT inhibe la producción de testosterona estimulada con forskolin sin alterar la producción basal de este esteroide.

La FrMIT inhibe la producción de testosterona estimulada con 8-Bromo-AMPC sin alterar la producción basal de este esteroide.

La FrMIT es capaz de producir desensibilización de las células testiculares al estímulo con hCG.

## BIBLIOGRAFIA

- AGUILERA, G. and Romano, M. 1989. Influence of thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells *in vitro*. J. Endocr. 123:367-373
- AQUILANO, D.R., Tsai-Morris, C.H., Hattori M.H., and Dufau M, L. 1985. Mitochondrial cholesterol availability during gonadotropin-induced Leydig cell desensitization. Endocr. 116:1745-1754
- AMBRUS, L.J. and Ambrus, M.C. 1973. Thymic Hormones Cap. 2. Ed. Ed.Luckey T.D.University Park Press. Baltimore. pp. 19-36
- ASANUMA, Y., Goldstein, A.L. and White, A. 1969. Reduction the incidence of wasting disease in neonatally thymectomized CBA/W mice by the injection of thymosin. J.Exp.Med. 86:600-610
- BACH, J.F. and Dardenne, M. 1975. Isolation, biochemical characteristics, and biological activity of a circulating thymic hormone in the mouse and in the human. Annals New York. Academy of Sciences 186-210
- BACH, J.F. and Goldstein, G. 1980. Newer concepts of thymic hormones. Thymus 2:1-4
- BAHL, D.M. and Moyle, W. 1978. Role of carbohydrates in the action. Eds.Biirnbaumer, J., D'Malley, B. Vol III Academic Press, New York. pp. 261
- BARDIN, C.W. 1979. Hormonal control of testicular function: Best and Taylor's physiological basis of medical practice. Ed. Brobeck, J.R., Cap. 7. The Williams and Wilkins company, Baltimore. pp. 96

- BEDOLLA, T.N., Ulloa-Aguirre, A., Landeros, V.J. y Pérez-Palacios, G. 1984. Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis I. Guía para la evaluación de resultados. Rev. Invest. Clin. 36:179-192
- BELLANTI, M.D.J. 1978. Immunology II. Ed. W.B. Saunders Company E.U. pp. 57-65
- CALZOLARI, A. 1898. Recherches experimentales sur un rapport probably between the fonction du thymus et celle des testicules aromatization in immature rats. Endocr. 104:285
- CASTRO, J.E. 1974. Orquidectomy and the inmune response II Response of orquidectomy mice to antigens. Proc. Roy. Soc. Lon. 185:437-451
- CATT, K.J., Baukal, A.J., Davies, T.F. and Dufau, M.L., 1979 Lutēinizing hormone-releasing hormone-induced regulation of gonadotropin and prolactin receptors in the rat testis. Endocr. 104:17-25
- CATT, K.J. and Dufau, M.L. 1978. Gonadotropin receptors and regulation of interstitial cell function in the testis. Receptors and hormone action. 3:291-339
- CHASALOW, F., Marr, H., Haos, F. and Saez, J.M. 1979. Testicular steroidogenesis after hCG desensitization in rats. J.Biol.Chem. 254:5613
- CHIODI, H. 1940. The relation between the thymus and the sexual organs. Endocr. 26:107-116
- CHIODI, H. 1976. Thimus hypertrophy induced by castration in old male rats an mice (abstract 395). Fed. Proc. 35:277
- COMSA, J. 1973. Thymuc Hormones. Cap. 1 Ed. Luckey T.D. University Park Press. Baltimore. pp. 39-58



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- DARDENNE, M., Savino, W., Duval, D., Kaiserlian, D., Hassid, J. and Bach, J.F. 1986. Thymic hormone-containing cells VII. Adrenals and gonads control *in vivo* secretion of thymulin and its plasmatic inhibitor. *J. of Immunology* 136(4):1303-1308
- DARFLER, J.F., Mahan, C.L., Koachman, A.M. and Insel, A.P. 1982. Stimulation by forskolin of intact S49 lymphoma cells involves the nucleotide regulatory protein of adenylate cyclase. *J.Biol. Chem.* 257(20):11901-11907
- DAVE, R. J., Eiden, E.L., Lozousky, D. and Waschek, A.J. 1987. Calcium-Dependent mechanisms regulate corticotropin-releasing factor-stimulated proopiomelanocortin peptide secretion and messenger ribonucleic acid production. *Endocr.* 120:305-310
- DESCHAUX, P., Massengo, B. and Fontages, R. 1979. Endocrine interactions of the thymus with the hypophysis, adrenals and testes: Effects of two thymic extracts. *Thymus.* 1:95-108
- DIX, C.J., Habberfield, A.D. and Cooke, B.A. 1984. Characterization of the homologous and heterologous desensitization of rat Leydig-tumor-cell adenylate cyclase. *Biochem J.* 220:803-809
- DUFAU, M.L. 1988. Endocrine regulation and communicating functions of Leydig cell. *Ann. Rev. Physiol.* 50:438-508
- DUFAU, M.L. and Catt, K.J. 1978. Gonadotropin receptors and regulation of steroidogenesis in the testis and ovary. *Vitamins and Hormones.* 36:461-592
- DUFAU, M.L., Cigorrea, S., Baukal, A.J., Sorrel, S., Bator, J.M., Neubauer, J.F. and Catt, K.J. 1979. Androgen biosynthesis in Leydig cells after testicular desensitization by luteinizing hormone-releasing hormone and human chorionic gonadotropin. *Endocr.* 105:1314-1321

- DURFAU, M.L., Wingers, C.A., Hattori, M., Aquilano, D. and Baranao, J.L.S. 1984. Hormonal regulation of androgen production by Leydig cells. *J. Steroid Biochem.* 20:161-173
- EALEY, P.A., Ahene, C.A., Emerson, J.M. and Marshall, N.J. 1987. Forskolin and thyrotrophin stimulation of rat FRTL-5 thyroid cell growth: The role of cyclic AMP. *J. Endocr.* 114:199-205
- EIK-NES, K.B. and Hall, P.F. 1965. Secretion of steroid hormones in vivo. *Vitam. Hormon.* 23:153-208
- FARROKHI, R., Wesolowski, E., Traster, M.J. and Robaire, B., 1988. Modulation by neonatal thymectomy of the reproductive axis in male and female rats during development. *Biol. of reprod.* 38:91-99
- FAWCET, D.W. 1988. *Tratado de histología.* 11<sup>a</sup> ed. Ed. Interamericana McGraw-Hill. España. pp. 802-804, 838
- FITZPATRICK, F.T.A. and Greenstein, B.D. 1987. Effects of various Steroids on the thymus, spleen, ventral prostate and seminal vesicles in old orchidectomized rats. *J. Endocr.* 113:51-55
- FITZPATRICK, F.T.A., Kendall, M.D., Wheeler, M.J., Adcock I.M. and Greenstein, B.D. 1985. Reappearance of thymus of ageing rats after orchidectomy. *J. Endocr.* 106:R17-R19
- FRADKIN, E.J., Cook, H.G., Kilhoffer, M.C. and Wolff J. 1982. Forskolin stimulation of thyroid adenylate cyclase and cyclic 3',5'- adenosine monophosphate accumulation. *Endocr.* 11:849-856
- FRWEIN, J. and Engel, W. 1974. Constitutivity of the hCG - hCG-receptors protein in the testis of rat and man. *Nature* 249:377-378
- GILLETE, S. and Gillete, W.R. 1979. Changes in thymic estrogen receptor expression following orchidectomy. *Cellular immunology* 42:194-196

- GOLDSTEIN, A.L., Guha, A., Howe, M.L. and White A. 1971. Ontogenesis of cell mediated immunity and its acceleration by thymosin a thymic hormone. J. Immunology.106:773:780
- GOLDSTEIN, A.L., Low, T.L.K., McAdoo, M., McClure, J., Thurman, G.B., Rossio, J.L., Lai, C.Y., Chang, D., Wang, S.S., Harvey, C., Ramel, A. and Meienhofer, J. 1977. Thymosin  $\alpha_1$ : Isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. 74:725-729
- GOLDSTEIN, A.L., Low, K.L.T., Thurman, G.B., Zats, M.M., Hall, N., Chen, J., Hu, S.K., Naylor, P.B. and McClure, J.E. 1981. Current status of thymosin and others hormones of the thymus gland. Recent Progress in Hormone Research 37:369-415
- GOLDSTEIN, G., Scheid, M., Boyse, E.A. and Gilmour, D.L. 1972. Thymopoietin and bursopoietin: Induction signals regulating early lymphocyte differentiatin. Cold Spring Harbors Symposia. Vol. XII, pp. 5-7
- GOLDSTEIN A.L., Thurman, G.B., Low, K.L.T., Rossio, J.L. and Trivers G.E. 1978. Hormonal influences on the reticuloendothelial system:Current ststus of the role os thymosin the regulation an modulation os immunity. J. Reticuloendothel.Soc. 23:253-266
- GROSSMAN, C.J. 1985. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. Sci. 227:257-261
- GROSSMAN, C.J., Nathan, P., Taylor, B.B. and Sholiton, L.J. 1979. Rat thymic dihydrotestosterone receptor: Preparation, location and physiochemical properties. Steroids 34:539-553
- GROSSMAN, C.J. and Roselle, A.G. 1983. The interrelation ship of the HPG-thymic axis and immune system regulation. J.Steroid Biochem. 19:461-467

- HABBERFIELD, D.A., Dix, H.C. and Cooke, A.B. 1986. Evidence for the rapid internalization and recycling of lutropin receptors in rat testis Leydig cells. *Biochem J.* 233:369-376
- HALL, P.F. 1988. Testicular steroid synthesis: Organization and regulation. In E. Knobil and J.D. Neil (eds): the physiology of reproduction. New York: Raven Press, pp. 975-998
- HAM, A.W. and Cormack, H.D. 1987. *Tratado de Histología.* 8<sup>o</sup> ed. Ed. Interamericana. México D.F., pp. 375-383
- HATTORI, M. and Brandon, M.R. 1979. Thymus and the endocrine system: ovarian dysgenesis in neonatally thymectomized rats. *J. Endocr.* 83:101-111
- HIRIART, M. and Romano, M. 1986. Human chorionic gonatropin binding to rat testis receptor is inhibited by athymus factor. *Life Sciences.* 38:789-795
- HIROKAWA, K., McClure, J.E. and Goldstein A.L. 1982. Age-related changes in localization of thymosin in the human thymus. *Thymus* 4: 19-29
- HOOD, L.W. and Hodd, I.W. 1978. The immune system Lymphoid organs. Cap. 5. The Benjamin Cummings Publishing Company Incc. U.S.A. pp. 71-73, 51-57
- HOOPER, J.A. and Goldstein, A.L. 1975. Purification and properties of bovine thymosin. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 249:125-144.
- HUHTANIEMI, I., Katikinemi, M., Duffau, M.L. and Catt K.J. 1980. Regulation and activation of testicular LH receptors: Functional correlates of hormone receptors in reproduction. Eds. Mahesh, Muldoon, Saxena Sadler, Elsevier North Holland Inc. pp. 367

- HUHTANIEMI, I., Nozu, K., Warren, D., Duffau, M.L. and Catt, K.J. 1982. Acquisition of regulatory mechanisms for gonadotropin receptors and steroidogenesis in maturing rat testis. *Endocr.* 111:1711-1720
- IIDA, S., Widmaier, P.E. and Hall F.P. 1986. The phosphatidylinositide- $Ca^{+2}$  hypothesis does not apply to the steroidogenic action of corticotropin. *Biochem. J.* 236:53-59
- JANSZEN, F.H.A., Cooke, B.A., Van Driel, M.J.A. and Van Der Molen H.J. 1976. The effect of calcium ions on testosterone production in Leydig cells from rat testis. *Biochem. J.* 160:433-437
- KLEIN, J. 1982. Immunology, the Science of Self-Nonself Discrimination. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley and Sons. U.S.A. 106-114
- KOOK, A.I. and Trainin, N. 1974. Hormone-like activity of a thymus humoral factor on the induction of immune competence in lymphoid cells. *J. of Experimental Medicine* 139: 193-207
- KUHN-VELTERN, N. and Staib, W. 1984. Inhibition of 17 Beta - hydroxysteroid-oxidoreductase activity in purified rat Leydig cells by single injection of human chorionic gonadotrophin. *Acta Endocrinologica* 105: 517-576
- LANGMAN, J. 1976. *Embriologia Medica*. 3<sup>rd</sup> ed. Ed. Interamericana pp. 242-244
- LOW, T.L., Hu S.K. and Goldstein A.L. 1981. Complete amino acid sequence of bovine thymosin  $\beta_4$ : A thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:1162-1166

- LOW, T.L., Thurman, G.B., Mc Addo M., Mc Clure J.E.Jr., Rossio, J.L., Naylor, P.H. and Goldstein, A.L. 1979. The chemistry and biology of thymosin I., Isolation, Characterization and biological activities of thymosin I and polypeptide I from calf thymus. *J. Biol. Chem.* 254:981-986
- LOZA, A.C., Lemus, A.E. and Pérez P.G. 1988. *Bioquímica e Inmunología*. Cap. 5. Ed. Hicks G.J.J., Díaz Z.J.C., U.N.A.M. México., pp. 53-125
- MELNER, H.M., Lutin, A.W. and Puett, D. 1982 Epidermal growth factor and cyclic AMP stimulation of distinct protein kinase activities in Leydig cell tumor membranes. *Life Sci.* 30:1981-1986
- MENDELSON, C., Dufau M.L. and Catt K.J. 1975. Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3'5'- monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells. *J. Biol.Chem.* 250(22):8918-8923
- MENDOZA, M.E. and Romano, M. 1989. Prepubertal rat thymus secretes a factor which modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus* 14, 4:233-242
- MICHAEL, S.D. 1979. The role of the endocrine thymus in female reproduction. *Arthritis and rheumatism.* 22:1241-1245.
- MICHAEL, S.D. and Chapman, C.J. 1990. The influences of the Endocrine System on the Immune System. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 1:215-233
- MICHAEL, S.D., Taguchi O. and Nishizuka Y. 1980. Effect of neonatal thymectomy on ovarian development and plasma LH, FSH, and PRL in the mouse. *Biol. Reprod.* 22:343-350
- MILLER, J.F. 1964. The thymus and the development of immunologic responsiveness. *Sci.* 144:1544

- MILLER, J.F. and Osoba, D. 1967. Current concepts of the immunological function of the thymus. *Physiol. Rev.* 47:437-520
- MOGER, H.W. and Anakwe O.D. 1983. Effects of forskolin on androgen production by mouse interstitial cells in vitro. Interactions with Luteinizing hormone and isoproterenol. *Biol. Reprod.* 29:932-937
- MORIWAKI, K., Itoh, Y., Iida, S. and Ichihara, K. 1982. Forskolin potentiates adrenocorticotropin-induced cyclic AMP production and steroidogenesis in isolated rat adrenal cells. *Life Sci.* 30:2235-2240
- NAYLOR, P.H., Thurman, G.B. and Goldstein, A.L. 1979. Effect of calcium on the cyclic GMP elevation induced by thymosin fraction 5. *Biochem. Biophys. Res. Comn.* 90:810-818
- NISHISUKA, Y. and Sakakura, T. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166:735-755
- NISHISUKA, Y. and Sakakura, T. 1971. Ovarian dysgenesis induced by neonatal thymectomy in the mouse. *Endocri.* 89:886-893
- NOWAK, R., Wiseman, B.S., Barh, J.M. 1984. identification of a gonadotropin-releasing hormone-like factor in the rabbit fetal placenta. *Biol. Reprod.* 31:67-75
- NOZU, K., Dehejia, A., Zawistowich, L., Catt J.K. and Dufau M.L. 1982. Gonadotropin-induced desensitization of Leydig cells in vivo and in vitro: estrogen action in the testis. *Ann. N.Y. Ac. Sci.* 333:212
- OATES, K.K. and Goldstein A.L. 1984. Thymosins: Hormones of the thymus gland. *TIPS* 8:347-352

- OATES, K.K., Naylor, H.P. and Goldstein, L.A. 1987. Localization of thymosin  $\alpha$  production to thymus medullary epithelial cells by use of monoclonal antibodies. *Hybridoma* 6:47-58
- OSOBA, D. 1965a. Immune reactivity in mice thymectomized soon after birth: Normal response after pregnancy. *Sci.* 147:298-303
- OSOBA, D. 1965b. The effects of thymus and other lymphoid organs enclosed in Millipore diffusion chambers on neonatally thymectomized mice. *J. Exp. Med.* 122:633-650
- OSOBA, D. and Miller, J.F. 1964. The lymphoid tissues and immune response of neonatally thymectomized mice bearing thymus tissue in Millipore diffusion chambers. *J. Exp. Med.* 119:177-194
- PEARCE, T.P., Khalid, K.A.B. and Funder, N.J. 1983. Progesterone receptors in rat thymus. *Endoc.* 113:1287-1291
- PEDERNERA, E., Diaz-Osuna, J. and Calcagno, M. 1986. A thymus factor influences the *in vitro* testosterone secretion of Leydig cells in the rat. *Life Sci.* 38:779-787
- PERKINS, L.M. and Payne A.H. 1987. Mechanism of the acute cAMP induced decrease in P-450  $17\alpha$  in cultured mouse Leydig cells. *Annals New York Academy of Sciences.* 513:393-395
- QUINN, P.G. and Payne, A.H. 1984. Oxygen-mediated damage of microsomal cytochrome P450 enzyme in cultured Leydig cells cultures. *J. Biol. Chem.* 260:2092
- REBAR, R.W. 1982. The thymus gland and reproduction: Do thymic peptides influence the reproductive lifespan in females? . *J. of the American Geriatrics Society* 30:60-66



- REBAR, R.W., Morandini, I.C., Benirschke, K. and Petze, J.E. 1980. Reduced gonadotropins in athymic mice: prevention by thymic transplantation. *Endocrinology* 107(6):2130-2132
- REBAR, W.R., Morandini C.I., Erickson G.F. and Petze J.E. 1981. The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice. Diminished gonadotropin secretion in prepubertal females. *Endocr.* 108:120-126
- REYES-ESPARZA, J.A. and Romano, M. 1989. An age dependent thymic secretion modulates testicular function. *J. Steroid Biochem* 34:541-545
- ROBBINS, L.S. 1975. *Patología estructural y funcional*. Ed. Interamericana. México D.F. pp. 1516
- ROITT M.I. 1980. *Essential immunology*. Fourth edition. Blackwell Scientific Publications. Boston pp. 51-85
- ROMANO, M. and D. Martin. 1992. Conditioned medium from culture epithelial thymus cell, modulates the hCB of rat testis cells. *Proc. Endocr. Soc.:*42:105-11
- SAVINO W., Bartoccioni, E., Homo-Delarche, F., Gagnerault M.C., Itoh T. and Dardenne M. 1988. Thymic hormone containing cells. IX. Steroids *in vitro* modulate thymulin secretion by human and murine thymic epithelial cells. *J. Steroid Biochem.* 30:479-484
- SAXENA, B.B. and Rathnam, P. 1976. Mechanism of action of gonadotropins: *Advances in sex hormone research vol.2. Cellular mechanism modulating gonadal action*. Eds. Singhal R.L., Tomas J.H. University Park Press. U.S.A. pp. 289
- SCHALLY A.V., 1978. Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. Its implications for the control of reproductive processes. *Sci.* 202:18-28

- SCHURMAN, H.J., Van de Wungaert, F.P., Delvoe, L., Broekhuizen R., McClure, J.E. and Goldstein, A.L. 1985. Heterogeneity and age dependency of human thymus reticuloepithelium in production of thymosin components. *Thymus* 7:13-23
- SCREPANTI, I., Gulino, A. and Pasqualini, J.R. 1982 The fetal thymus of Guinea pig as an estrogen target organ. *Endocr.* 111:1552-1561
- SNEDECOR, W.G. and Cochran, G.W. 1979. *Métodos Estadísticos.* 6<sup>a</sup> ed. Ed. C.E.C.S.A. México D.F. pp. 93-157
- SPANGELO, B.L., Tudd, A.M., Ross, R.C., Login, I.S. Jarvis, W.D., Badamchian, M., Goldstein, A.L. and MacLeod F.M. 1987. Thymosin fraction 5 stimulates prolactin and growth hormone release from anterior pituitary cells *in vitro*. *Endocr.* 121:2935-2043
- STIKSON, W.H. and Crilly, P.J. 1981. Effects of steroids on the secretion of immunoregulatory factors by thymic epithelial cell cultures. *Immunology* 44:401-407
- SULLIVAN, H.F.M., Cooke, A.B. 1986. The role of  $Ca^{+2}$  in steroidogenesis in Leydig Cells. Stimulation of intracellular free  $Ca^{+2}$  by lutropin (LH), luliberin (LHRH) agonist and cyclic AMP. *Biochem. J.* 236:45-51
- TANKA, K.M. 1986. Current aspects of Leydig cell function and its regulation. *J. Reprod. Fert.* 78:367-380
- THEMKEN, P.N.A., Hoogerbrugge, W.J., Rommerts, F.G.F. and Van Der Molen H.J. 1985. Is cAMP the obligatory second messenger in the action of lutropin on Leydig cell steroidogenesis?. *Biochem. and Biophys Research Communications* 128(3):1164-1172
- TRAININ, N. 1974. Thymic hormones and the immune response. *Physiol Rev.* 54:272-315

TRAININ, N., Pecht, M. and Handzel, Z.T. 1983. Thymic hormones: inducers and regulators of the T-cell system. Immunol. Today 4, 31:16-21

TORTORA, J.G. y Anagnostakos P.N. 1984. Principios de Anatomía y Fisiología. 3<sup>era</sup> ed. Edit. Harla. México pp.665-674

UTSUYAMA, M. and Hirokawaka K. 1989. Hipertrophy of the thymus and restoration of immune functions in Mice and rats by gonadectomy. Mechanisms of ageing and development 47:175-185