

21  
2eJ.

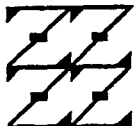


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL INJERTO DE TIMO  
SOBRE LA PUBERTAD ESPONTANEA E INDUCIDA  
EN EL RATON ALOPECICO-HIPOTIMICO**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
**LORENA HINOJOSA BACA**



LO HUMANO  
EJE  
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

DIRECTORA DE TESIS

DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

OCTUBRE, 1994



## **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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**\* ZARAGOZA \***

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL INJERTO DE TIMO  
SOBRE LA PUBERTAD ESPONTANEA E INDUCIDA  
EN EL RATON ALOPECICO-HIPOTIMICO**

**Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta: Lorena Hinojosa Baca**

**Directora de tesis: Dra. Patricia Rosas Saucedo**

**Realizada en: Laboratorio de Neuroinmuno-endocrinología de la  
Reproducción. Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.  
FES-Zaragoza, UNAM.**

**Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de DGAPA clave  
IN212394, el Programa de Becas de DGAPA y el Programa Universitario  
de Investigación en Salud (PUIS), UNAM.**

A mi madre: **Bertha**

Por su apoyo, respeto, confianza y sobre todo por su cariño inmenso.

Y Por lo que soy.

A mis hermanos: **Lourdes, Verónica, Jesús y Mariano**

Porque gracias a ellos pude concluir esta meta y son parte de mi vida .

Y nunca olviden que los quiero.

A mis sobrinos: **Irving y Daniel**

Porque comienzan a formar una parte muy importante en mi vida.

A una persona especial: **Gerardo**

Por su amor y apoyo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. **Patricia Rosas Saucedo** por su amistad y asesoría.

Al Dr. **Roberto Domínguez Casalá** por su valiosa ayuda en todo momento.

A los miembros del jurado:

Dra. **Patricia Rosas Saucedo**

M. en C. **Enrique Mendieta Márquez**

M.C. **Raúl Zavala Chavero**

M. en I.B.S.H. **María Elena Ayala Escobar**

M. en B.R.A. **María Judith Villavicencio Macías**

Por sus sugerencias e interés mostrado para la realización de este trabajo.

A **Delfina** porque juntas lograremos las metas fijadas.

A mis amigos de la carrera **Sandra, Maricela, Patricia, Alicia y Jesús** por los momentos que compartimos.

A **Rubén** por su amistad incondicional.

A **Lety** por sus importantes sugerencias.

A cada uno mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción por su amistad y contribución para la realización de esta tesis.

## INDICE

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCION</b> .....	3
I. Pubertad .....	3
II. Características del timo .....	5
III. Relaciones entre el timo y el sistema reproductor .....	8
a) Efectos de los polipéptidos tímicos sobre la función hipotálamo-hipofisaria y gonadal .....	9
b) Efectos de la timectomía o la atimia sobre el desarrollo del ovario .....	10
IV. Características del ratón alopecico e hipotímico .....	11
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	12
<b>HIPOTESIS</b> .....	13
<b>OBJETIVO</b> .....	13
<b>METODOLOGIA</b> .....	14
<b>RESULTADOS</b> .....	17
<b>DISCUSION</b> .....	36
<b>CONCLUSIONES</b> .....	40
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	41

## RESUMEN

Existe una interacción funcional entre el timo y el sistema reproductor. Se ha descrito que los ratones con alteraciones en el desarrollo del timo (alopécicos-hipotímicos et/et) presentan retardo en la edad en la que inicia la pubertad y menor capacidad ovulatoria ante el estímulo gonadotrópico.

Con el objeto de analizar si el trasplante de timo de ratones normales restablece el proceso de pubertad en los animales hipotímicos, en el presente trabajo se estudiaron los efectos del injerto de timo a diferentes edades del desarrollo postnatal, sobre la maduración sexual y la ovulación espontáneas e inducidas.

Los resultados mostraron lo siguiente:

- En el ratón hipotímico la etapa neonatal fue la más susceptible al estrés quirúrgico provocado por la operación simulada. El peso del timo decreció en un 38.7% respecto al testigo ( $56.2 \pm 4.9$  vs  $91.7 \pm 5.0$  mg,  $p < 0.05$ ). En estos animales se presentó retraso en la aparición del primer estro vaginal ( $6.3 \pm 1.2$  vs  $1.4 \pm 0.6$  días posteriores a la apertura vaginal,  $p < 0.05$ ) y menor peso de los ovarios ( $6.3 \pm 0.4$  vs  $7.8 \pm 0.5$  mg,  $p < 0.05$ ).

- Las hembras et/et presentaron un 35% de aceptación del injerto de timo normal de sus hermanos de camada. Sin embargo a los 30 días de edad el 100% de los trasplantes fueron rechazados.

- El injerto de timo al nacimiento previno los efectos del estrés quirúrgico. El peso del timo in situ se incrementó respecto al de los animales con operación simulada ( $98.4 \pm 4.5$  vs  $56.2 \pm 4.9$  mg,  $p < 0.05$ ). Este resultado se acompañó de un adelanto en el día del primer estro vaginal ( $0.8 \pm 0.3$  vs  $6.3 \pm 1.2$ ,  $p < 0.05$ ) y un considerable aumento en el peso de los ovarios ( $9.2 \pm 0.5$  vs  $6.3 \pm 0.4$  mg,  $p < 0.05$ ).

- El tratamiento con PMSG indujo el adelanto de la apertura vaginal y del primer estro vaginal en los tres grupos experimentales (operación simulada o injerto de timo al nacimiento e intactos).

- En los animales tratados con PMSG, el peso del timo fue similar al observado en el testigo de la misma edad (28 días) (TA+PMSG  $38.2 \pm 3.2$ ; OS+PMSG  $39.5 \pm 2.1$ ; +IT+PMSG  $38.9 \pm 5.2$  vs  $33.9 \pm 4.4$  mg/10g, NS). El peso de los ovarios y del útero se incrementó en los tres grupos de animales en comparación con el testigo (ovarios: TA+PMSG  $6.6 \pm 0.3$ ; OS+PMSG  $6.9 \pm 0.3$ ; +IT+PMSG  $6.9 \pm 0.9$  vs  $4.2 \pm 0.4$  mg/10g, útero: TA+PMSG  $25.3 \pm 0.8$ ; OS+PMSG  $33.6 \pm 1.0$ ; +IT+PMSG  $41.5 \pm 5.5$  vs  $12.4 \pm 0.9$  mg/10g,  $p < 0.05$ ).

- En el animal hipotímico prepúber, el injerto de timo no modificó significativamente la respuesta ovulatoria al estímulo gonadotrópico (tasa ovulatoria: TA + PMSG 100%; OS + PMSG 100%; +IT + PMSG 80%; número de ovocitos: TA + PMSG  $16.0 \pm 2.4$ ; OS + PMSG  $17.5 \pm 1.1$ ; +IT + PMSG  $13.0 \pm 6.4$ , NS).

Los resultados muestran que es necesaria la presencia de un timo normal desde el nacimiento, para que el crecimiento y la función de los ovarios, así como de las adrenales sea normal.



## INTRODUCCION

El timo es un órgano del sistema linfóide que participa en los mecanismos de defensa inmunológica, en particular en la respuesta inmune mediada por células.

Las funciones del timo no sólo están restringidas al sistema inmune. Los experimentos realizados en animales congénita o quirúrgicamente atímicos así como los estudios sobre los efectos de las hormonas tímica muestran que existe una relación funcional bidireccional entre el timo y el sistema reproductor. Procesos como la maduración sexual están vinculados con el equilibrio de esta relación.

### I. Pubertad.

La pubertad es la fase biológica que marca el inicio de la madurez sexual y en la cual ocurren una serie de cambios neuroendocrinos y fenotípicos. En la regulación de estos eventos participan la información genética del individuo, la nutrición, los estímulos sociales y algunas condiciones ambientales como el fotoperíodo (Ramírez, 1973):

En la hembra de los roedores, el inicio de la pubertad se caracteriza, entre otros eventos, por la canalización de la vagina la cual es estimulada por los estrógenos. Uno o dos días después de haberse producido la apertura vaginal, se presenta la ovulación y el primer estro vaginal (Ramírez, 1973; Goldman, 1981).

Con base en parámetros morfológicos y fisiológicos, Ojeda y col. (1986) dividen la etapa previa a la pubertad de la rata hembra en 4 fases:

1) *Neonatal*. Se inicia al nacimiento y termina a los 7 días de vida posnatal. Durante los primeros cuatro o cinco días de esta fase, el ovario es relativamente insensible a las gonadotropinas y no secreta estrógenos.

Después del cuarto día de edad, la hormona estimulante del folículo (FSH, por sus siglas en inglés) estimula la conversión de testosterona a estrógenos en las células de la granulosa del folículo ovárico (Funkenstein y col., 1980). La FSH induce la síntesis y expresión de sus receptores, incrementándolos desde los cuatro hasta los 16-20 días de edad (Ojeda y col., 1986).

Durante esta fase no funciona el efecto inhibitorio que ejercen los estrógenos sobre la secreción de las gonadotropinas. La falta de respuesta se explica por la presencia de la concentración elevada de la  $\alpha$ -fetoproteína en el suero y en los tejidos. Esta molécula tiene la capacidad de enlazar ávidamente a los estrógenos, lo que resulta en una disminución en el número de moléculas

libres (Ojeda y col., 1986).

Al final de la fase neonatal se observa un aumento en la concentración plasmática de FSH y el ovario muestra capacidad esteroidogénica en respuesta al estímulo gonadotrópico (Ojeda y col., 1986).

2) *Infantil*. Se extiende desde el día 8 al 21. En esta fase ocurren una serie de cambios en el eje hipotálamo-hipófisis que representan los primeros eventos neuroendócrinos que tienen un impacto directo sobre el momento en el cual se iniciará la pubertad. La concentración sérica de la FSH presenta un incremento que alcanza valores máximos alrededor del día 12, momento en el que comienza a disminuir progresivamente hasta llegar a valores muy bajos poco antes del primer proestro. En el ovario la FSH estimula la síntesis y la actividad de la enzima aromataasa, lo que se traduce en un aumento en la síntesis de estrógenos (Ojeda y col., 1986; Domínguez y col., 1991). En esta fase la concentración sérica de la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) se incrementa en forma de pulsos esporádicos (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

Este modelo de secreción de la FSH y la LH que caracteriza a la fase infantil es un reflejo del proceso de maduración del sistema nervioso central y la adenohipófisis. Se asume que los estrógenos juegan un papel importante en la regulación de estos eventos (Ojeda y col., 1986).

A partir del día 16 de edad disminuye la concentración de la  $\alpha$ -fetoproteína y por lo tanto aumentan los estrógenos libres (Ojeda y col., 1983).

3) *Juvenil o prepuberal*. Se inicia en el día 21 y termina alrededor de los 30-32 días de edad.

Al comienzo de la fase juvenil la concentración de la  $\alpha$ -fetoproteína continúa decreciendo, por lo que hay aumento de estrógenos libres (Ojeda y col., 1986). La secreción de gonadotropinas se encuentra bajo el control inhibitorio de los estrógenos. La concentración de la FSH disminuye y la de LH que mostraba liberación brusca y esporádica, se transforma en una secreción de tipo pulsátil. Los animales son capaces de responder a los estrógenos, liberando LH en concentración similar a la del animal adulto en proestro (Andrews y Ojeda, 1981; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

En el ovario se presentan ondas de crecimiento folicular y atresia, los folículos aún no alcanzan el estado preovulatorio. En esta fase las concentraciones de prolactina y de hormona del crecimiento o somatotropina (GH, por sus siglas en inglés) son detectadas. Ambas hormonas participan en la maduración del ovario juvenil (Ojeda y col., 1986).

Esta fase termina cuando se presentan las primeras manifestaciones del aumento de la actividad estrogénica, expresada por la presencia de líquido en la luz del útero (Ojeda y col., 1983).

4) *Peripuberal*. Tiene una duración variable e incluye los días que preceden a la primera ovulación.

En esta fase se lleva a cabo una cascada de eventos que culminan con el primer pico preovulatorio de gonadotropinas y la primera ovulación.

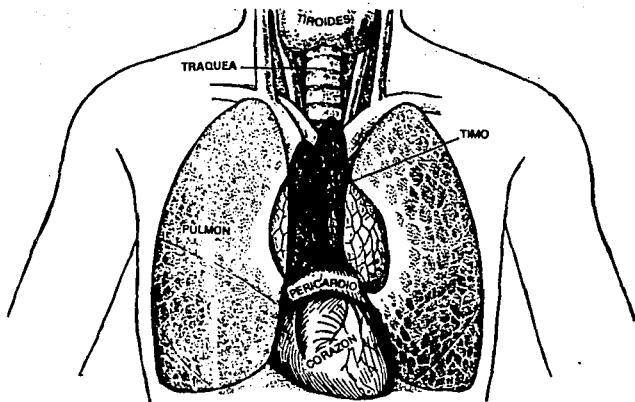
Los ovarios incrementan la capacidad para secretar estrógenos en respuesta a la estimulación gonadotrópica, debido al aumento en el número de receptores a la LH en las células de la teca del folículo ovárico que conduce a una mayor producción de andrógenos, mismos que son aromatizados a estrógenos en las células de la granulosa (Ojeda y col., 1986). El número de receptores a la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés) en el ovario disminuye y con esto la influencia inhibitoria que este péptido tiene sobre el desarrollo de la gónada (Dalkin y col., 1981).

Durante esta etapa se incrementan las concentraciones plasmáticas de la prolactina y de la hormona del crecimiento, respecto a las observadas en la fase juvenil (Ojeda y col., 1986). La concentración de la LH presenta miniaumentos durante la mañana que dependen de la secreción de los estrógenos, por la tarde se observa un aumento en magnitud y amplitud de los picos de esta gonadotropina. Este patrón de secreción hormonal induce la primera elevación brusca de la concentración de estradiol o pico de estrógenos, hasta lograr la primera liberación preovulatoria de gonadotropinas y consecuentemente la primera ovulación (Ojeda y col., 1989).

## II. Características del timo.

El timo es el órgano responsable de la inmunogénesis del individuo, ya que en él se lleva a cabo la maduración y diferenciación de los linfocitos inmunocompetentes o linfocitos T (Ham, 1975; Roitt y col., 1986).

En los mamíferos el timo es un órgano de forma triangular, bilobulado y de color gris rosáceo. Está ubicado en el tórax, inmediatamente por detrás de la parte superior del esternón, con la base apoyada en el pericardio y el ápice dirigido hacia el cuello. Se presenta delante de las venas tiroideas inferiores, la tráquea y los grandes vasos incluyendo el cayado aórtico (Burnet, 1962; Ham, 1975) (Fig 1).



**Figura 1. Ubicación anatómica del timo en el humano (Tomado de: Burnet, 1962; Ham, 1975).**

La glándula timo se origina de un tubo de células epiteliales del tercer par de bolsas faríngeas que crece hacia el mesénquima. Los tubos epiteliales se vuelven cordones sólidos que sufren tracción hacia el interior del tórax perdiendo su conexión con sus puntos de origen. Los cordones proliferan y mandan ramas laterales hacia el interior de los lóbulos. Otras células de estos cordones se distribuyen de manera menos densa hacia la periferia del órgano y tienden a separarse, pero siempre manteniéndose unidas entre sí por proyecciones citoplasmáticas formando una red (Ham, 1975; Langman, 1976).

El otro componente del timo son las células T indiferenciadas o prelinfocitos, que se originan en el saco vitelino y migran al timo donde se depositan entre la red de células epiteliales. Ahí crecen, proliferan y se diferencian en linfocitos (Ham, 1975).

El timo presenta una organización cortico-medular. Cada uno de los

lóbulo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo derivado del mesénquima, la cual se extiende hacia el interior del lóbulo formando tabiques que lo dividen en lobulillos. Cada lobulillo presenta una corteza rica en linfocitos y una médula con menor densidad de éstos. En la médula se encuentra un elemento estructural llamado corpúsculo de Hassall que es un agrupamiento de células retículo-epiteliales engrosadas y dispuestas concéntricamente (Burnet, 1962; Ham, 1975; Roitt y col., 1986; Ross y col., 1992) (Fig 2).

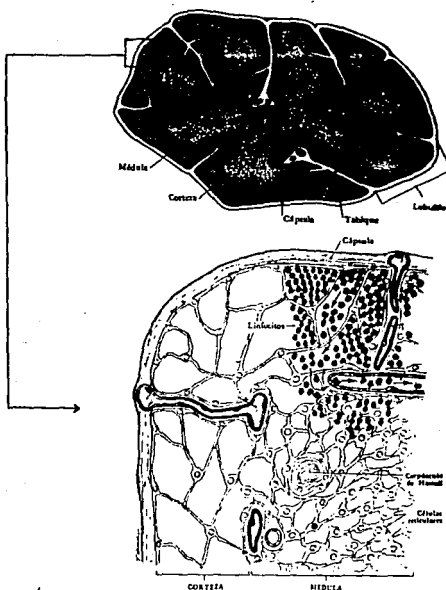


Figura 2. Representación esquemática que muestra la organización cortico-medular del timo (Tomado de: Bellanti, 1986).

En la corteza externa se encuentran células linfocíticas de núcleos grandes, mientras que en la corteza interna, los núcleos de éstas células son más pequeños. Los linfocitos T son impulsados de la corteza hacia la médula a través de los intersticios del retículo epitelial o por los espacios perivasculares de la corteza que llegan a la médula. De ahí migran por el torrente sanguíneo hacia los ganglios linfáticos y el bazo para ubicarse en las denominadas zonas timo dependientes en las cuales entrarán en contacto con los linfocitos B (Bellanti, 1986; Roitt y col., 1986; Ross y col., 1992).

Las células retículo-epiteliales sintetizan hormonas polipeptídicas llamadas timosinas, que estimulan la maduración y diferenciación de los linfocitos T (Goldstein, 1984).

Dentro de las hormonas tímicas se describe la timosina fracción 5 (timosina F-5), la cual esta compuesta por una familia de péptidos clasificados como: timosina  $\alpha_1$ , timosina  $\alpha_5$ , timosina  $\alpha_7$ , timosina  $\beta_1$ , timosina  $\beta_3$ , timosina  $\beta_4$ , timosina  $\beta_7$ , timosina  $\beta_8$ , timosina  $\beta_9$ , timosina  $\beta_{10}$  y timosina  $\gamma$  (Goldstein y col., 1981; Low y Goldstein, 1984).

Otras de las hormonas presentes en el timo son el factor tímico humoral (THF, por sus siglas en inglés), el factor tímico del suero o timulina (FTS, por sus siglas en inglés), la timoestimulina, la timopoletina y el factor tímico X (TFX, por sus siglas en inglés) (Goldstein y col., 1981; Low y Goldstein, 1984).

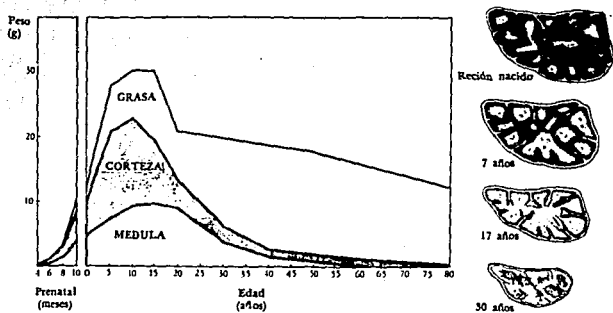
### III. Relaciones entre el timo y el sistema reproductor.

El timo participa en los mecanismos que regulan el sistema reproductor. Algunas de las evidencias que lo muestran son:

1. En los mamíferos, el tamaño del timo aumenta desde el nacimiento hasta la pubertad, momento en el que comienza su involución en respuesta al incremento en las concentraciones plasmáticas de las hormonas sexuales. Esta disminución del timo se debe principalmente al decremento en la proliferación de linfocitos en la corteza (Burnet, 1962; Ham, 1975; Roitt y col., 1986; Aboussaouira y col., 1989) (Fig 3).

2. La involución del timo se acelera durante la preñez, lo que se atribuye al aumento de las concentraciones plasmáticas de progesterona y corticosterona durante este periodo (Carter, 1976; Chambers y Clarke 1979; Grossman, 1984).

3. La administración de progesterona, estrógenos o testosterona provoca la involución del timo (Grossman, 1984; Fitzpatrick y col., 1985).



**Figura 3. Representación gráfica y esquemática que muestra los cambios en peso y composición del timo humano durante el proceso de involución (Tomado de: Bellanti, 1986).**

4. La castración antes de la pubertad retarda el proceso de involución del timo, mientras que en el animal adulto la extirpación de las gónadas induce su hipertrofia (Janardana y Sirsi, 1961; Grossman, 1984, 1985; Fitzpatrick y col., 1985; Rosas y col., 1992).

5. En las células retículo-epiteliales del timo existen receptores específicos a las hormonas sexuales y a la GnRH (Sholiton y col., 1980; Grossman, 1984; Morgan y Grossman, 1985; Marchetti y col., 1989a,b).

6. La inyección de antagonistas de la GnRH promueve la involución del timo. Al parecer esta hormona estimula el desarrollo y mantenimiento del epitelio tímico (Marchetti y col., 1990).

**a) Efectos de los polipéptidos tímicos sobre la función hipotálamo-hipofisaria y gonadal.**

Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que algunas de las hormonas sintetizadas por el timo presentan actividad biológica sobre el sistema reproductor.

Se ha descrito que la administración de timosina F-5 ó timosina  $\beta_4$  a ratas prepúberes aumenta la concentración plasmática de estradiol y adelanta la edad de la apertura vaginal (Michael, 1983).

El agregado de timosina F-5 o timosina  $\beta_4$  al sistema de perfusión de hipotálamo e hipófisis, incrementa la secreción hipotalámica de GnRH, lo que se refleja en el aumento de la síntesis de gonadotropinas por la hipófisis (Rebar y col., 1981a).

En cerdas, la concentración plasmática de timosina  $\beta_4$  varía durante el ciclo estral, aumentan en la fase folicular y disminuyen en la luteal, en forma paralela con la concentración plasmática de progesterona (Ford y col., 1990).

Del timo también se ha aislado un factor de 28 kD que actúa de manera sinérgica con la GnRH sobre la síntesis *in vitro* de gonadotropinas por las células de hipófisis de rata. En las células foliculares del ovario y en las células de Leydig del testículo en cultivo, este factor inhibe la síntesis de esteroides estimulada por la gonadotropina coriónica humana (hCG, por sus siglas en inglés) ya que modifica la afinidad de la hCG por su receptor (Hiriart y Romano 1986; Aguilera y Romano, 1989; Mendoza y Romano, 1989).

El medio de incubación de timo y el medio condicionado de células retículo-epiteliales del timo contienen un factor que estimula la secreción *in vitro* de la LH por las células de la hipófisis de rata (Martín y col., 1992; Romano y col., 1993).

#### **b) Efectos de la timectomía o la atimia sobre el desarrollo del ovario.**

La rata y el ratón timectomizados (Tx) al nacimiento, han sido los modelos biológicos más utilizados en el estudio de la vinculación del timo con los mecanismos que regulan la función reproductora.

Se ha observado que la timectomía neonatal provoca, en animales adultos (130 días), disgénesis ovárica caracterizada por infiltración linfocítica en los folículos, disminución del número de ovocitos, hipertrofia e hiperplasia de las células intersticiales, proliferación del tejido conectivo, ausencia de cuerpos lúteos o destrucción de los mismos por la proliferación del tejido conectivo y presencia de quistes. Estos cambios en la morfología del ovario se acompañan de la disminución en las concentraciones plasmáticas de la FSH, la LH, la GH, la prolactina y los estrógenos. También se observa retardo en la edad de la apertura vaginal (pubertad) e infertilidad (Nishizuka y Sakakura, 1969; Besedovsky y Sorkin, 1974; Hattori y Brandon, 1979; Michael y col., 1980, 1981; Grossman, 1984).

Las alteraciones antes mencionadas sólo se observan cuando el timo se



**extirpa en la etapa perinatal (1-4 días de edad) y se ha mostrado que son el resultado de una respuesta autoinmune que da origen a la formación de anticuerpos antiovocitos (Nishizuka y Sakakura, 1969, 1971; Michael y col., 1980).**

En los animales timectomizados al nacimiento, el trasplante inmediato de timo normaliza la función reproductora (Sakakura y Nishizuka, 1972).

Otro modelo biológico utilizado en el estudio de la vinculación del timo con el sistema reproductor, es el ratón mutante alopecico y congénitamente atímico (nu/nu). Este ratón presenta características semejantes a las descritas en los animales con timectomía neonatal como son: infertilidad, foliculogénesis anormal, reducción del número de folículos, menor desarrollo del ovario y del útero, retardo en la pubertad y concentraciones plasmáticas de GnRH, FSH, LH, GH, estradiol, progesterona y testosterona menores que las del animal normal (Flanagan, 1966; Besedovsky y Sorkin, 1974; Shire y Pantelouris, 1974; Eaton y col., 1975; Plerpaoli y Besedovsky, 1975; Lintern-Moore y col., 1976; Lintern-Moore, 1977; Rebar y col., 1981b; Chesnokova y col., 1983). Sin embargo, en estos mutantes el origen de las alteraciones no se explica como en el animal timectomizado, ya que carecen de respuesta inmune.

En el ratón congénitamente atímico (nu/nu) el injerto de timo al nacimiento, previene la disminución en las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas, normaliza la función endócrina de las gónadas y los animales son fértiles (Rebar y col., 1980; Chesnokova y col., 1983).

#### **IV. Características del ratón alopecico e hipotímico.**

En la FES-Zaragoza se cuenta con una colonia de ratones alopecicos e hipotímicos denominados et/et, portadores de una mutación autosómica recesiva para el gen que regula el crecimiento normal del pelo (Rosas y col., 1987).

El mutante et/et presenta alteraciones en el desarrollo normal del timo que se manifiestan después de los 10 días de vida postnatal. En la etapa adulta el peso del timo es aproximadamente la mitad del peso de un timo normal. Además, en las hembras et/et el timo no presenta la organización corticomedular que lo caracteriza. Dado lo anterior a estos mutantes alopecicos se les ha considerado hipotímicos (Rosas y col., 1987).

Las hembras hipotímicas presentan retardo en la aparición de la pubertad. En la etapa adulta, el peso corporal y de los ovarios son menores que el de las hembras normales, mientras que el de las adrenales y el bazo son mayores. La tasa de fertilidad es similar a la de los animales normales, aunque decrece prematuramente. Sus ciclos estrales son irregulares con fases prolongadas de

diestro. El período de gestación, el crecimiento ponderal durante la preñez y el número de crías por parición son semejantes a la de los animales normales (Rosas y col., 1987).

La capacidad esteroideogénica de los ovarios de las hembras hipotímicas parece ser normal, ya que la canalización vaginal y el aumento en el peso del útero al ser tratadas con la hormona del suero de la yegua preñada (PMSG, por sus siglas en inglés) fueron similares a las de las hembras normales, lo que sugiere una modificación en la secreción de estrógenos por el ovario. En cambio la capacidad ovulatoria en respuesta al estímulo secuencial con PMSG y hCG está disminuida. El análisis de la población folicular de los ovarios de estos animales muestra que el número de folículos en el ratón et/et es menor que en el normal. Aunque los folículos crecen con la estimulación gonadotrópica, el 75% de éstos son atrésicos (Rosas y col., 1989; Rosas e Hinojosa, 1993).

A diferencia de otras cepas de ratones con alteraciones del timo, estos animales se caracterizan por mantenerse y reproducirse en las condiciones convencionales del bioterio, la mayoría rebasa el año de vida y presentan signos y síntomas de envejecimiento prematuro hasta después de esta edad (Rosas y col., 1987).

Las características de este modelo biológico espontáneo lo hacen una herramienta útil en el estudio sistematizado de la participación del timo en diversos mecanismos de regulación de la función gonadal.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El timo participa como un modulador tanto estimulador como inhibitorio de las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Su ausencia al nacimiento desencadena un proceso autoinmune sobre el ovario. El injerto de timo inmediatamente después de realizar la timectomía neonatal, previene la disgénesis ovárica, el retardo en la edad de la apertura vaginal, la disminución en las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas y esteroides sexuales y normaliza la función reproductora.

Debido a que los ratones alopécicos-hipotímicos presentan retardo en la edad en la que inicia la pubertad y menor capacidad ovulatoria ante el estímulo gonadotrópico, en el presente trabajo se estudiaron los efectos del injerto de timo a diferentes edades del desarrollo postnatal, sobre la maduración sexual y la primera ovulación de estos ratones.

## **HIPOTESIS**

La deficiencia en el desarrollo del timo ocasiona sólo algunas de las alteraciones reproductivas observadas con la timectomía neonatal. Por lo que la presencia de un timo normal en animales hipotímicos regulará en parte el proceso de pubertad y la ovulación dependiendo de la edad y de las condiciones neuroendócrinas del animal.

## **OBJETIVO**

Analizar los efectos del injerto de timo realizado al nacimiento o en diversas edades del desarrollo postnatal en ratones hipotímicos, sobre la pubertad y la ovulación espontáneas e inducidas.

## METODOLOGIA

Se utilizaron ratones hembra normales (CD1/et; símbolo genético et/+) y alopecicos-hipotímicos (et/et), mantenidos en condiciones controladas de luz-obscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), con libre acceso al agua y al alimento. Los animales se distribuyeron en camadas de 7 crías (alopécicos o con pelo) por madre. Los ratones fueron destetados a los 30 días de edad.

### Intervenciones quirúrgicas.

A ratones hembras alopecicas e hipotímicas et/et se les anestesió con éter y se les injertó el timo de un animal normal de la misma edad (hermano de camada), el cual fue extraído y mantenido en suero fisiológico estéril durante algunos minutos para después ser implantado en el tejido celular subcutáneo de la región axilar del animal hipotímico. Se suturó inmediatamente y se cubrió la herida con gasa y tela adhesiva para evitar que la madre quitara la sutura.

Como grupo de comparación se utilizaron animales et/et a los que se les sometió a una operación simulada anestesiándolos y realizándoles una incisión de piel y posterior sutura.

### Procedimiento de autopsia.

A la autopsia se diseccionaron y pesaron en balanza de precisión, los ovarios, el útero y el timo in situ. Se disecó el injerto de timo para su posterior análisis histológico. En las trompas se buscó la presencia de ovocitos y se les contó con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

### Análisis histológico.

Los injertos de timo fueron fijados en solución de Bouin, incluidos en parafina y cortados en forma seriada cada 10  $\mu\text{m}$ . Los cortes fueron teñidos con la técnica de hematoxilina- eosina. Se consideró al injerto viable cuando presentó una corteza y una médula bien definidas, en uno o ambos lóbulos. Los datos de los animales en los que el injerto no fue viable se excluyeron del análisis de los resultados.

### Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos fueron analizados de la siguiente manera: los datos de edad de apertura vaginal y primer estro, del peso corporal y de los órganos y del número de ovocitos, fueron sometidos a la prueba de análisis de varianza multivariado (ANDEVA) seguido de la prueba de Tukey. En los casos en que la comparación se realizó entre dos grupos, se utilizó la prueba de "t" de

Student. Para comparar los resultados de la tasa de animales ovulantes, se utilizó la prueba exacta de Fisher para proporciones o la prueba de chi cuadrada. En todos los casos, sólo se consideró como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor al 5%.

### **Diseño experimental.**

#### **1. Análisis comparativo del desarrollo del ratón hipotímico y el normal desde el nacimiento hasta la pubertad.**

Debido a que en la regulación de la maduración sexual participan diversos factores entre los que se encuentran la nutrición, los estímulos sociales y las condiciones ambientales como el fotoperíodo (Ramírez, 1973), se decidió realizar un seguimiento del crecimiento de los ratones normales y alopecicos con el fin de evaluar su desarrollo postnatal bajo las condiciones actuales del bioterio.

Se utilizaron hembras normales y et/et que fueron sacrificadas por sobredosis de éter al nacimiento y a los 5, 10, 16, 20 y 30 días de edad. A otros grupos de ambos tipos de ratones, se les revisó diariamente la vagina, se registró el día de la canalización espontánea de la misma y fueron sacrificados el día del primer estro vaginal. A la autopsia todos los animales fueron procesados como se indicó anteriormente.

#### **2. Respuesta de las hembras alopecicas e hipotímicas al injerto de timo al nacimiento o en diferentes edades del desarrollo posnatal, sobre la pubertad espontánea.**

A grupos de hembras hipotímicas recién nacidas y de 5, 10, 16, 20 y 30 días se les injertó en la región axilar, el timo de un animal normal de la misma edad (hermano de camada) o se les sometió a una operación simulada (OS). Como testigos se utilizaron animales et/et intactos. Los animales fueron revisados diariamente hasta la apertura vaginal espontánea. Se tomaron frotis vaginales diarios hasta que los animales presentaron el primer estro vaginal, día en el que se sacrificaron por sobredosis de éter entre las 09:00 y 11:00 h. A la autopsia los animales fueron procesados como se indicó anteriormente.

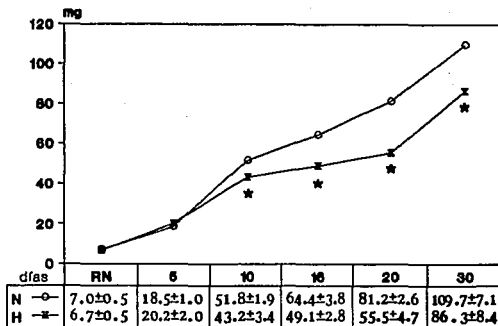
#### **3. Respuesta de las hembras alopecicas e hipotímicas al injerto de timo al nacimiento sobre la pubertad inducida por la administración de gonadotropinas.**

Con base en los resultados del experimento anterior se utilizaron ratones neonatos con injerto de timo o con operación simulada e intactos a los cuales se les administró en la mañana del día 25 de edad, 5 u.i. de PMSG (Sigma Chemical Co., St Louis, MS, EE.UU), por vía subcutánea. Los animales fueron revisados diariamente hasta que se presentó la apertura vaginal, momento en

que se inició la toma de frotis vaginales diarios. Los ratones fueron sacrificados 72 h después de la inyección de PMSG. A la autopsia los animales fueron procesados como se indicó anteriormente. Como grupo de comparación se contó con animales intactos que fueron sacrificados a los 28 días de edad.

## RESULTADOS

La curva de crecimiento del timo de las hembras normales y de las alopécicas mostró que el animal et/et presenta hipoplasia tímica a partir de los 10 días de edad (Fig. 4).



\* $p < 0.05$  vs N

RN = recién nacido

Fig. 4. Media  $\pm$  e.e.m. del peso del timo (mg) de ratones hembra normales (N) e hipotímicos (H) sacrificados a diferentes edades.

Los resultados del peso corporal y de los órganos, de los animales normales e hipotímicos sacrificados a diferentes edades indicaron que en las hembras hipotímicas el peso corporal fue menor que el del animal normal a partir de los 10 días de edad, observándose diferencias estadísticamente significativas a los 10, 20 y 30 días. El peso de los ovarios de estos animales también fue menor respecto al normal a las edades de 5 y 20 días, mientras que el peso del útero sólo mostró diferencias a partir de los 20 días (Tabla 1).

Tabla 1. Media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal (g), de los ovarios y el útero (mg) de ratones hembras normales (N) e hipotímicos (H), sacrificados a diferentes edades.

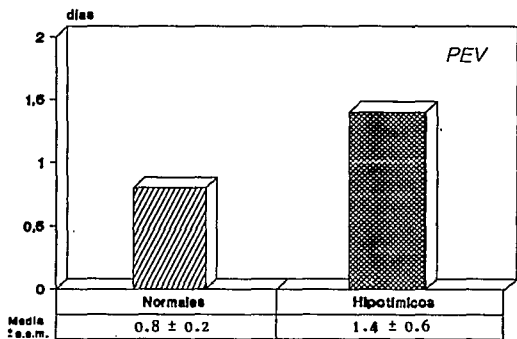
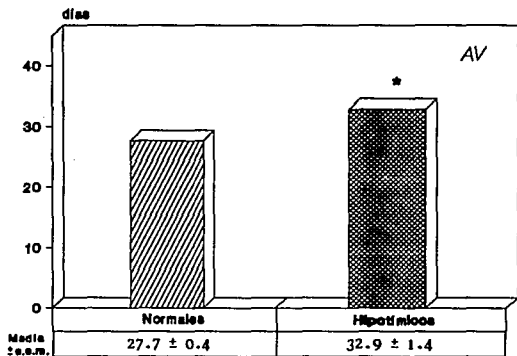
EDAD(días)	n		PESO CORPORAL		OVARIO		UTERO	
	N	H	N	H	N	H	N	H
RN	11	11	1.7 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.2
5	14	12	3.6 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.2	4.5 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 0.3*	6.9 $\pm$ 0.5	6.2 $\pm$ 0.4
10	11	10	7.5 $\pm$ 0.2	6.7 $\pm$ 0.1*	5.0 $\pm$ 0.4	3.7 $\pm$ 0.5	10.5 $\pm$ 0.8	11.4 $\pm$ 1.1
16	11	12	9.3 $\pm$ 0.2	8.8 $\pm$ 0.4	7.8 $\pm$ 0.8	6.5 $\pm$ 0.6	18.4 $\pm$ 1.0	16.4 $\pm$ 1.0
20	13	9	12.7 $\pm$ 0.4	10.1 $\pm$ 0.5*	8.4 $\pm$ 0.6	6.8 $\pm$ 0.4*	19.4 $\pm$ 1.0	14.9 $\pm$ 1.9*
30	11	9	21.3 $\pm$ 0.4	17.8 $\pm$ 0.8*	9.5 $\pm$ 0.8	7.9 $\pm$ 0.7	37.9 $\pm$ 3.2	26.1 $\pm$ 1.6*

\*  $p < 0.05$  vs N

RN = recién nacido

El análisis comparativo de la edad de la apertura vaginal de los ratones normales y alopecicos, mostró que en el ratón hipotímico ésta fue retrasada respecto al normal. La presencia del primer estro vaginal fue igual en ambos tipos de animales (Fig. 5).

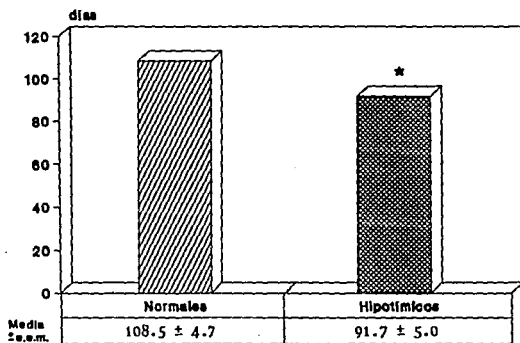




\*  $p < 0.05$  vs Normales

Fig. 5. Media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (días) [AV] y el primer estro vaginal (días posteriores a la apertura vaginal) [PEV] de ratones hembra normales e hipotímicos sacrificados el día del primer estro vaginal.

El peso del timo fue menor en la hembra alopécica, sacrificadas el día del primer estro vaginal (Fig. 6).



\*  $p < 0.05$  vs Normales

Fig. 6. Media  $\pm$  e.e.m. del peso del timo (mg) de ratones hembra normales e hipotímicos sacrificados el día del primer estro vaginal.

La edad promedio al sacrificio (primer estro vaginal) fue mayor en las hembras alopécicas respecto a las normales, sin embargo no se observaron diferencias en el peso corporal ni de los órganos entre ambos tipos de animales, lo que indicó un menor crecimiento en las hipotímicas (Tabla 2).

Tabla 2. Media  $\pm$  e.e.m. de la edad al sacrificio (días), el peso corporal (g), de los ovarios y el útero (mg) de ratones hembra normales e hipotímicos, sacrificados el día del primer estro vaginal.

PARAMETROS	NORMALES (n=15)	HIPOTIMICOS (n=14)
Edad al sacrificio	28.5 $\pm$ 0.5	34.3 $\pm$ 1.8*
Peso corporal	22.7 $\pm$ 0.4	22.5 $\pm$ 0.6
Ovarios	8.4 $\pm$ 0.6	7.8 $\pm$ 0.5
Útero	82.9 $\pm$ 6.9	78.6 $\pm$ 9.0

\*  $p < 0.05$  vs Normales

***Respuesta de las hembras alopecicas hipotímicas al injerto de timo al nacimiento o en el período posnatal, sobre la pubertad espontánea.***

El análisis a la autopsia, así como el posterior análisis histológico de los injertos de timo realizados a las diferentes edades, mostró una frecuencia menor del 50% de injertos viables para la mayoría de las edades, pero a los 30 días de edad el 100% de los animales rechazó el timo trasplantado, razón por la cual los resultados de estas hembras fueron excluidos del análisis.

En la figura 7 se muestra dos microfotografías de los injertos de timo en el tejido celular subcutáneo, en las que se observa la pérdida de las zonas cortical y medular en los trasplantes rechazados comparados con los que fueron aceptados por el hospedero.



Fig. 7. Fotomicrografía del injerto de timo realizado a los 16 días de edad y analizados en la etapa puberal (12.5x H-E). Superior: injerto de timo aceptado. Inferior: injerto de timo rechazado.

## FE DE ERRATAS

**Fig. 7. Fotomicrografía del injerto de timo realizado a los 16 días de edad y analizados en la etapa puberal (12.5x H-E). Superior: injerto de timo aceptado. Inferior: injerto de timo rechazado.**

Debe decir:

**Fig. 7. Fotomicrografía del injerto de timo realizado a los 5 días de edad y analizados en la etapa puberal (32x H-E). Superior: injerto de timo aceptado. Inferior: injerto de timo rechazado.**

Los animales alopecicos sometidos a una operación simulada a los 16 días de edad presentaron adelanto en la edad de la apertura vaginal. Esta intervención quirúrgica realizada en otras edades, no modificó dicho parámetro en comparación con el animal intacto. Los resultados del primer estro vaginal indicaron que la operación simulada retrasó el primer estro vaginal sólo cuando ésta se realizó al nacimiento (Fig. 8).

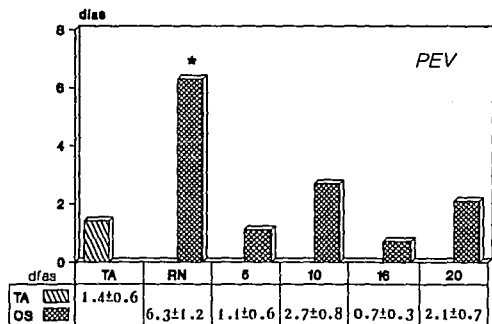
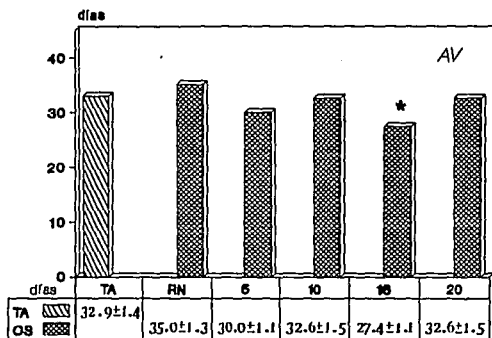
La edad promedio al sacrificio (primer estro vaginal) fue mayor en el animal sometido a una operación simulada al nacimiento respecto al grupo testigo, sin embargo, el peso corporal fue igual, lo que mostró un menor desarrollo en el animal con intervención quirúrgica. En los ratones con operación simulada a los 16 días, la edad del sacrificio fue menor así como el peso corporal en comparación con el grupo testigo (Tabla 3).

**Tabla 3. Media  $\pm$  e.e.m. de la edad al sacrificio (días) y del peso corporal (g) de ratones hipotímicos con operación simulada (OS) a diferentes edades e intactos (TA), sacrificados el día del primer estro vaginal.**

GRUPO	n	EDAD AL SACRIFICIO	PESO CORPORAL
TA	14	34.3 $\pm$ 1.8	22.5 $\pm$ 0.6
OS			
RN	6	41.3 $\pm$ 1.1*	21.0 $\pm$ 0.9
5	10	31.1 $\pm$ 1.2	19.8 $\pm$ 1.2
10	10	35.3 $\pm$ 1.7	21.8 $\pm$ 1.1
16	9	28.1 $\pm$ 1.0*	18.9 $\pm$ 1.2*
20	10	34.7 $\pm$ 1.2	23.3 $\pm$ 0.7

\*  $p < 0.05$  vs TA

RN = recién nacido

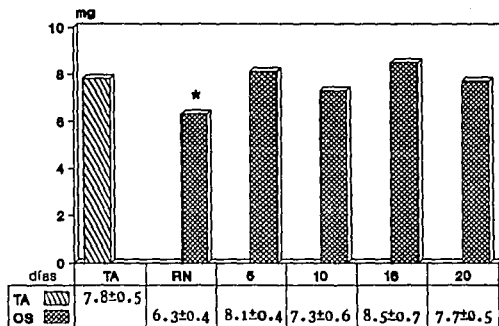


\*  $P < 0.05$  vs TA

RN = recién nacido

Fig. 8. Media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (días) [AV] y el primer estro vaginal (días posteriores a la apertura vaginal) [PEV] de ratones hembra hipotímicos con operación simulada (OS) a diferentes edades e Intactos (TA), sacrificados el día del primer estro vaginal.

El peso absoluto de los ovarios de los animales hipotímicos con operación simulada al nacimiento, fue menor que el de los testigos (Fig. 9). Esta diferencia no se observó en función del peso corporal ( $3.0 \pm 0.2$  vs  $3.5 \pm 0.2$  mg/10g, NS). El peso relativo de los ovarios de los animales con operación simulada a los 16 días mostraron un incremento significativo en comparación con el grupo testigo ( $4.6 \pm 0.4$  vs  $3.5 \pm 0.2$  mg/10g,  $p < 0.05$ ).



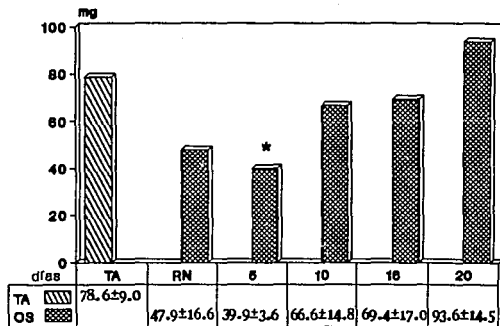
\*  $p < 0.05$  vs TA

RN = recién nacido

Fig. 9. Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios (mg) de ratones hembra hipotímicos con operación simulada (OS) a diferentes edades e intactos (TA), sacrificados el día del primer estro vaginal.

El peso del útero en el día del primer estro vaginal, decreció cuando la operación simulada se realizó a los 5 días de edad (Fig. 10), lo cual también se observó en pesos relativos respecto a los animales intactos ( $20.5 \pm 1.7$  vs  $35.4 \pm 4.3$  mg/10g,  $p < 0.05$ ).



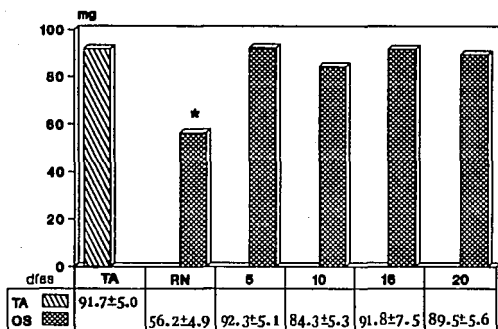


\* $p < 0.05$  vs TA

RN = recién nacido

Fig. 10. Media  $\pm$  e.e.m. del peso del útero (mg) de ratones hembra hipotímicos con operación simulada (OS) a diferentes edades e intactos (TA), sacrificados el día del primer estro vaginal.

Sólo en los animales sometidos a operación simulada al nacimiento el peso del timo tuvo un decremento estadísticamente significativo en relación al grupo testigo (Fig. 11). Dicho efecto se observó aún expresando los resultados en función del peso corporal ( $26.7 \pm 1.9$  vs  $41.1 \pm 2.4$  mg/10g,  $p < 0.05$ ). En comparación con el testigo el peso relativo del timo de las hembras con operación simulada a los 16 días mostró un incremento significativo ( $48.6 \pm 2.7$  vs  $41.1 \pm 2.4$  mg/10g,  $p < 0.05$ ).

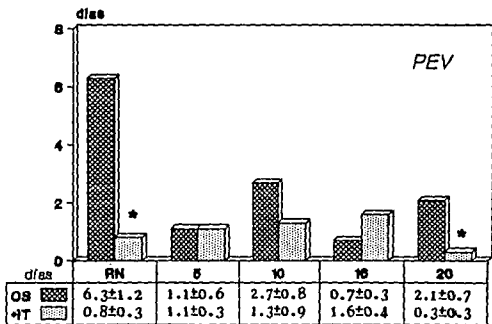
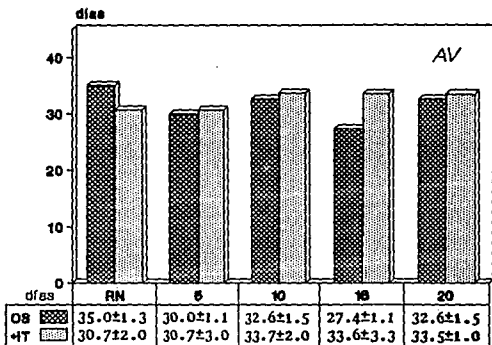


\*p < 0.05 vs TA  
RN = recién nacido

Fig. 11. Media  $\pm$  e.e.m. del peso del timo (mg) de ratones hembra hipotímicos con operación simulada (OS) a diferentes edades e intactos (TA), sacrificados el día del primer estro vaginal.

Dadas las diferencias observadas en los parámetros evaluados al realizar la operación simulada, los resultados del injerto de timo se compararon con su correspondiente operación simulada.

El injerto de timo no modificó la edad de la apertura vaginal en ninguno de los grupos experimentales, mientras que el primer estro se adelantó cuando el trasplante de timo se realizó al nacimiento y a los 20 días de edad (Fig. 12).



\*  $p < 0.05$  vs OS correspondiente

RN = recién nacido

Fig. 12. Media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (días) [AV] y el primer estro vaginal (días posteriores a la apertura vaginal) [PEV] de ratones hembra hipofímicos con operación simulada (OS) o con injerto de timo (+IT) a diferentes edades, sacrificados el día del primer estro vaginal.

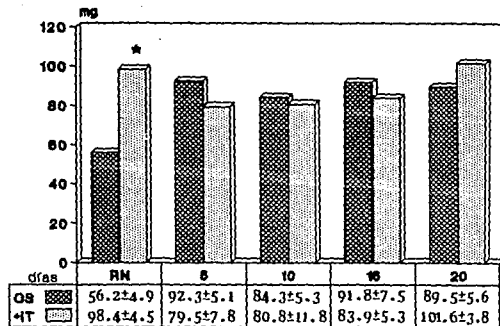
El peso corporal al sacrificio de los animales con injerto de timo al nacimiento, fue mayor que el de las hembras con operación simulada realizada a la misma edad, sin embargo, los animales con trasplante fueron significativamente de menor edad (Tabla 4).

**Tabla 4. Media  $\pm$  e.e.m. de la edad al sacrificio (días) y del peso corporal (g) de ratones hipotímicos con operación simulada (OS) o con injerto de timo (+IT) a diferentes edades, sacrificados el día del primer estro vaginal.**

GRUPO	n	EDAD AL SACRIFICIO	PESO CORPORAL
RN			
OS	6	41.3 $\pm$ 1.1	21.0 $\pm$ 0.9
+IT	6	31.5 $\pm$ 2.2*	24.8 $\pm$ 1.1*
5 días			
OS	10	31.1 $\pm$ 1.2	19.8 $\pm$ 1.2
+IT	7	31.9 $\pm$ 2.9	18.9 $\pm$ 2.0
10 días			
OS	10	35.3 $\pm$ 1.7	21.8 $\pm$ 1.1
+IT	3	35.0 $\pm$ 1.5	21.0 $\pm$ 0.9
16 días			
OS	9	28.1 $\pm$ 1.0	18.9 $\pm$ 1.2
+IT	5	35.2 $\pm$ 3.2	20.5 $\pm$ 1.3
20 días			
OS	10	34.7 $\pm$ 1.2	23.3 $\pm$ 0.7
+IT	4	33.8 $\pm$ 0.9	23.4 $\pm$ 0.8

\*  $p < 0.05$  vs OS correspondiente  
RN = recién nacido

El injerto de timo de los 5 a los 20 días de edad no modificó el peso del timo *in situ*. Sin embargo en el animal con trasplante de timo al nacimiento se presentó una recuperación del peso del timo *in situ* (Fig. 13). Este efecto se mantuvo cuando se expresaron los resultados en función del peso corporal (40.4  $\pm$  3.6 vs 26.7  $\pm$  1.9 mg/10g,  $p < 0.05$ ).

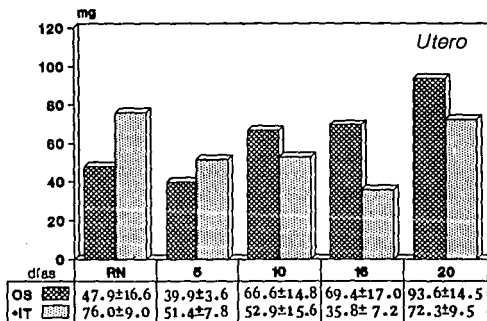
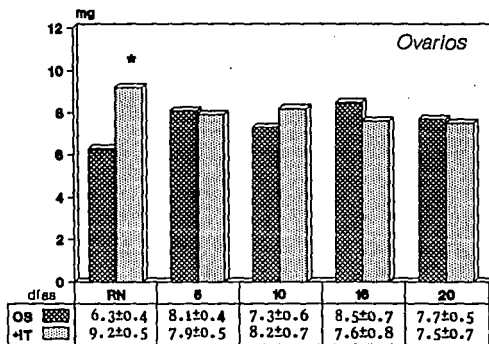


\* $p < 0.05$  vs OS correspondiente

RN = recién nacido

Fig. 13. Media  $\pm$  e.e.m. del peso del timo *in situ* (mg) de ratones hipotímicos con operación simulada (OS) o con injerto de timo (+IT) a diferentes edades, sacrificados el día del primer estro vaginal.

El trasplante de timo al nacimiento, también provocó aumento del peso de los ovarios respecto al grupo con operación simulada, resultado que se mantiene al expresar los datos en función del peso corporal ( $3.8 \pm 0.2$  vs  $3.0 \pm 0.2$  mg/10g,  $p < 0.05$ ). El peso del útero no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los animales con injerto y los sometidos a la operación simulada, excepto al nacimiento donde se aprecia un incremento porcentual del 59% (Fig. 14).



\*p < 0.05 vs OS correspondiente

RN = recién nacido

Fig. 14. Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y el útero (mg) de ratones hembra hipotímicos con operación simulada (OS) o con injerto de timo (+IT) a diferentes edades, sacrificados el día del primer estro vaginal.

***Respuesta de las hembras alopécicas hipotímicas al injerto de timo al nacimiento sobre la pubertad inducida por la administración de gonadotropinas.***

Con base en los resultados del experimento anterior, en los cuales se observó que el injerto de timo al nacimiento provocó cambios en los parámetros evaluados en el animal púber, se decidió realizar la administración gonadotrópica en animales con injerto a esta edad.

En los tres grupos de animales, intactos, con operación simulada o con injerto de timo, la administración de PMSG a los 25 días de edad indujo la apertura vaginal en las 48 h siguientes al tratamiento hormonal, presentándose el primer estro vaginal 24 h después.

En las hembras testigo y con operación simulada, la administración de PMSG indujo la ovulación en todos los animales, mientras que en las hembras con injerto de timo, la ovulación se presentó en el 80% de éstas. El número de ovocitos liberados fue semejante en los tres grupos con tratamiento hormonal, observando un ligero decremento en los animales con injerto de timo, sin llegar a ser estadísticamente significativo (Fig. 15).

El peso corporal de los animales tratados con PMSG fue mayor que el de los testigos intactos sacrificados a la misma edad (28 días) (TA + PMSG  $19.5 \pm 0.9$ ; OS + PMSG  $21.3 \pm 0.5$ ; +IT  $19.5 \pm 0.6$  vs TA  $12.1 \pm 1.1$  g,  $p < 0.05$ ). Dadas estas diferencias los resultados de los pesos de los órganos se expresan en valores relativos (mg/10g de peso corporal).

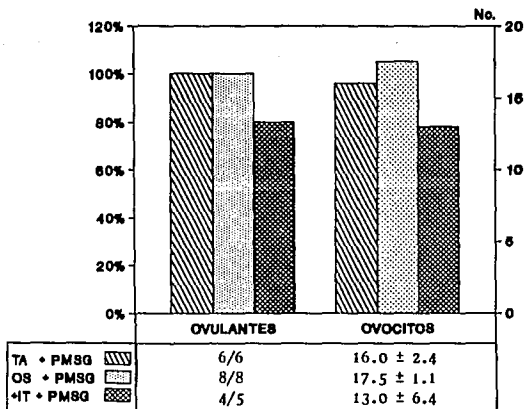


Fig. 15. Tasa de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratones hembra hipotímicos con operación simulada (OS) o con injerto de timo (+IT) al nacimiento e intactos (TA), tratados con PMSG y sacrificados a las 72 h después, o sin tratamiento sacrificados el día del primer estro vaginal.

El peso del timo fue similar entre el testigo de 28 días y los tres grupos de animales tratados con gonadotropinas (Fig. 16).



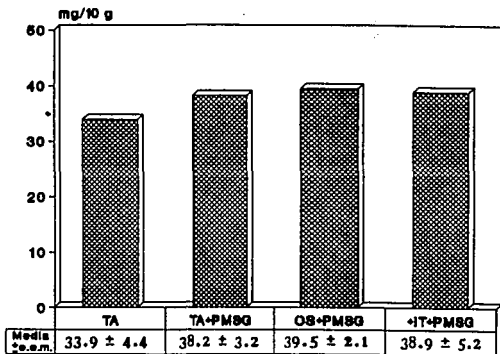
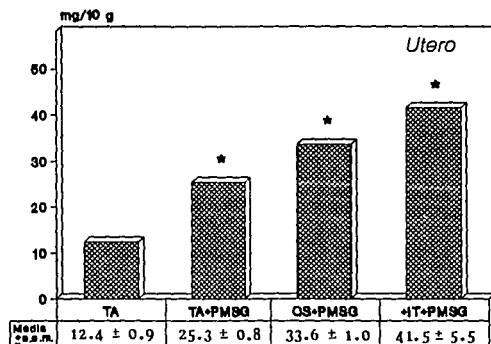
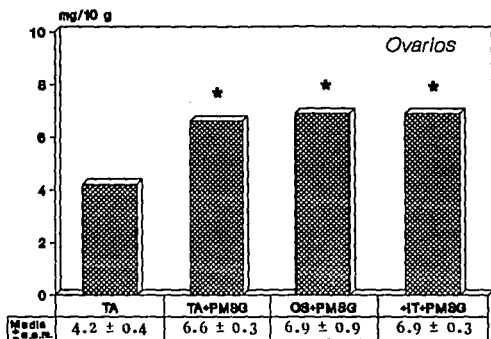


Fig. 16. Media  $\pm$  e.e.m. del peso del timo (mg/10g) de ratones hembra hipofimicos con operación simulada (OS) o con injerto de timo (+IT) al nacimiento e intactos (TA) tratados con PMSG y sacrificados 72 h después, o sin tratamiento sacrificados el día del primer estro vaginal.

En los tres grupos experimentales tratados con PMSG se observó un aumento estadísticamente significativo en el peso de los ovarios y del útero, en comparación con el testigo prepúber (Fig. 17).



\*p < 0.05 vs TA

Fig. 17. Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y del útero (mg/10g) de ratones hembra hipotímicos con operación simulada (OS) o con injerto de timo (+IT) al nacimiento e intactos (TA) tratados con PMSG y sacrificados 72 h después, o sin tratamiento sacrificados el día del primer estro vaginal.

## DISCUSION

Las hembras et/et intactas mantenidas en las condiciones convencionales del bioterio conservaron las características descritas previamente para este ratón mutante (Rosas y col., 1987, 1989; Rosas, 1990), siendo las más relevantes para este estudio la hipoplasia tímica a partir de los 10 días de edad, decremento en el peso corporal, de los ovarios y del útero en algunas edades del desarrollo postnatal y pubertad retardada.

El retraso en la apertura vaginal espontánea que presentaron los animales hipotímicos, sugiere una modificación temporal en la activación de los mecanismos que regulan la secreción de los estrógenos. El hecho que el peso del útero fue menor al normal en los animales prepúberes de 20 y 30 días de edad, pero igual en ambos tipos de animales a la apertura vaginal, apoyan esta interpretación.

En las hembras alopecicas púberes, la operación simulada realizada al nacimiento indujo una disminución del 38.7% en el peso del timo, efecto que no se observó en el resto de las edades, lo que indica que este órgano es más susceptible al estrés quirúrgico en la etapa neonatal.

Cuando el peso del timo disminuyó de manera aguda por el efecto del estrés, se presentaron una serie de alteraciones en el momento de la pubertad como son retraso en el primer estro y menor peso de los ovarios, así como una tendencia en el peso del útero a disminuir y la apertura vaginal a retrasarse. Al parecer, el timo del animal et/et si está participando en la regulación de la función de los ovarios.

El ratón et/et rechaza los heteroinjertos de piel por lo que no se le considera inmunodeficiente (Rosas, 1990). Estudios más recientes muestran que las poblaciones de linfocitos y monocitos circulantes, son mayores en el ratón et/et que en el normal y su respuesta al inóculo con parásitos específicos es normal lo que confirma que no presentan inmunosupresión (Basurto y col., datos no publicados).

En el presente estudio se observó que las hembras alopecicas e hipotímicas presentaron una tasa promedio del 35% de aceptación del injerto de timo de sus hermanos de camada. Al respecto se ha mostrado que el éxito de los trasplantes de órganos depende en gran medida de las condiciones inmunológicas del individuo receptor, siendo los casos en los que la relación filial es más cercana, como son los hermanos, cuando la probabilidad de aceptación del injerto se incrementa (Roitt y col., 1986).

El análisis histológico de los injertos rechazados mostró la presencia de un

cúmulo de linfocitos dentro del órgano trasplantado, lo cual se describe como señal de reacción inmunológica e inicio del proceso degenerativo del tejido extraño (Krohn, 1977), así como la pérdida total o parcial de la organización corticomedular característica del timo. El hecho que en todos los animales de 30 días de edad no haya tenido éxito el injerto podría deberse a las condiciones inmunológicas del hospedero o bien a características propias del injerto a esa edad. Al momento no se cuenta con información que permita explicar esta respuesta.

En todas las edades se compararon los resultados de los animales que aceptaron el injerto de timo y los que no lo hicieron, encontrándose diferencias significativas sólo en los recién nacidos, por lo que se decidió no incrementar el tamaño de la muestra en el resto de las edades.

El injerto de timo al nacimiento previno los efectos del estrés quirúrgico sobre el timo in situ. Condición que modificó los parámetros evaluados en el momento de la pubertad, a valores muy cercanos a los que caracterizan al ratón púber normal.

El peso de los ovarios de los animales con trasplante de timo al nacimiento se incrementó en un 46% respecto a los animales con operación simulada. Estos resultados indican que el injerto de timo está estimulando el crecimiento del ovario durante el desarrollo postnatal. El aumento del peso del útero, el adelanto en la aparición del primer estro, así como la tendencia a adelantarse la edad de la apertura vaginal, sugieren un aumento en la secreción de estrógenos por el ovario.

Se ha descrito que la timosina  $\beta_4$  estimula la secreción de GnRH in vitro y por ende la de gonadotropinas (Rebar y col., 1981a). La administración de esta timosina a ratas prepúberes incrementa la concentración de estradiol y adelanta la edad de la apertura vaginal (Michael, 1983). Un mecanismo similar podría estar involucrado en los efectos observados en el animal alopecico con injerto de timo.

El hecho que el timo trasplantado entre los 5 y los 20 días de edad no modificó la maduración sexual del ratón hipotímico sugiere que el injerto de timo de un animal normal no influye en los eventos que marcan el inicio de su pubertad, como son la canalización vaginal y el estro vaginal.

Resultados previos han mostrado que la capacidad esteroidogénica de los ovarios de los animales hipotímicos prepúberes al estímulo gonadotrópico es normal (Rosas y col., 1989; Rosas, 1990), razón por la cual es posible explicar la similitud de los resultados entre las hembras intactas con PMSG y las de injerto de timo con el mismo tratamiento gonadotrópico.

En el modelo del animal timectomizado se ha propuesto que la senescencia del compartimento folicular provocada por la reacción autoinmune (Michael y col., 1980), aunada a la insuficiencia en la estimulación gonadotrópica por la falta de hormonas líticas (a nivel de hipotálamo) (Rebar y col., 1981a; Michael, 1983) son la causa de que los ovarios de estos animales no se desarrollen y su respuesta a las gonadotropinas exógenas sea muy baja. En el et/et no parece ser este el problema, ya que los animales con o sin injerto de timo son capaces de ovular en respuesta a la PMSG. Lo anterior pone de manifiesto que el mutante hipofísico es un modelo biológico diferente al animal timectomizado al nacimiento.

Otros estudios muestran que en el ratón normal la timectomía realizada a los 10 días de edad disminuye el crecimiento de los ovarios durante el desarrollo prepuberal pero incrementa la reactividad de los ovarios a las gonadotropinas exógenas (García y Rosas, 1994).

En los animales et/et con injerto de timo, la respuesta ovulatoria (tasa de animales ovulantes y número de ovocitos liberados) presentó una tendencia a la disminución, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que el injerto de timo este participando en la receptividad del ovario a las gonadotropinas.

Se ha descrito que un factor extraído del timo de rata modifica la afinidad de la hCG por su receptor en las células de ovario en cultivo (Hiriart y Romano, 1986; Aguilera y Romano, 1989; Mendoza y Romano, 1989).

Con los resultados obtenidos en este estudio, no es posible explicar el mecanismo por el cual sólo en el ratón recién nacido la operación simulada provocó una disminución en el peso del timo en la pubertad. Una interpretación al respecto sería un aumento en las concentraciones de glucocorticoides, que como se ha descrito provocan la involución del timo (Ishidate y Metcalf, 1963).

Las siguientes evidencias podrían estar involucradas en el o los mecanismos responsables de la respuesta del ratón et/et neonato al estrés:

1. El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal es moderadamente activo en respuesta al estrés en los primeros días de vida postnatal (Butte y col., 1973; Guillet y col., 1980; Walker y col., 1986).
2. El estrés en la etapa neonatal provoca cambios en la concentración plasmática de corticosterona que se observan en el animal adulto (Butte y col., 1973).
3. En el animal adulto, el estrés crónico bloquea el mecanismo de retroalimentación negativa de los glucocorticoides (Young y col., 1990).

## ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

También se ha mostrado que el timo participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, desde la etapa fetal (Michael y col., 1981; Chesnokova y col., 1983; Healy y col., 1983, 1985) por lo que otra posibilidad sería que la respuesta del ratón *et/et* al estrés se debe a su hipotimia.

Al parecer es necesaria la presencia de un timo normal desde el nacimiento para que el crecimiento y la función de los ovarios, así como de las adrenales sean normales. En el animal hipotímico estas funciones dependen de las condiciones neuroendócrinas.

## **CONCLUSIONES**

Los resultados del presente estudio muestran que:

1. En el animal hipotímico, la etapa neonatal es la más susceptible al estrés quirúrgico.
2. El injerto de timo al nacimiento previene los efectos del estrés quirúrgico.
3. El injerto de timo al nacimiento estimula el crecimiento de los ovarios en el animal prepúber.

## BIBLIOGRAFIA

- ABOUSSAOUIRA, T., MOUSTAFA, Y. e IDELMAN, S. (1989). Image analysis of cell proliferation in rat thymus throughout development. *Thymus* **12**, 167-186.
- AGUILERA, G. y ROMANO, M. (1989). Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells *in vitro*. *J. Endocrinol.* **123**, 367-373.
- ANDREWS, W.W. y OJEDA, S.R. (1981). A detail analysis of the serum luteinizing hormone secretory profile in conscious, free-moving female rats during the time of puberty. *Endocrinology* **109**, 2032-2039.
- BASURTO, F.J., MONDRAGON, R.L., MARROQUIN, R. y DOMINGUEZ, R. Estudio de las poblaciones normales de leucocitos en el ratón desnudo et/et. Enviado a publicación.
- BECU-VILLALOBOS, D. y LACAU-MENGIDO, I.M. (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* **40**, 1-17.
- BELLANTI, J.A. (1986). *Inmunología*. 3ª ed., Interamericana, México, p.p. 18-58.
- BESEDOVSKY, H.O. y SORKIN, E. (1974). Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* **249**, 356-358.
- BURNET, S.M. (1962). La glándula timo. *Investigación y Ciencia*. p.p. 120-128.
- BUTTE, J.C., KAKIHANA, R., FARNHAM, M.L. y NOBLE E.P. (1973). The relationship between brain and plasma corticosterone stress response in developing rats. *Endocrinology* **92**, 1775-1779.
- CARTER, J. (1976). The effect of progesterone, oestradiol and hCG on cell-mediated immunity in pregnant mice. *J. Reprod. Fert.* **46**, 211-216.
- CHAMBERS, S.P. y CLARKE, A.G. (1979). Measurement of thymus weight, lumbar node weight and progesterone levels in syngeneically pregnant, allogeneically pregnant, and pseudopregnant mice. *J. Reprod. Fert.* **55**, 309-315.
- CHESNOKOVA, V.M., IVANOVA, L.N. y GRUNTENKO, E.V. (1983). Effect of the thymus on endocrine functions of the gonads and adrenals in mice. *Byull. Eksp. Biol. Med.* **96**, 89-91.



DALKIN, A.C., BOWNE, G.A., PIEPER, D.R., REGIANI, S. y MARSHALL, J.C. (1981). Pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptors during sexual maturation in the rat. *Endocrinology* **108**, 1658-1664.

DOMINGUEZ, R., CHAVEZ, R. y CRUZ, Ma.E. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. R. Domínguez Ed., M. A. Porrua, México, 161-188 p.p.

EATON, G.J., OUTZEN, H.C., CUSTER, R.P. y JOHNSON, F.N. (1975). Husbandry of the "nude" mouse in conventional and germfree environments. *Lab. An. Sci.* **25**, 309-314.

FITZPATRICK, F.T.A., KENDALL, M.D., WHEELER, M.J., ADCOCK, I.M. y GREENSTEIN, B.D. (1985). Reappearance of thymus of ageing rats after orchidectomy. *J. Endocrinol.* **106**, R17-R19.

FLANAGAN, S.P. (1966). "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res. Camb.* **8**, 295-309.

FORD, J., VAKHARIA, D., ANDERSON, L. y KLINDT, J. (1990). Thymosin- $\beta$ 4 concentrations during the estrous cycle and after hypophyseal stalk transection of female pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **193**, 185-189.

FUNKENSTEIN, B., NIMROD A. y LINDNER, H.R. (1980). The development of steroidogenic capability and responsiveness to gonadotropins in cultured neonatal rat ovaries. *Endocrinology* **106**, 98-106.

GARCIA, L. y ROSAS, P. (1994). Efectos de la timectomía realizada en la etapa infantil sobre la pubertad y la ovulación en el ratón prepúber. XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas, P6/6.

GOLDMAN, B.D. (1981). Puberty. En: *Neuroendocrinology of Reproduction*. N.T. Adler Ed., Plenum Press, New York, Londres, Chapter 8, p.p. 229-239.

GOLDSTEIN, A.L. (1984). *Thymic hormones and Lymphokines*. Plenum Press, New York, p.p. 669.

GOLDSTEIN, A., LOW, T., THURMAN, G., ZATZ, M., HALL, N., CHEN, J., HU, S-K., NAYLOR, P. y McCCLURE, J. (1981). Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland. *Recent. Prog. Horm. Res.* **37**, 369-415.

GROSSMAN, C.J. (1984). Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Rev.* **5**, 435-455.

GROSSMAN, C.J. (1985). Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* **227**, 257-261.

GUILLET, R., SAFFRAN, M. y MICHAELSON, S.M. (1980). Pituitary-Adrenal response in neonatal rats. *Endocrinology* **106**, 991-994.

HAM, A.W. (1975) *Tratado de Histología*. 7ª ed. Interamericana, México, p.p. 303-312.

HATTORI, M. y BRANDON, M.R. (1979). Thymus and the endocrine system: ovarian dysgenesis in neonatally thymectomized rats. *J. Endocrinol.* **83**, 101-111.

HEALY, D.L., BACHER, J. y HODGEN, G.D. (1985). Thymic regulation of primate fetal ovarian-adrenal differentiation. *Biol. Reprod.* **32**, 1127-1133.

HEALY, D.L., HODGEN, G.D., SCHULTE, H.M., CHROUSOS, G.P., LORIAUX, D.L., HALL, N.R. y GOLDSTEIN, A.L. (1983). The thymus-adrenal connection: Thymosin has corticotropin-releasing activity in primates. *Science* **222**, 1353-1355.

HIRIART, M. y ROMANO, M.C. (1986). Human chorionic gonadotropin binding to rat testis receptors is inhibited by a thymus factor. *Life Sci.* **38**, 789-795.

ISHIDATE, M. y METCALF, D. (1963). The pattern of lymphopoiesis in the mouse thymus after cortisone administration or adrenalectomy. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **41**, 637-649.

JANARDANA SARMA, T. y SIRSI, M. (1961). Comparison of the effect of ovariectomy and adrenalectomy on the thymus in young female rats, and a study of the part played by the thymus in body growth. *J. Endocrinol.* **22**, 177-182.

KROHN, P.L. (1977). Transplantation of the ovary. En: *The Ovary*. L. Zuckerman y B. J. Weir Eds. Academia Press, New York, p.p.101-128.

LANGMAN, J. (1976). *Embriología médica*. 3ª ed., Interamericana, México. p.p. 242-244.

LINTERN-MOORE, S. (1977). Effect of athymia on the initiation of follicular growth in the rat ovary. *Biol. Reprod.* **17**, 155-161.

LINTERN-MOORE, S., MOORE, G.P.M. y PANTELOURIS, E.M. (1976). Abnormal nucleolar growth in the oocytes of athymic "nude" mice. *Exptl. Cell Res.* **97**,

LOW, T. y GOLDSTEIN, A. (1984). Thymosins: Structure, function and therapeutic applications. *Thymus* 6, 27-42.

MARCHETTI, B., GUARCELLO, V., MORALE, M.C., BARTOLONI, G., FARINELLA, Z., CORDARO, S. y SCAPAGNINI, U. (1989a). Luteinizing hormone-releasing hormone-binding sites in the rat thymus: Characteristics and biological function. *Endocrinology* 125, 1025-1036.

MARCHETTI, B., GUARCELLO, V., MORALE, M.C., BARTOLONI, G., PALUMBO, G., RAITI, F., CUTULI, N., FARINELLA, Z. y SCAPAGNINI, U. (1990). A physiological role for the neuropeptide luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) during the maturation of thymus gland function. *Intern. J. Neuroscience* 51, 287-289.

MARCHETTI, B., GUARCELLO, V., MORALE, M.C., BARTOLONI, G., RAITI, F., PALUMBO, G., FARINELLA, Z., CORDARO, S. y SCAPAGNINI, U. (1989b). Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist restoration of age-associated decline of thymus weight, thymic LHRH receptors, and thymocyte proliferative capacity. *Endocrinology* 125, 1037-1045.

MARTIN, D., MENDOZA, M.E., CANDELARIA, P., PORRAS M.G. y ROMANO M.C. (1992). Thymic conditioned medium (TCM) stimulates GnRH effect by rat pituitary cells in culture. 74 th Annual Meeting Endocrine Society, Abstract No. 1225.

MENDOZA, M.E. y ROMANO, M. (1989). Prepubertal rat thymus secretes a factor that modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus* 14, 233-242.

MICHAEL, S.D. (1983). Interactions of the thymus and the ovary. En: *Factors Regulating Ovarian Function*. G.S. Greenwald y P.F. Terranova Eds., Raven Press, New York, p.p. 445-464.

MICHAEL, S.D., TAGUCHI, O. y NISHIZUKA, Y. (1980). Effect of neonatal thymectomy on ovarian development and plasma LH, FSH, GH and PRL in the mouse. *Biol. Reprod.* 22, 343-350.

MICHAEL, S.D., TAGUCHI, O., NISHIZUKA, Y., McCLURE, J.E., GOLDSTEIN, A.L. y BARKLEY, M.S. (1981). The effect of neonatal thymectomy on early follicular loss and circulating levels of corticosterone, progesterone, estradiol, and thymosin  $\alpha_1$ . En: *Dynamics of Ovarian Function*. N.B. Schwartz y M. Hunzicker-Dunn Eds., Raven Press, New York, p.p. 279-284.

- MORGAN, D.D. y GROSSMAN, C.J. (1985). Studies on the cytosolic estrogen receptor from rat thymus. *Thymus* 7, 279-286.
- NISHIZUKA, Y. y SAKAKURA, T. (1969). Thymus and reproduction: Sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166, 753-755.
- NISHIZUKA, Y. y SAKAKURA, T. (1971). Ovarian dysgenesis induced by neonatal thymectomy in the mouse. *Science* 89, 886-893.
- OJEDA, S.R., AGUADO, L.I. y SMITH-WHITE, S. (1983). Neuroendocrine mechanisms controlling the onset of female puberty: The rat as a model. *Neuroendocrinology* 37, 306-313.
- OJEDA, S.R., URBANSKI, H.F. y AHMED, C.E. (1986). The onset of female puberty: Studies in the rat. *Recent Progress in Hormone Research* 42, 385-440.
- OJEDA, S.R., URBANSKI, H.F. ROGERS, L.C., GONZALEZ, D. y FAHRENBACH, W.H. (1989). Neuroendocrine control of female puberty: Physiological and molecular approaches. En: *Neural Control of Reproductive Function. De Neurology and Neurobiology*. J.M. Lakoski, J.R. Pérez-Polo, D.K. Rassin, y A.R. Liss, Eds. Inc., New York, p.p. 61-77.
- PIERPAOLI, W. y BESEDOVSKY, H.O. (1975). Role of the thymus in programming of neuroendocrine functions. *Clin. Exp. Immunol.* 20, 323-338.
- RAMIREZ, V.D. (1973). Endocrinology of puberty. En: *Handbook of Physiology*. American Physiological Society. 1-28 p.p.
- REBAR, R.W., MIYAKE, A., LOW, T.L.K. y GOLDSTEIN, A.L. (1981a). Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 214, 669-671.
- REBAR, R.W., MORANDINI, I.C., BENIRSCHKE, K. y PETZE, J.E. (1980). Reduced gonadotropins in athymic mice: prevention by athymic transplantation. *Endocrinology* 107, 2130-2132.
- REBAR, R.W., MORANDINI, I.C., ERICKSON, G.F. y PETZE, J.E. (1981b). The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal females. *Endocrinology* 108, 120-126.
- ROITT, I., BROSTOFF, J. y MALE, D. (1986). *Inmunología*. MEDSI, España. p.p. 3.1-3.9.

ROMANO, M., MENDOZA, M.E., CANDELARIA, P. y PORRAS, M. (1993). Interacción neuroinmunoendócrina. En: Comunicación Neuroendócrina Bases Celulares y Moleculares. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México, p.p. 239-250.

ROSAS, P. (1990). Estudio de las características reproductoras de ratones desnudos hipotímicos y la vinculación del timo con la regulación neuroendócrina de la reproducción. Tesis Doctoral, facultad de Ciencias, UNAM.

ROSAS, P., ARGÜELLO, M.S. y DOMINGUEZ, R. (1989). Effects of noradrenergic peripheral denervation on spontaneous or induced puberty in normal and hypothyroid hairless female mice. *Med. Sci. Res.* **17**, 285-286.

ROSAS, P., CASTELLANOS, P. y DOMINGUEZ, R. (1987). The existence of spontaneous hairless ("nude") hypothyroid mutant mice from the CD1 strain, reared under conventional animal house conditions. *Med. Sci. Res.* **15**, 553-554.

ROSAS, P., DE PAZ, R., HERNANDEZ-EHLERS, V., QUIROZ, U. y DOMINGUEZ, R. (1992). Sex differences in the effects of gonadectomy and hemigonadectomy on the weight of the thymus in adult mice. *Med. Sci. Res.* **20**, 509-510.

ROSAS, P. e HINOJOSA, L. (1993). Efectos de la estimulación gonadotrófica sobre el crecimiento folicular en el ovario de ratones prepuberes normales e hipotímicos. XIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigaciones en Reproducción Humana, L-44.

ROSS, M.H., REITH, E.J. y ROMRELL, L.J. (1992). *Histología texto y Atlas color*. Médica Panamericana. México. p.p. 578-581.

SAKAKURA, T. y NISHIZUKA, Y. (1972). Thymic control mechanism in ovarian development: Reconstitution of ovarian dysgenesis in thymectomized mice by replacement with thymic and other lymphoid tissues. *Endocrinology* **90**, 431-437.

SHIRE, J.G.M. y PANTELOURIS, E.M. (1974). Comparison of endocrine function in normal and genetically athymic mice. *Comp. Biochem. Physiol.* **47 A**, 93-100.

SHOLITON, L.J., GROSSMAN, C.J. y TAYLOR, B.B. (1980). Rat thymic homogenates convert testosterone to androgenic metabolites. *J. Steroid Biochem.* **13**, 1365-1369.

WALKER, C-D., PERRIN, M., VALE, W. y RIVIER, C. (1986). Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus.

**Endocrinology 118, 1445-1451.**

**YOUNG, E.A., AKANA, S. y DALLMAN, M.F. (1990). Decreased sensitivity to glucocorticoid fast feedback in chronically stressed rats. Neuroendocrinology 51, 536-542.**